



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**Avances en la caracterización bioquímica y funcional de los sustratos del sistema de secreción tipo I PrsDE y su efecto en el desarrollo del biofilm de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841**

Tesis para optar por el título de doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Autor:** Lic. Julián Tarsitano

**Director:** Dra. Angeles Zorreguieta

**Director Adjunto:** Dra. Daniela Marta Russo

**Consejero de estudios:** Dra. Sandra Ruzal

**Laboratorio de Microbiología Molecular.**

**Fundación Instituto Leloir**

IBBA – CONICET

Julio 2022

# Tabla de contenido

Resumen.....	5
Agradecimientos .....	7
Introducción .....	8
Biofilms.....	8
Historia y definición.....	8
Formación de un biofilm – etapas y características .....	9
Composición del biofilm: matriz extracelular .....	11
Polisacáridos.....	14
Proteínas .....	15
Otros componentes (surfactantes, lípidos y agua) .....	16
ADN extracelular (ADNe).....	17
Componentes inorgánicos.....	17
Sistemas de Secreción .....	18
Secreción a través de la membrana plasmática.....	18
Sistemas de Transporte de Clase 1: Ensamblaje en la membrana externa y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular.....	19
Sistemas de Transporte de Clase 2: Ensamblaje en ambas membranas de las bacterias didermas y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular .....	21
Sistemas de Transporte de Clase 3: Sistemas de secreción en un solo paso. Atraviesan la membrana celular completa y translocan sustratos sin un intermediario periplasmático .....	23
<i>Rhizobium leguminosarum</i> .....	26
Polisacárido de <i>Rhizobium</i> .....	27
Sistemas de secreción de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841 .....	29
Proteínas Rap .....	30
Hipótesis.....	32
Objetivos .....	33
Materiales y Métodos .....	34
Medios y condiciones de cultivo .....	34
Cepas y plásmidos utilizados.....	35
Preparación de ADN genómico de <i>Rhizobium</i> .....	36
Preparación de ADN plasmídico.....	37
Amplificación de genes por PCR.....	37

Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	46
Purificación del ADN de geles de agarosa .....	46
Ligación.....	46
Preparación de <i>E. coli</i> electrocompetentes .....	47
Transformación mediante electroporación .....	47
Conjugación bi y triparental .....	48
Obtención de mutantes por recombinación homóloga.....	48
Preparación y purificación de proteínas recombinantes .....	48
Cuantificación de proteínas por Bradford.....	50
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y tinción con Coomassie Blue.....	50
Western Blot .....	50
Preparación de antisuero policlonal en ratón.....	51
Preparación de proteínas extracelulares de <i>Rhizobium</i> .....	52
Preparación de proteínas de superficie de <i>Rhizobium</i> .....	52
Análisis proteómico del secretoma de <i>Rhizobium leguminosarum</i> .....	53
Morfología de la macrocolonia .....	53
Ensayo de Actividad Glicanasa – Degradación CMC .....	53
Formación de biofilm sobre placas de poliestireno. Cuantificación con cristal violeta.....	54
Ensayos de Motilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i> .....	54
Preparación de EPS .....	55
Perfil de EPS por peso molecular .....	56
Inmunofluorescencia.....	56
Colony blot .....	57
ELISA .....	57
BIA EPS.....	58
BIA monosacáridos.....	58
Ensayo de competencia con RapA2 por el sitio de binding en el EPS.....	58
Caracterización de propiedades biofísicas de RapD .....	59
Herramientas de análisis bioinformático empleadas.....	59
Resultados .....	61
Capítulo I – RapD.....	61
RapD es una proteína altamente conservada de estructura similar a otras proteínas Rap .....	61
RapD es un sustrato del SSTI PrsDE.....	64

RapD no se asocia a la superficie bacteriana .....	71
El calcio induce cambios conformacionales y la formación de oligómeros en RapD .....	73
El polisacárido induce cambios conformacionales en RapD .....	79
Interacción de RapD con el EPS.....	80
Estudio de la capacidad de formación de biofilm y fenotipos asociados. ....	85
Análisis del perfil de peso molecular del EPS: Interacción entre RapD y RapA2 .....	87
Capítulo II: Glicanasa PlyB .....	89
PlyB es una glicanasa extracelular.....	89
PlyB es una glicanasa $\beta$ 1,4 que cliva las unidades repetitivas del EPS.....	92
PlyB es secretada de manera polar al medio extracelular y no es retenida en la superficie de la bacteria.....	94
Discusión .....	97
Información Suplementaria .....	104
Bibliografía .....	112

# Resumen

## **Avances en la caracterización bioquímica y funcional de los sustratos del sistema de secreción tipo I PrsDE y su efecto en el desarrollo del biofilm de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841**

*Rhizobium leguminosarum* sintetiza un polisacárido ácido secretado mayormente al medio extracelular (EPS) y parcialmente retenido en la superficie bacteriana como polisacárido capsular (CPS). Las proteínas Rap son sustratos del sistema de secreción tipo I PrsDE (SSTI) que comparten al menos un dominio Ra/CHDL (cadherina-like). Se ha demostrado que algunos de estos sustratos están involucrados en el desarrollo de la matriz del biofilm ya sea por clivaje del polisacárido que emerge de la superficie de la célula (las glicanasas Ply) o alterando las propiedades adhesivas de la bacteria (proteínas RapA). En esta tesis se demuestra que una nueva proteína Rap (RapD) se libera completamente al medio extracelular co-secretada con otras proteínas Rap de manera PrsDE dependiente. Más aún, en biofilms se encontraron niveles extracelulares incrementados de RapD en condiciones de cultivo que favorecen la producción de EPS. No se observaron fenotipos evidentes asociados a las propiedades adhesivas o formación de biofilms en la mutante deficiente en *rapD*. Sin embargo, por cromatografía de exclusión molecular del EPS producido por la cepa silvestre (wild type) de *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841, las mutantes isogénicas simples *rapA2* y *rapD* y la doble mutante *rapA2rapD*, se demostró que ambas proteínas Rap tienen un rol en la regulación del tamaño de las cadenas del EPS que se libera al medio extracelular. Los estudios biofísicos indicaron que el calcio gatilla cambios conformacionales en la proteína RapD hacia una estructura dominada por láminas  $\beta$ , como ocurre en las cadherinas. Más aún, la presencia de calcio induce la multimerización de RapD mientras que el agregado de EPS indujo cambios conformacionales adicionales en la proteína. Estudios de ELISA y BIA (*binding inhibition assay*) indicaron que RapD se une específicamente al EPS y que la galactosa estaría involucrada en esa interacción. Estas observaciones indican que RapD es una proteína lectina que interacciona con calcio y que es capaz de establecer multímeros y modificar las propiedades del EPS, el principal componente estructural de la matriz del biofilm del rizobio.

**Palabras clave:** Sistema de secreción tipo I, dominio cadherina like, exopolisacárido, biofilm, proteína de unión a calcio, *Rhizobium leguminosarum*, lectina, matriz extracelular, glicanasa

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en el siguiente manuscrito que fue aceptado por Forntiers in Microbiology:

“RapD is a multimeric calcium-binding protein that interacts with the *Rhizobium leguminosarum* biofilm exopolysaccharide, influencing the polymer lengths” Tarsitano J, Ramis L. Y., Alonso L. G., Russo D. M., Zorreguieta A. Frontiers in Microbiology – En prensa Mayo 2022

## **Advances in the functional and biochemical characterization of the type I secretion system PrsDE substrates and their effect on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 biofilm development**

*Rhizobium leguminosarum* synthesizes an acidic polysaccharide mostly secreted to the extracellular medium (EPS) and partially retained on the bacterial surface as a capsular polysaccharide (CPS). Rap proteins, extracellular protein substrates of the PrsDE type I secretion system (TISS) share at least one Ra/CHDL (*cadherin-like*) domain and are involved in biofilm matrix development either by cleaving the polysaccharide (Ply glycanases) or by altering the bacterial adhesive properties. Here, we show that a new Rap protein (RapD) is completely released to the extracellular medium and co-secreted with the other Rap proteins in a PrsDE-dependent manner. Furthermore, high levels of RapD secretion were found in biofilms under conditions that favor EPS production. Interestingly, size exclusion chromatography of the EPS produced by the  $\Delta rapA2 \Delta rapD$  double mutant showed a profile of EPS molecules of smaller size than those of the single mutants and the wild type strain, suggesting that both RapA2 and RapD proteins influence EPS processing on the cell surface. Biophysical studies showed that calcium triggers proper folding and multimerization of recombinant RapD. Besides, further conformational changes were observed in the presence of EPS. ELISA and BIA (binding inhibition assay) assays indicated that RapD specifically binds the EPS and that galactose residues would be involved in this interaction. Taken together, these observations indicate that RapD is a biofilm matrix-associated multimeric protein which binds calcium and that influences the properties of the EPS, the main structural component of the rhizobial biofilm.

**Keywords:** *Type I protein secretion system, cadherin-like domain, exopolysaccharide, biofilm, calcium binding protein, Rhizobium leguminosarum, lectin, extracellular matrix*

The results of this Thesis are partially published in a manuscript recently approved in *Frontiers in Microbiology*:

“RapD is a multimeric calcium-binding protein that interacts with the *Rhizobium leguminosarum* biofilm exopolysaccharide, influencing the polymer lengths” Tarsitano J, Ramis L. Y., Alonso L. G., Russo D. M., Zorreguieta A. *Frontiers in Microbiology* – In press May 2022

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Angeles Zorreguieta y a la Fundación Leloir por permitirme realizar este doctorado y por darme un lugar de trabajo del cual me voy a llevar buenos recuerdos.

Al laboratorio 204 y sus integrantes (incluidos los que ya no están) por el compañerismo, las charlas interminables, la ayuda y el crecimiento como persona y como profesional. Quiero hacer una mención especial a Daniela Russo por colaborar tanto con la dirección de este proyecto y guiarme cuando más lo necesitaba, así como prestar el hombro en los momentos más frustrantes.

A Leonardo Alonso por todas las enseñanzas, la buena onda y ser un gran salvavidas de este doctorado.

A la gente de FIL y en particular a Soledad Malori por ser psicóloga, confidente, enseñarme todo lo que se de HPLC y la infinita buena onda.

A los chicos de la facultad: Tomi, Adro, Zanon, Nacho, Licha, Lacho, Mariano y Chizo por estar siempre presentes, las salidas, los juegos de mesa y por ayudarme a transitar esta etapa acompañado y rodeado de gente que pasó por la misma

Al Núcleo Duro y los Kung Führers: Lío, Fran, Guido, Toti, Augusto, Tomi, Diego, Marce, Agus... y ponele que el Turco, por estar desde siempre en la vida y en los deportes. Las infinitas salidas y los chistes de superioridad racial. Los enfoques con los que enfrentan su vida me ayudaron a lidiar con muchas situaciones personales.

A Rocío por acompañarme durante el doctorado, enseñarme y compartir tanto conmigo.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por ser los jueces más críticos, los mayores confidentes de todos y por estar incondicionalmente. Nunca habría llegado a donde llegué sin su ayuda. Lo que me dieron es irremplazable, les voy a estar eternamente agradecido.

# Introducción

## Biofilms

### Historia y definición

El período comprendido entre 1880 y fines del siglo XX se conoce como “el período del cultivo puro” (Atlas y Bartha. 1997). Las bacterias eran consideradas como organismos independientes, móviles o flotantes; hoy en día referido como fenotipo planctónico. Las primeras observaciones de agregación bacteriana (considerado en la actualidad como el descubrimiento de los biofilms) fueron realizadas por Anthony van Leeuwenhoek en 1648 quien describió que los microorganismos son capaces de adherirse y crecer en superficies expuestas como los dientes. Heukelekian y Heller describieron por su parte el “efecto botella” para microorganismos marinos haciendo referencia al hecho de que el crecimiento y actividad bacteriana se veían incrementados cuando se adicionaba al cultivo una superficie a la cual los organismos se pudiesen adherir (Heukelekian y Heller. 1940). Por su parte Zobell (1943) observó que el número de bacterias presentes en una superficie era mucho mayor que en el agua de mar que embebía dicha superficie. Las primeras descripciones detalladas de los agregados bacterianos fueron realizadas luego de la invención de la microscopía electrónica. Jones y colaboradores pudieron demostrar que los agregados en los filtros de goteo de plantas de tratamiento de aguas residuales estaban compuestos por distintas variedades de microorganismos (a nivel morfológico) y, utilizando una combinación de rojo de rutenio y tetróxido de osmio, pudieron determinar que la matriz que englobaba las bacterias contenía polisacáridos (Jones et al. 1969). La primera teoría que explicaba la formación de películas fue acuñada en 1978 por Costerton y colaboradores quienes describieron los mecanismos por los cuales las bacterias se adherían a superficies bióticas o abióticas y los beneficios que acarrea este nicho ecológico (Costerton et al. 1978). El término biofilm (o biopelícula en castellano), el cual refiere a la agregación bacteriana ya mencionada, surge en 1981 (McCoy et al. 1981) y se instaura como la definición de los microorganismos adheridos a superficies bióticas o abióticas embebidos en una matriz extracelular.

La definición de biofilm se ha ido actualizando conforme se ha avanzado en la comprensión de los procesos de formación del mismo en distintos microorganismos. Inicialmente se ha planteado como un ensamblaje de microorganismos que se encuentra irreversiblemente asociado (no removido por un simple lavado) con una superficie y envuelto en una matriz formada principalmente por polisacárido (Donlan 2002). Se han descrito evidencias de biofilms desarrollados por bacterias patógenas que se pueden formar sin necesidad de adherirse a una superficie y que la matriz del mismo no necesariamente tiene que ser producida (únicamente) por las bacterias que conforman dicho biofilm (Bjarnsholt et al. 2013). Más aún, se han encontrado evidencias de que los agregados de bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* se iniciarían por fuerzas entrópicas inducidas por la matriz extracelular del hospedador (Secor et al. 2018).

La vida en biofilm ofrece muchas ventajas como tolerancia a agentes antimicrobianos, resistencia a la desecación y al daño UV, protección contra la depredación por protozoos, metabolismo de consorcio y la posibilidad de transferencia horizontal de genes. Además, la alta densidad poblacional facilita procesos que células aisladas no pueden llevar a cabo eficientemente como la secreción de exoenzimas o metabolitos activos únicamente cuando superan un cierto umbral de concentración (Danhorn y Fuqua. 2007).



## Formación de un biofilm – etapas y características

Los procesos de formación de biofilms son continuos y complejos, y más aún si se trata de biofilms ambientales en los que se da la concurrencia de muchas especies bacterianas. Sin embargo, los ensayos realizados en condiciones controladas de cultivo (con bacterias modelo de formación de biofilm como *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli*) han permitido definir etapas discretas en la formación de biofilms: (1) adhesión inicial de los microorganismos a una superficie o entre ellos, (2) formación de microcolonias, (3) maduración del biofilm y (4) dispersión del biofilm (Sauer et al. 2002) (Figura 1). Por otro lado, investigaciones realizadas en diferentes especies bacterianas sugieren que la señal que gatilla la formación del biofilm corresponde a un incremento en los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP (Tolker-Nielsen. 2015) que a su vez es capaz de gatillar la síntesis de adhesinas y de matriz extracelular (Monds et al. 2007; O' Connor et al. 2012).

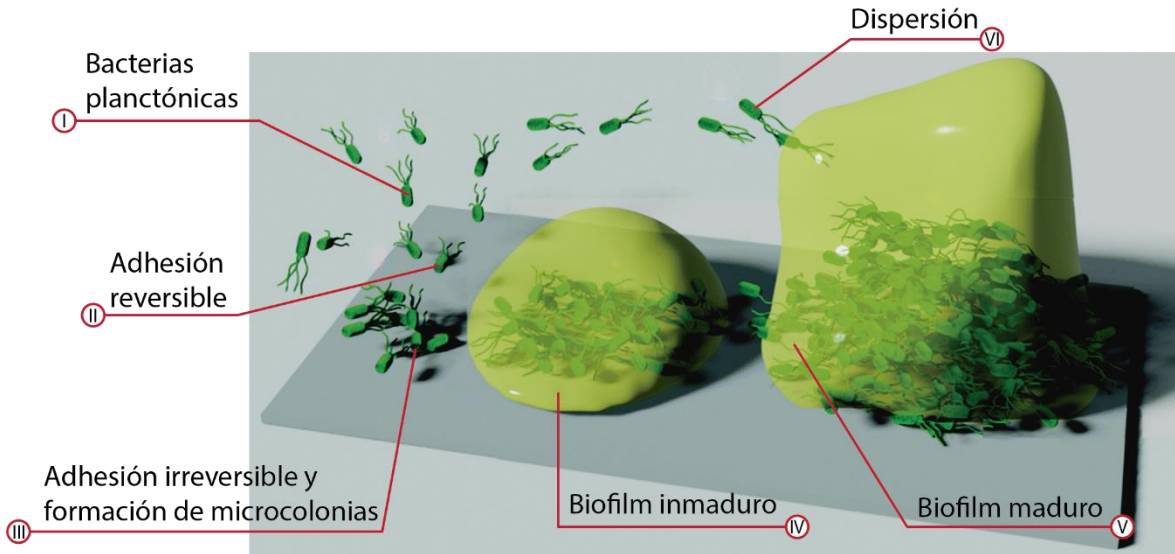


Figura 1: Etapas generales para la formación de un biofilm. La primera etapa se caracteriza por bacterias planctónicas que exploran el sustrato y se anclan a la superficie por medio de una adhesión reversible. Posteriormente estas bacterias ancladas reversiblemente se fijan al sustrato mediante la adhesión irreversible y dan lugar a la formación de microcolonias. A continuación, ocurre la maduración del biofilm el cual pasa por distintas etapas hasta completar la misma. Finalmente, la dispersión del biofilm ocurre por diversos mecanismos y permite la expansión y colonización de nuevas superficies.

Tomando como referencia a *P. aeruginosa* se propone que la superficie donde se desarrolla el biofilm es colonizada inicialmente por mecanismo tipo *twitching*, que permite el desplazamiento de las bacterias por superficies húmedas, dando lugar a la adhesión irreversible al sustrato (Semmler et al. 1999). La formación de microcolonias y estructura del biofilm es dependiente del medio de cultivo utilizado (Klausen et al. 2003a) (Figura 2A y B) y de la especie bacteriana (Tolker-Nielsen et al. 2000). En el caso de un cultivo con glucosa como fuente de carbono, la formación de microcolonias surge por crecimiento exponencial de estas bacterias irreversiblemente adheridas (Klausen et al. 2003a). En el mismo medio se observó la segregación en dos subpoblaciones: bacterias sésiles que van a dar lugar a las microcolonias, y bacterias móviles que exploran el sustrato. Las microcolonias obtenidas por expansión clonal de estas bacterias sésiles dan lugar al tallo de las estructuras tipo hongo características del biofilm de *P. aeruginosa* cultivada en glucosa (Figura 2C)

mientras que la población migratoria coloniza y forma la parte superior del biofilm más expuesta al medio de cultivo (Klausen et al. 2003b).

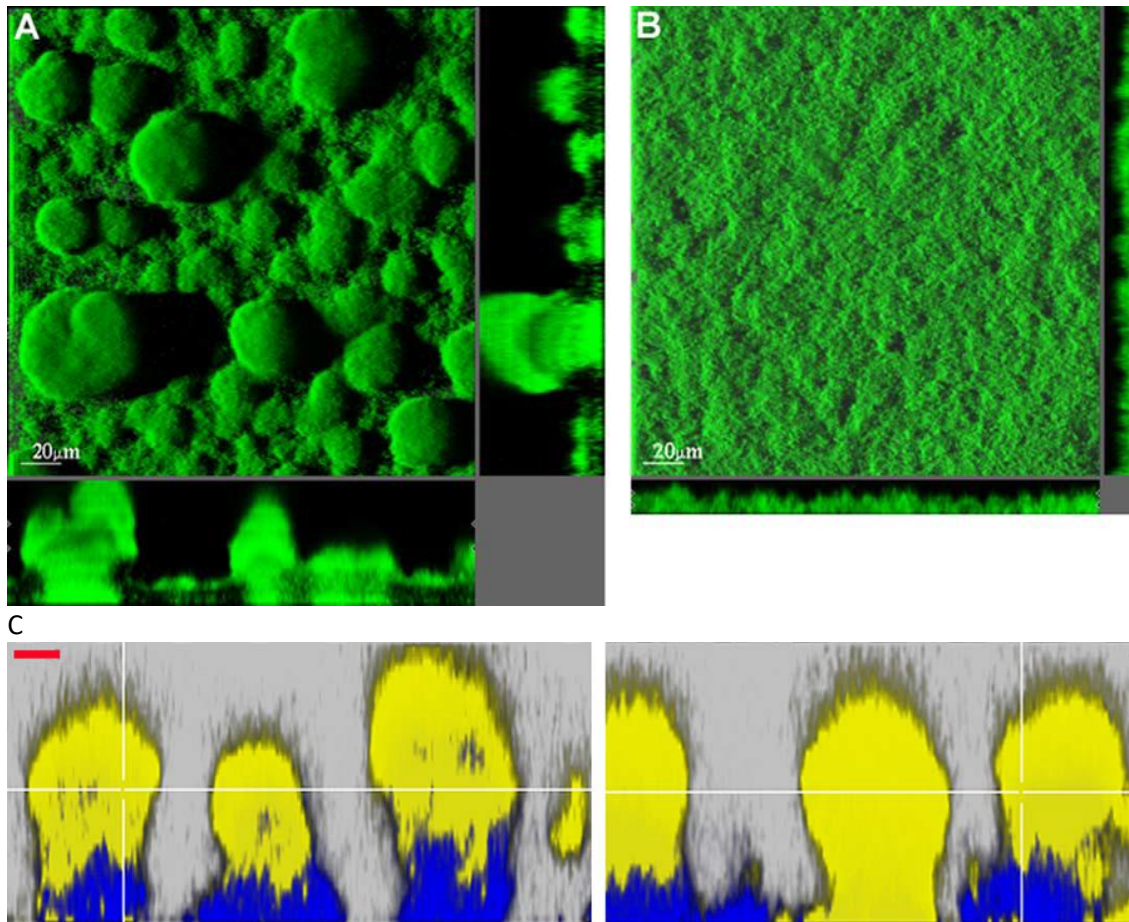


Figura 2: Imágenes obtenidas por microscopía confocal de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas durante 5 días en cámaras de flujo continuo. A) Bacterias cultivadas en medio mínimo con glucosa. B) Bacterias cultivadas en medio mínimo con citrato como fuente de carbono. C) Secciones verticales de un biofilm formado en medio mínimo con glucosa durante 4 días iniciado con una mezcla 1:1 de bacterias *P. aeruginosa* PAO1 *wild type* portando Yfp (amarillo) y *P. aeruginosa* mutante para el gen *pilA* (deficiente para la biogénesis del *pilli* tipo IV) portando Cfp (azul). Imágenes obtenidas de Tolker-Nielsen 2015, doi: doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.

Ensayos transcriptómicos realizados por diversos grupos de investigadores no han podido identificar consistentemente regulones asociados a la formación de biofilm (Tolker-Nielsen 2015). Una hipótesis sugiere que, coincidente con las modificaciones fenotípicas de los biofilms en respuesta a distintas condiciones de cultivo y cultivos mixtos, la formación de biofilms sería un proceso regulado por respuestas adaptativas (Tolker-Nielsen 2015). No obstante, este proceso requiere la expresión de determinados genes cuyos productos están presentes en la matriz extracelular de *Pseudomonas* como los polisacáridos Psl, Pel y alginato, ADN extracelular, *pilli* tipo IV, Cup, CdrA, LecA, LecB y Fap (Tolker-Nielsen 2015). Por lo tanto, la formación de biofilm sería un proceso que depende de la regulación de estos componentes de la matriz extracelular.

El C-di-GMP es un segundo mensajero ubicuo ampliamente utilizado por las bacterias. Inicialmente fue descubierto como un activador alostérico del complejo de síntesis de celulosa en *Gluconoacetobacter xylinus* (Ross et al. 1987). Esta molécula fue establecida como un regulador central de la formación de biofilm y como el interruptor principal entre un estilo de vida móvil y un estilo de vida sésil en bacterias Gram negativas (Simm et al. 2004). Dentro de los genes regulados por este tipo de molécula se encuentran genes de producción de polisacárido, sistemas de secreción y virulencia, otros polímeros y genes relacionados a la motilidad (Karatán et al. 2009). Sin embargo, no hay evidencias que permitan asociar la producción de matriz inicial regulada por c-di-GMP a estadios tardíos de la maduración. Más aún, no se han encontrado evidencias de activación jerárquica para las distintas vías de señalización de c-di-GMP durante las distintas etapas de formación de biofilm. Esto podría implicar que las vías involucradas en la formación de biofilm podrían estar sujetas a una síntesis inicial de adhesinas y matriz mientras que los sucesivos estadios serían producto de respuestas adaptativas (Tolker-Nielsen 2015).

La dispersión de bacterias de un biofilm se puede dar por desprendimiento de células hijas a partir de bacterias en crecimiento activo, de la superficie de adherencia en respuesta a niveles nutricionales o *quorum sensing* o de pequeños fragmentos del biofilm como consecuencia de la velocidad del flujo (Donlan. 2002). Los mecanismos por los cuales las células hijas se desprenden de bacterias en crecimiento activo no se conocen en detalle. No obstante, se ha observado que la hidrofobicidad de las bacterias liberadas espontáneamente difiere significativamente de aquellas que permanecen en el biofilm, siendo las primeras mucho menos hidrofóbicas que las segundas; implicando esto, cambios regulatorios relacionados a la dispersión (Gilbert et al. 1993). La secreción de enzimas que procesan el polisacárido, como la enzima alginato liasa (enzima que es capaz de clivar alginato), podrían favorecer los procesos de desprendimiento del biofilm (Boyd y Chakrabarty. 1994). Por otro lado, la dispersión mediada por factores físicos puede ser continua afectando pequeñas porciones del biofilm (cizallamiento), rápida y masiva (desprendimiento) o por colisiones con partículas en suspensión del líquido (abrasión) (Brading et al. 1995).

La terminación o desensamblado completo de un biofilm puede darse en respuesta a señales específicas. Para el caso particular de *Pseudomonas putida*, se ha comprobado que en un lapso de minutos las células pueden dispersarse completamente en ausencia de fuente de carbono en el medio de cultivo o al detenimiento de la circulación del mismo (Gjermansen et al. 2005). Estas observaciones sugieren nuevamente que los procesos de formación de biofilm son producto de respuestas adaptativas a cambios ambientales.

## Composición del biofilm: matriz extracelular

Los biofilms son sistemas con una alta cantidad de microorganismos, en general formado por múltiples especies, que varían desde las  $10^8$  a  $10^{11}$  células/g de peso fresco (Balzer et al. 2010; Morgan-Sagatsume et al. 2008). Las bacterias ocupan aproximadamente un 10% del peso seco de un biofilm mientras que el restante 90% está comprendido por la matriz, usualmente producida por los mismos microorganismos (Flemming y Wingender. 2010).

En sus orígenes, la matriz extracelular, desconocida como tal, fue llamada "*slime*" (o lodo/baba) por el biólogo alemán Ernst Haeckel dentro del contexto de la teoría de la "abiogénesis" en sedimentos del fondo marino (Haeckel 1870). En 1931 se atribuyó la formación de *slime* en el "agua blanca"

(suspensión de fibras de celulosa y otros aditivos en la producción de papel) a bacterias capsuladas aunque no pudo ser comprobado (Beckwith. 1931; Flemming et al. 2013). Costerton y colaboradores observaron diferencias entre bacterias en cultivo y bacterias en ámbitos naturales y pudieron demostrar que solo éstas últimas se encontraban rodeadas de una malla de fibras, a la cual definieron como glicocáliz en referencia a la superficie de células eucariotas (Costerton et al. 1978). Este término fue abandonado posteriormente para ser denominado EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) luego de demostrar que la matriz estaba compuesta principalmente por polisacárido, pero también contenía proteínas (Geesey et al. 1982). A fines de evitar confusiones con los exopolisacáridos (EPS), en esta tesis emplearemos la sigla SPE (sustancias extracelulares poliméricas). La complejidad de la matriz fue demostrada gracias al advenimiento de la microscopía confocal acoplada al uso de sondas fluorescentes; demostrando que la matriz y en particular las SPE no eran parte de un gel amorfo sino un sistema altamente estructurado (Figura 3) (Lawrence et al. 2007 y 2016; Neu et al 2001). A medida que aumentaron las investigaciones realizadas sobre este sistema altamente estructurado se encontró que la matriz no estaba únicamente compuesta por polisacáridos y proteínas solubles sino también por ADN extracelular (ADNe), compuestos insolubles como fibras amiloides (Hobley et al. 2015), celulosa (Serra et al. 2013), fimbrias, *pilli* y flagelos (Hobley et al. 2015). Todos estos forman parte de la matriz extracelular orgánica; no obstante, se ha demostrado que los biofilms pueden contener una capa interna inorgánica compuesta por  $\text{CaCO}_3$  (Oppenheimer – Shaanan et al. 2016)

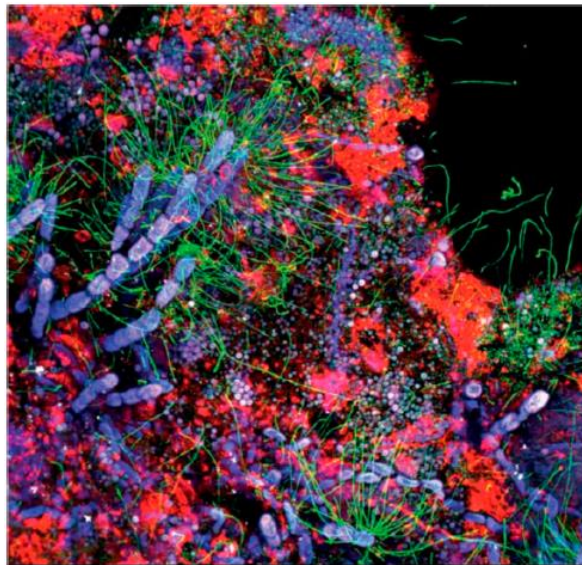


Figura 3: Tinción fluorescente de un biofilm. Verde: Ácidos nucleicos teñidos con SybrGreen; rojo: Lectina acoplada a fluoróforo Alexa568 (AAL-Alexa568); azul: Autofluorescencia de algas (Clorofila A); violeta/blanco: Autofluorescencia de cianobacterias. Imagen tomada de Flemming 2016. doi: 10.3390/microorganisms4040041

Los beneficios de esta matriz superan el gran costo energético que conlleva su producción (Saville et al. 2011). Una vez generada, las bacterias dentro de un biofilm pueden crear un hábitat que provee protección, acumulación de nutrientes y altera las propiedades físico químicas del ambiente y las interacciones entre los organismos incluidos. Al mismo tiempo, se genera una organización

espacial a partir de la cual pueden derivar gradientes muy marcados de nutrientes, interacciones o moléculas de señalización. Las diversas funciones atribuidas a la matriz extracelular son detalladas en la tabla 1. En ciertos casos, propiedades emergentes de la matriz tienen su correlato en la macroescala como los biofilms presentes en la rizosfera, los cuales cumplen un rol esencial en la cohesión de las partículas de suelo (Flemming et al. 2016). La formación de la matriz es un proceso dinámico que depende de la disponibilidad de nutrientes, la síntesis y secreción de material extracelular, el estrés hidrodinámico, la competencia con otros microorganismos y la depredación por protozoos.

Función	Importancia para el biofilm	Componentes involucrados
Adhesión	Permite la colonización inicial de la superficie biótica o abiótica por células planctónicas y adherencia a largo plazo del biofilm	Polisacáridos, proteínas, ADN, moléculas anfipáticas
Agregación bacteriana	Permite la asociación entre células, la inmovilización temporal de poblaciones bacterianas, el desarrollo de altas densidades bacterianas y reconocimiento célula-célula	Polisacáridos, proteínas y ADN
Cohesión del biofilm	Forma una matriz polimérica hidratada que media la estabilidad mecánica del biofilm y, a través de las SPE, determina la arquitectura del biofilm, así como la comunicación célula-célula	Polisacáridos neutros y cargados, ADN y proteínas como lectinas y fibras amiloides
Retención de agua	Mantiene un microambiente altamente hidratado permitiendo la tolerancia a la desecación en ambientes con estrés hídrico	Polisacáridos hidrofílicos y posiblemente proteínas
Barrera protectora	Confiere resistencia contra los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del hospedador, tolerancia a varios agentes antimicrobianos como los antibióticos, evita el daño oxidativo contra algunas enzimas, protege contra la depredación por protozoos y confiere resistencia a bacteriófagos (Price y Chapman. 2018)	Polisacáridos y proteínas

Adsorción de compuestos orgánicos	Permite la acumulación de nutrientes y la adsorción de xenobióticos	Polisacáridos y proteínas cargadas o hidrofóbicas
Adsorción de compuestos inorgánicos	Promueve la formación de la malla de polisacárido, intercambio iónico, formación de depósitos minerales y acumulación de iones metálicos tóxicos	Proteínas y polisacáridos cargados con sustituyentes como fosfatos o sulfatos
Actividad enzimática	Permite la digestión de macromoléculas exógenas para la obtención de nutrientes y la degradación de componentes estructurales de la matriz permitiendo la dispersión de células del biofilm	Proteínas
Fuente de nutrientes	Provee una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo utilizable por la comunidad residente	Potencialmente todas las SPE
Intercambio de información genética	Facilita la transferencia horizontal de genes	ADN
Dador o aceptor de electrones	Permite la actividad redox	Proteínas (por ejemplo aquellas que forman nanocables, <i>pili</i> , citocromos) y posiblemente sustancias húmicas
Exportador de componentes celulares	Libera contenidos celulares como consecuencia del recambio metabólico	Vesículas de membrana cargadas con ácidos nucleicos, enzimas, lipopolisacáridos y fosfolípidos
Depósito de energía	Almacena exceso de carbono en situaciones de desbalance carbono-nitrógeno	Polisacáridos
Anclaje de enzimas	Conlleva a la acumulación, retención y estabilización de enzimas a través de sus interacciones con el polisacárido	Polisacáridos y enzimas

Tabla 1: Recopilación de las funciones atribuidas a las SPE presentes en los biofilms de numerosas bacterias Gram negativas y positivas. Tomado y modificado de Flemming et al. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2415

## Polisacáridos

Los polisacáridos son el componente principal de la matrix extracelular (Frølund et al. 1996; Wingender et al. 2001). En general son moléculas largas, lineales o ramificadas con un peso molecular de entre 0.5 a 2 MDa. Proveen integridad estructural y se las ha relacionado con la adhesión célula-célula, colonización, resistencia a antibióticos y protección contra los mecanismos de defensa del hospedador y la desecación por su carácter higroscópico (Robertson et al. 1992).

Los polisacáridos pueden ser homopolímeros o heteropolímeros. Dentro de los primeros se pueden encontrar los glucanos y fructanos producidos por estreptococos en los biofilms de la cavidad bucal.



Otros ejemplos son la celulosa producida por *Rhizobium spp* y los poli-N-acetilglucanos producidos por *S. aureus* y *S. epidermidis* (Flemming y Wingender 2010). Los heteropolisacáridos consisten en una mezcla de azúcares neutros y cargados. Pueden contener sustituyentes inorgánicos u orgánicos que modifican en gran medida sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. En este grupo se encuentran el polisacárido *Pel* de *P. aeruginosa* compuesto por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, el polisacárido secretado por *Listeria monocytogenes* compuesto por N-acetilmanosamina decorado en las terminaciones con residuos de galactosa. Debido al tipo de azúcares y sustituyentes presentes, los polisacáridos pueden tener carga. Las cargas negativas deben su presencia a los ácidos urónicos y en algunos casos residuos piruvilados o, en raras ocasiones, sulfatados. Dentro de este tipo de polisacáridos se encuentran el alginato producido por *P. aeruginosa*, el xantano producido por *Xanthomonas campestris* y el polisacárido ácido de *Rhizobium* compuesto por glucosa, galactosa y ácido glucurónico (descrito en más detalle más adelante) (Jennings et al. 2015; Köseoğlu et al. 2015; Skorupska et al. 2006).

Se ha observado que en muchos de los polisacáridos que contienen N-acetilglucanos, los residuos hexosamínicos se encuentran parcialmente desacetilados tras su síntesis. En ambientes ácidos, los grupos amino expuestos se protonan resultando en polisacáridos policatiónicos los cuales actúan como factores de virulencia. Dentro de este grupo se encuentra por ejemplo el galactosaminogalactano producido por *Aspergillus fumigatus* (Ostapska y Sheppard. 2018).

## Proteínas

La matriz del biofilm puede contener una gran cantidad de proteínas las cuales pueden superar el contenido de polisacárido en la misma; al menos en lodos activados (Frølund et al. 1996; Conrad et al. 2003). Las proteínas de la matriz contribuyen a la estructura y estabilidad del biofilm. Este tipo de proteínas fueron identificadas inicialmente mediante estudios genéticos en los que mutantes incapaces de expresarlas en el medio extracelular mostraron una reducción en la formación de biofilm y arquitecturas aberrantes del mismo (Fong et al. 2015). Se pueden agrupar las proteínas presentes en la matriz en al menos dos categorías distintas: enzimas y proteínas estructurales, grupo dentro del cual se encuentran las fibras amiloides.

### Enzimas

Las enzimas detectadas en la matriz del biofilm suelen estar relacionadas con la degradación de biopolímeros. Dentro de los sustratos se pueden encontrar polímeros hidrosolubles (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos), insolubles (celulosa, quitina y lípidos) y partículas orgánicas encapsuladas en la matriz (Wingender et al. 1999). Esto permite a los integrantes del biofilm degradar SPE en moléculas más pequeñas para ser utilizadas como fuente de carbono y energía. En algunos casos, las SPE estructurales pueden ser degradadas por estas enzimas permitiendo la dispersión de bacterias desde el biofilm. En organismos patógenos, estas enzimas funcionan como factores de virulencia actuando sobre los mecanismos de defensa del hospedador.

Las enzimas extracelulares suelen anclarse a la matriz del biofilm a través de interacciones de diversos tipos con el polisacárido, como por ejemplo puentes de hidrógeno (Wingender et al. 1999 & 2002). Esto permite mantener la actividad enzimática cerca de las células provocando que la distancia de difusión de los productos sea menor. Además, se ha visto que la interacción con polisacáridos estructurales otorga resistencia térmica y a proteólisis (Skillman et al. 1999).

### Proteínas estructurales

Las proteínas no enzimáticas de la matriz como las proteínas de unión a polisacáridos (lectinas) extracelulares y asociadas a la superficie bacteriana están relacionadas con la formación y estabilización de una matriz de polisacárido y constituyen un nexo entre la bacteria y las SPE. Las lectinas serán descritas en mayor profundidad más adelante. Por otro lado, los componentes proteicos accesorios como los *pili*, las fimbrias y los flagelos pueden actuar también como componentes estructurales a través de su interacción con otros componentes de la matriz extracelular (Van Schaik et al. 2005; Zogaj et al. 2001).

Otro tipo de proteínas estructurales presentes en los biofilms son las fibras amiloides. Las bacterias utilizan este tipo de proteínas en procesos relevantes para el crecimiento y la supervivencia en el ambiente. Dentro de esos procesos se encuentran la diferenciación morfológica de bacterias filamentosas, la adhesión a tejidos del hospedador, la inactivación de compuestos tóxicos, el transporte de electrones y la formación del andamiaje de la matriz del biofilm (Taglialegna et al. 2016). El ejemplo más estudiado de fibras amiloides involucradas en biofilms son las fibras *curli* de *E. coli*. La producción de *curli* fue descrita también en *Salmonella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* (Zogaj et al. 2003). No obstante, los genes que codifican para proteínas con homología al sistema *curli* también se han descrito en *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Thermodesulfobacteria* (Dueholm et al. 2012).

Fibras amiloides con similitud estructural y funcional al *curli* forman parte de la matriz del biofilm de bacterias del género *Pseudomonas* y son llamadas fibras *Fap* (Dueholm et al. 2013). Las mismas facilitan el anclaje a superficies abióticas y refuerzan la estructura del biofilm. Se ha demostrado que dichas fibras son capaces de unir metabolitos extracelulares como moléculas del quórum sensing y reguladores redox, modulando su liberación cuando es requerida. Algunos genes con homología a los sistemas *Fap* están presentes en *Beta*, *Gamma* y *Delta Proteobacteria*. Otros ejemplos de fibras amiloides también fueron descritos en bacterias Gram positivas. En este grupo se encuentran las fibras *Tas* de *B. subtilis* y *Bacillus cereus*, los PSM (*phenol soluble modulines*) y *Bap* (*Biofilm associated protein*) en *S. aureus* y la adhesina P1 de *Streptococcus mutans* (Taglialegna et al. 2016); siendo estas dos últimas proteínas de superficie con propiedades amiloidgénicas.

### **Otros componentes (surfactantes, lípidos y agua)**

Como se describió, las SPE suelen ser compuestos hidrofílicos altamente hidratados (ADNe, polisacáridos y proteínas). No obstante, la presencia de grupos metil y acetilo en el polisacárido de una especie de *Rhodococcus* sp. le confieren características hidrofóbicas que le permiten colonizar hojas cerosas (Neu et al. 1992). También se ha descrito que la matriz extracelular puede contener lípidos (Conrad et al. 2003). Los lipopolisacáridos son componentes clave en la adherencia a superficies para algunas especies (Flemming & Wingender. 2010). Otras SPE con propiedades tensioactivas incluyen la surfactina, viscosina y emulsano, capaces de dispersar sustancias hidrofóbicas y dejarlas biodisponibles. Los biosurfactantes pueden tener actividad antibacterial y antifúngica además de ser importantes para la adherencia bacteriana a gotas de aceite (Ron y Rosenberg. 2001). Aquellos que son producidos por microorganismos en la interfaz aire-agua tienen un rol importante en modular la tensión superficial del agua permitiendo el intercambio gaseoso entre los océanos y la atmósfera (Leck et al. 2005).



## ADN extracelular (ADNe)

Los primeros reportes de ADN extracelular surgieron en la década del 50 y describieron al mismo como un “limo/baba/lodo” que rodeaba las bacterias y que promovía la formación de películas en cultivos líquidos (Catlin 1956; Catlin y Cunningham 1958). No fue hasta el año 2002 que se relacionó por primera vez la presencia de ADNe con la estructura del biofilm. En ese estudio se encontró que el ADNe constituía un porcentaje considerable de la matriz del biofilm de *P. aeruginosa* y que el tratamiento con ADNasa era capaz de dispersar completamente las células de la superficie (Whitchurch et al. 2002). Si bien se ha encontrado que el ADNe compone el biofilm de muchas especies, dicha presencia tendría indicios de ser especie-específica. Por ejemplo, los biofilms de *Staphylococcus epidermidis* contienen un bajo porcentaje de ADNe mientras que en *Staphylococcus aureus* es un componente mayoritario (Izano et al. 2008)

A través de su unión a proteínas, polisacáridos y metabolitos, se ha relacionado al ADNe con diversas funciones como ser reservorio para el intercambio genético, modificar las propiedades de superficie de las bacterias, colaborar en la adhesión y agregación, ser un reservorio de carbono, nitrógeno y fósforo, otorgar estabilidad mecánica y estructural al biofilm (Das et al. 2013), protege contra los mecanismos de defensa del hospedador y antibióticos, etc. (Okshevsky et al. 2015).

Al día de la fecha se desconoce el origen exacto del ADNe ya que en ciertos organismos es similar o idéntico al ADN cromosomal mientras que en otros es sustancialmente distinto. Los mecanismos a través de los cuales el ADN se secreta al medio extracelular pueden estar relacionados con esas diferencias (Jakubovics et al. 2013). Se ha propuesto que la liberación de ADN en bacterias Gram positivas y negativas podría ocurrir a través de lisis de una fracción de la población mediada por mecanismos dependientes e independientes del “quórum sensing” los cuales se activan temprana y tardíamente en fase exponencial, así como en estacionaria temprana (Price-Whelan et al. 2006). La forma en la que las bacterias liberan ADN al medio extracelular parece variar entre distintos géneros. Estos podrían incluir secreción activa a través de sistemas de secreción tipo 6, vesículas de membrana, fratricidio, etc.). Además, la utilización del ADN y su rol en la estructuración y mantenimiento del biofilm también sería diversos; en algunos casos se propone que estaría involucrado en la adhesión inicial, en otros sería crucial para el mantenimiento de la arquitectura del biofilm y en otros pareciera no ser necesario (Ibáñez de Aldecoa et al. 2017).

## Componentes inorgánicos

La primera observación de mineralización, que estuvo relacionada a infecciones bacterianas, se realizó en la década de 1990. Stickler y colaboradores detectaron la presencia de estruvita y apatita en catéteres colonizados por biofilms de bacterias del género *Proteus* y *Providencia* (Stickler et al. 1998). El estudio del patógeno oportunista *P. aeruginosa* permitió determinar el depósito de cristales de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) asociado a un biofilm sentando las bases de la mineralización como un importante proceso acoplado a este estilo de vida (Li et al. 2015). Estudios posteriores permitieron establecer que los depósitos inorgánicos como componente esencial de la matriz extracelular se debían a la presencia y regulación del gen de la ureasa (Li et al. 2016).

Los minerales alteran drásticamente los coeficientes de difusión con respecto a componentes orgánicos. Por consiguiente, podrían limitar el grado en el que penetran las sustancias tóxicas dentro de un biofilm (Dorrell. 1999; Kajander et al. 1998). Esto se vio reflejado en estudios utilizando cepas ureasa<sup>+</sup> y ureasa<sup>-</sup> de *Proteus mirabilis*. Aquellas bacterias deficientes en la ureasa fueron más

susceptibles al antibiótico ciprofloxacina. En *Bacillus subtilis* la mineralización del biofilm otorgó mayor resistencia a etanol y ensayos con fluoresceína permitieron establecer que la difusión de la sonda estaba limitada a ciertos sectores del biofilm cuando éste se encontraba mineralizado (Keren-Paz y Kolodkin-Gal. 2020).

En conclusión, cada vez hay más evidencia que sugiere que los depósitos de calcita en los biofilms permitirían a los mismos no solo contar con una arquitectura más resistente y robusta sino que además, contribuirían a la resistencia a antibióticos.

## Sistemas de Secreción

Los mecanismos de respuesta al medio ambiente que utilizan las bacterias no implican únicamente procesos adaptativos intracelulares. Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de secreción de moléculas efectoras que le permiten adaptarse y modificar el ambiente en pos de favorecer la colonización del nicho. Dentro de estos sustratos efectoras se encuentran pequeñas moléculas, proteínas y ADN los cuales cuentan cada uno con sistemas específicos de transporte al medio extracelular. Estos mecanismos presentan en algunos casos similitudes entre bacterias Gram negativas y Gram positivas; a los fines de introducir los conceptos abarcados en esta tesis se explicarán únicamente los sistemas de translocación de proteínas relevantes para bacterias Gram negativas, las cuales cuentan con una membrana interna y una membrana externa y el espacio entre ellas denominado periplasma.

### Secreción a través de la membrana plasmática

Los sistemas de secreción general (Sec por sus siglas en inglés) y el sistema de doble arginina (Tat, por *twin arginine translocation* en inglés) son los sistemas de transporte bacterianos más comúnmente usados para la translocación de proteínas a través de la membrana plasmática (Natale et al. 2008). La mayoría de las proteínas transportadas por estos sistemas de secreción permanecen en el periplasma o en la membrana interna. No obstante, en bacterias Gram negativas las proteínas pueden permanecer retenidas en estos compartimientos o ser secretadas al medio extracelular con ayuda de otros sistemas de secreción.

### Sistema Sec

El sistema de secreción Sec transporta principalmente proteínas desplegadas. Este sistema consiste de tres partes: una proteína que reconoce el sustrato a transportar, una proteína motora y un canal de transporte integrado en la membrana llamado SecYEG translocasa (Papanikou et al. 2007). En algunas bacterias Gram negativas, se suelen producir además proteínas accesorias secretadas por este sistema que asisten en la secreción de proteínas específicas.

La señal de secreción de este sistema es una secuencia hidrofóbica en la región N terminal de aproximadamente unos 20 aminoácidos la cual a su vez contiene tres regiones: un extremo amino terminal cargado positivamente, un núcleo hidrofóbico y un extremo C terminal polar (Papanikou et al. 2007). Las proteínas cuyo destino es el periplasma o el medio extracelular secretadas por este sistema contienen secuencias señales SecB mientras que aquellas cuyo destino es la membrana interna contiene señales SRP (*Signal Recognition Particle* por sus siglas en inglés).

### Vía SecB

Muchas de las proteínas cuyo destino es el periplasma o el medio extracelular contienen una secuencia de reconocimiento para la proteína SecB. Esta proteína sirve como una chaperona,

uniéndose a proteínas previo a su secreción e impidiendo su plegamiento (Randall et al. 2002). SecB presenta el sustrato a SecA, una proteína multifuncional que guía las proteínas al canal SecYEG y que además funciona como una ATPasa para proveer la energía necesaria para el transporte (Hartl et al. 1990). Previo al transporte por el canal, una proteasa cliva la señal de reconocimiento de SecB y la proteína una vez secretada se pliega en el periplasma (Mogensen et al. 2005).

### Vía SRP

El sistema Tat no reconoce proteínas desplegadas. Este sistema de secreción es sumamente importante ya que transloca principalmente proteínas ya plegadas (Robinson et al. 2004) que cuentan con modificaciones post traduccionales, como por ejemplo factores redox, los cuales se sintetizan únicamente en el citoplasma (Berks et al. 2005).

La vía de secreción Tat consiste de 2 o 3 subunidades: TatA, TatB (ambas combinadas en una sola proteína en Gram positivas) y TatC (Sargent et al. 1999, Pop et al. 2002). TatB y TatC unen el péptido señal y luego reclutan a TatA que forma el canal que atraviesa la membrana. El péptido señal para este tipo de proteínas contiene un par de argininas gemelas en un motivo S-R-R en el extremo N terminal de la proteína plegada (Müller 2005).

Los restantes sistemas de secreción proteica bacteriana se pueden clasificar de distintas formas. A los efectos de esta tesis se va a utilizar la clasificación propuesta por Christie en 2019 (Christie 2019). Este sistema de clasificación se centra en agrupar los sistemas de secreción en base al sitio de la membrana donde se anclan sus componentes y el sitio donde ingresa el sustrato de secreción. Esto da lugar a 4 clasificaciones posibles: los sistemas que se ensamblan en la membrana externa de bacterias Gram negativas, los que se ensamblan en ambas membranas y secretan sustratos desde el periplasma, los que se ensamblan en ambas membranas y transportan sustratos desde el citosol y los sistemas de secreción proteica que pertenecen a bacterias Gram positivas, los cuales no van a ser explicados.

### **Sistemas de Transporte de Clase 1: Ensamblaje en la membrana externa y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular**

El transporte en estos sistemas de secreción cuenta de dos pasos: el primero donde el sustrato llega al periplasma vía Sec o Tat y el segundo en los que estos sistemas los exportan a través de la membrana externa. Esta clase comprende los siguientes sistemas de secreción. Sistemas de secreción tipo 5, el sistema de biogénesis del *pilus* (también conocido como chaperona – acomodador) y los sistemas de secreción tipo 8 (Figura 4).

#### Sistema de Secreción tipo 5 (SSTV):

Los SSTV, comúnmente denominados autotransportadores, son sistemas donde el sustrato a secretar y el canal de secreción se encuentran fusionados en un solo polipéptido. Como resultado de esto, un único polipéptido puede dirigir su propia secreción a través de la membrana externa (Costa et al. 2015).

Los polipéptidos contienen en general un péptido señal en el extremo N terminal para la translocación a través del sistema Sec (van Ulsen et al. 2014), un dominio extracelular o dominio pasajero, una región conectora o “linker” y un dominio translocador o ancla de estructura de barril  $\beta$ . Algunos sustratos de este sistema contienen un dominio de proteasa que cliva el dominio pasajero una vez que fueron transportados a la superficie celular. Los SSTV se agrupan a su vez en 5

categorías distintas basadas en variaciones estructurales del dominio pasajero o del dominio ancla (Leo et al. 2012; Christie 2019). Un mecanismo alternativo de secreción de los autotransportadores sugiere que los sustratos son translocados primero al periplasma a través del mecanismo general de secreción donde son reconocidos por chaperonas periplasmáticas. El dominio ancla es entonces reclutado por el complejo Bam ( $\beta$ -barrel assembly machinery) el cual inicia pero no completa la inserción del dominio ancla en la membrana externa. Como consecuencia se forma un canal híbrido compuesto por el dominio ancla y el barril  $\beta$  de BamA en una conformación abierta. Luego, el dominio pasajero se une al complejo Bam y es enebado a través del barril  $\beta$  híbrido-BamA. Una vez que el dominio pasajero se encuentra en el medio extracelular, ciertos residuos polares grandes o básicos expuestos (del dominio pasajero) estimulan la liberación del dominio ancla de BamA y el cierre del barril beta (Kang'ethe et al. 2013). Finalmente, el dominio pasajero adquiere su estructura y permanece atado al dominio ancla del barril beta o es clivado por una proteasa y liberado al medio extracelular (Bernstein 2019).

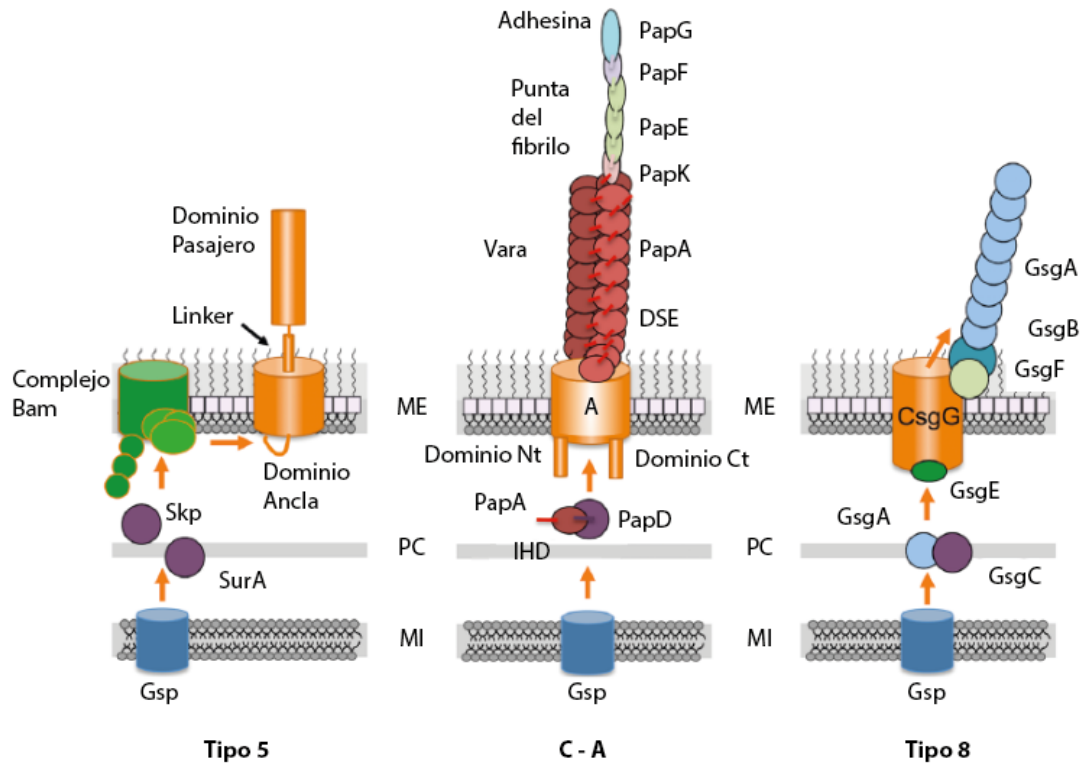
#### Sistema de Biogénesis del *pilus* chaperona - acomodador (C-U en inglés):

El sistema C-U media el ensamblaje de *pili* o fimbrias en la superficie bacteriana. Estas fimbrias median la adhesión de la bacteria a componentes eucariotas entre otras funciones (Hospenthal et al. 2019; Christie. 2019). El caso mejor estudiado es el *pili* tipo I de *Enterobacteriaceae* y el Pap *pili* generado por *E. coli* uropatogénica (Flores-Mireles et al. 2015). Este tipo de *pili* se dispone como una vara helicoidal compuesta por cientos de subunidades y una punta flexible, llamada fibrilo, compuesta por varias subunidades en una o varias copias (Hung et al. 2002). El ensamblaje comienza con la translocación de subunidades de *pilus* al periplasma a través del sistema Sec en donde las subunidades adquieren su plegamiento y forman puentes disulfuro para luego interactuar con una chaperona específica (Jacob-Dubuisson et al. 1994; Sauer et al. 1999).

El complejo chaperona *pilus* es reclutado a la membrana externa en donde une al acomodador, un poro con estructura de barril  $\beta$  de 24 hebras compuesto por un dominio N terminal, dos dominios C terminal y un dominio tapón (Nishiyama et al. 2005; Remaut et al. 2008). El acomodador cataliza el intercambio de chaperona-subunidad por subunidad-subunidad en un proceso que se llama intercambio de cadenas donantes (Christie. 2019).

#### Sistema de secreción tipo 8 (SSTVIII):

Los sistemas de secreción tipo 8 median el ensamblaje de fibras amiloides (*curli*). Estos sistemas se suelen encontrar principalmente en Proteobacteria y Bacteroidetes (Bhoite et al. 2019; Dueholm et al. 2012). Los *curli* son fibras enrolladas de aproximadamente 2 a 5 nm de grosor que se autoensamblan en un proceso dependiente de nucleación (Hung et al. 2013). Las fibras *curli* están compuestas mayormente por la proteína mayoritaria CsgA, exportada hacia la membrana externa desplegada y luego ensamblada en fibras con la ayuda de la proteína minoritaria en las fibras *curli* CsgB (Hung et al. 2013). CsgA tiene una señal de secreción SecYEG y un dominio amiloide en el extremo C terminal. CsgB contiene un dominio que le permite el anclaje a la pared celular; tras su secreción nuclea la polimerización de CsgA. Las subunidades de *curli* son secretadas por un aparato que consiste en dos factores accesorios solubles (CsgE y CsgF) y la lipoproteína transportadora CsgG que se localiza en la membrana externa (Costa et al. 2015).



IHD - Intercambio de hebra donante  
 Gsp - Sistema de secreción general  
 C - A - Chaperona - Acomodador

Figura 4: Sistemas de Transporte de Clase 1: Ensamblaje en la membrana externa y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular. Tomado de Christie et al. 2019. Doi: 10.1007/s10930-019-09862-3

### Sistemas de Transporte de Clase 2: Ensamblaje en ambas membranas de las bacterias didermas y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular

Contrario a los sistemas de clase 1, estos se ensamblan a lo largo de ambas membranas de la célula bacteriana lo que les permite utilizar para el transporte de sustratos fuentes de energía accesibles en la cara citoplasmática de la membrana interna, como la hidrólisis de ATP o la fuerza protón motriz. No obstante, al igual que los de clase 1, los sustratos son transportados desde el periplasma hacia el medio extracelular atravesando la membrana externa. Dentro de esta clase de sistemas de secreción se pueden encontrar los sistemas de secreción tipo 2 y los sistemas de ensamble del *pilus* tipo 4 así como los sistemas de secreción tipo 9 (Figura 5).

#### Sistemas de secreción tipo 2 (SSTII) y sistemas de ensamble de *pilus* tipo 4 (PT4):

Los SSTII son complejos que involucran alrededor de 12 a 15 componentes (Korotkov et al. 2019). Los componentes principales de este sistema incluyen: una ATPasa citoplasmática (GspE) que provee la energía para la translocación del sustrato, una plataforma inserta en la membrana interna compuesta por GspC y otros elementos integrales, un "pseudopilus" compuesto por GspC capaz de extenderse y retraerse y el complejo secretor compuesto por 15 copias de la secretin GspD y la lipoproteína GspS (Christie. 2019).

La principal diferencia entre los SSTII y el PT4 es que, en estos últimos, el *pilus* se extiende varios micrones pasada la superficie bacteriana y luego se retrae (McCallum et al. 2019) (Figura 4). La extensión y retracción genera una considerable fuerza mecánica que le permite al PT4 promover el movimiento de la bacteria a través de superficies bióticas y abióticas en una trayectoria espasmódica conocida como movilidad tipo twitching (Craig et al. 2019). La retracción del PT4 también permite atraer moléculas extracelulares como ADN y bacteriófagos al periplasma para iniciar la transformación y las infecciones por fagos (Craig et al. 2019; Ellison et al. 2018). Los PT4 también median la adherencia de la bacteria lo que resulta en la formación de microcolonias o biofilms (Craig et al. 2019).

#### Sistema de secreción tipo 9 (SSTIX):

Los SSTIX fueron descritos recientemente y se encuentran en el *phylum Bacteroidetes* en los que cumplen la función de secreción de proteínas y de movilidad tipo *gliding* (Sato et al. 2010; McBride. 2019). Los sustratos de los SSTIX poseen un dominio C terminal de entre 70 y 100 aminoácidos necesarios para la translocación a través de la membrana externa (Seers et al. 2006). La secreción por este sistema y la movilidad tipo *gliding* requieren alrededor de 10 proteínas, aunque hay diferencias entre las diferentes especies en el número de copia de las subunidades (McBride. 2019). La maquinaria de secreción consiste de dos subunidades que atraviesan la membrana interna PorL y PorM (llamados Gld en sistemas de motilidad tipo *gliding*). SprA formaría el canal de la membrana externa y estaría regulado por proteínas de la membrana externa, incluidas PorN, PorP, PorK y PorV. Varias proteínas interactuarían con PorV; se cree que el complejo formado modifica las proteínas secretadas, por ejemplo, removiendo el dominio C terminal y anclándolas a la superficie celular (Glew et al. 2017). Este complejo funcionaría de manera análoga a las sortasas presentes en bacterias Gram positivas.

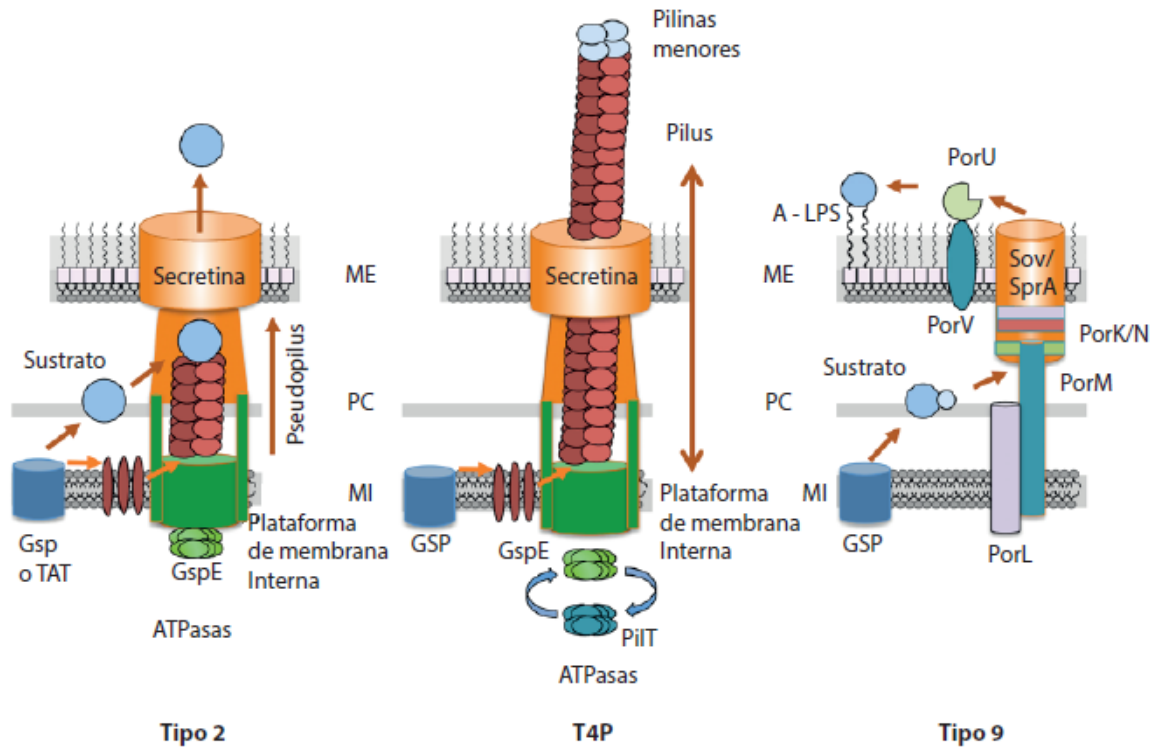


Figura 5: Sistemas de Transporte de Clase 2: Ensamblaje en ambas membranas de las bacterias didermas y transporte de sustratos desde el periplasma al medio extracelular Tomado de Christie et al. 2019. Doi: 10.1007/s10930-019-09862-3.

### Sistemas de Transporte de Clase 3: Sistemas de secreción en un solo paso. Atraviesan la membrana celular completa y translocan sustratos sin un intermediario periplasmático

Los sistemas de clase 3 se ensamblan como canales que atraviesan la membrana interna, el periplasma y la membrana externa, a través de los cuales los sustratos son transportados en un solo paso desde el citoplasma hacia la superficie bacteriana. Son dependientes de una o más ATPasas para dirigir la translocación. Dentro de esta clasificación se pueden encontrar los sistemas de secreción tipo 1, 3, 4 y 6 (Figura 6).

#### Sistema de secreción tipo 1 (SSTI):

Los SSTI están filogenética y funcionalmente relacionados con la superfamilia de transportadores ABC que importan o exportan pequeñas moléculas (Higgings et al. 1986). En muchos casos, los sustratos de este sistema se definen por la presencia de repeticiones de nonapéptidos llamados RTX (repeats in toxins) que siguen el consenso GGxGxDxUx donde X puede ser cualquier aminoácido y U representa un aminoácido hidrofóbico voluminoso (Létoffé y Wandersman. 1992; Lecher et al. 2012). Los motivos RTX unen calcio y están implicados en la adquisición de plegamiento en el medio extracelular (Sánchez-Magraner et al. 2007; Bumba et al. 2016). Los dominios RTX se encuentran próximos a la secuencia C terminal de secreción. Sin embargo, todavía se debate si la señal de secreción consiste en un código lineal específico, un motivo estructural o una combinación de ambos (Holland et al. 2016). En particular y se discutirá más adelante, las proteínas Rap secretadas por el SSTI PrsDE en *Rhizobium leguminosarum* no parecen presentar señales o repeticiones de nonapéptidos (esta tesis).

Los SSTI tienen 3 componentes estructurales: un transportador ABC (ATP binding cassette) en la membrana interna, una proteína de fusión de membrana (MFP) (Membrane fusion protein) que atraviesa la membrana interna y conecta con la proteína de membrana externa (OMP) (Outer membrane protein) que presenta una estructura de barril  $\beta$  formando un poro en la membrana externa (Thomas et al. 2014). El transportador ABC tiene diversas funciones, en principio cataliza ATP para proveer al sistema de energía para translocar al sustrato, interactuar con la MFP y participar además en el reconocimiento del sustrato (Létoffé y Wandersman. 1996). La MFP se asocia con el transportador ABC en la membrana interna y se extiende a lo largo del periplasma para conectar con el OMP. Además, la región que se inserta en la membrana interna de la MFP localizada en el extremo N terminal juega un rol en el reconocimiento del sustrato (Green y Meccas. 2016). El sustrato proteico atraviesa la membrana externa a través del poro formado por el OMP en su forma desplegada. Llamativamente, los SSTI a menudo usan la proteína multipropósito TolC como OMF (Delepelaire 2004). Esta proteína que también es utilizada para la exportación de moléculas de otra naturaleza química es reclutada hacia la MFP una vez que ésta y el transportador ABC contactan el sustrato (Balakrishnan et al. 2001).

#### Sistemas de Secreción tipo 3 (SSTIII):

Los SSTIII contribuyen al ensamblado de dos estructuras filogenéticamente relacionadas, el inyector y el flagelo (Christie. 2019). En consecuencia, la superfamilia de los SSTIII está relacionada con la translocación de productos hacia células eucariotas y con los aparatos de motilidad y quimiotaxis. Los sustratos de estos sistemas tienen pequeñas secuencias de translocación en su extremo N - terminal (McDermott et al. 2011) o estructuras secundarias en el ARN codificada en los extremos 5' de los genes efectores (Anderson y Schneewind. 1997; Niemann et al. 2013). La translocación de efectores de los inyector y de los sustratos para el ensamblado del flagelo ocurren a través de una combinación de procesos dependientes e independientes de unión a chaperonas y controles espacio-temporales mediados por diversas señales que actúan tanto a nivel transcripcional como post-traduccionales (Diepold et al. 2015). En general los SSTIII consisten de un cuerpo basal citoplasmático, el aparato de exportación que atraviesa ambas membranas y el complejo aguja extracelular o el flagelo (Lara-Tejero y Galán. 2019). El flagelo además está compuesto por el *estator* y otros componentes en la membrana interna y externa que permiten el movimiento rotatorio en respuesta a señales ambientales (Diepold et al. 2015). Para una descripción mecánica en mayor profundidad ver Costa et al. 2015 y Christie 2019.

#### Sistemas de Secreción tipo 4 (SSTIV):

Los SSTIV se componen de un mínimo de 12 subunidades (VirB1 a VirB11 y VirD4). Están compuestos por dos grandes ensamblajes, un complejo de membrana externa y un complejo de membrana interna que se encuentran conectados por un tallo o cilindro central (Christie. 2019). Una gran subfamilia de SSTIV sirve para la exportación de ADN intracelular en un proceso llamado conjugación. Los sistemas de conjugación son ubicuos en bacterias e incluso en algunas especies de arqueas. Además de estar involucrados en la movilización de elementos genéticos, la maquinaria de conjugación permite la translocación y el reconocimiento de relaxasas y sustratos unidos covalentemente al ADN (Lang y Zetchner. 2012; Redzej et al. 2013). Las relaxasas coordinan la transferencia de ADN al procesar las secuencias de origen de transferencia en los sustratos doble cadena dando lugar a los intermediarios simple cadena (llamados relaxasa-hebra T). Además, cuentan con señales de translocación necesarias para su reclutamiento en el sitio de ensamblaje del



SSTIV mientras dirigen la hebra T a través del canal de transferencia hacia las células receptoras por un mecanismo dependiente de contacto directo célula - célula (de la Cruz et al. 2010). Además de la secreción de ADN o proteínas al medio extracelular, otras subfamilias de SSTIV permiten el transporte de sustancias tóxicas a la célula receptora o la incorporación de ADN desde el medio extracelular (Christie. 2019).

#### Sistemas de Secreción tipo 6 (SSTVI):

Los SSTVI pertenecen a la familia de sistemas de inyección contráctil los cuales introducen efectores en las células blanco utilizando un mecanismo tipo resorte (Zoued et al. 2014; Taylor et al. 2018). Se les ha asignado dos tipos de funciones. Por un lado, algunos SSTVI transportan proteínas efectoras a las células eucariotas, contribuyendo a la patogenicidad de la bacteria. Por otro, se ha documentado que están involucrados en la inyección de sustratos tóxicos en bacterias vecinas para ganar una ventaja competitiva, por ejemplo, en el establecimiento del nicho replicativo en el hospedador (Alcoforado et al. 2015; Coyne y Comstock. 2019). Se ha presentado evidencias que sugieren que los SSTVI también funcionarían para la secreción de proteínas al medio extracelular, en particular aquellas que cumplen un rol en la captación de metales (Christie 2019). Los SSTVI están compuestos por alrededor de 20 proteínas filogenéticamente relacionadas con las colas contráctiles de los bacteriófagos pero invertidas, en relación a la envoltura de la bacteria, permitiendo la eyección de efectores desde el interior celular. Los componentes principales incluyen una funda, que envuelve un tubo o aguja. Este tubo se ensambla sobre una plataforma (placa basal) formada por un complejo multi-unidad que ancla la funda y posee, además, una punta en un extremo que atraviesa la membrana de la célula blanco (Figura 5). La placa basal conecta, además, con otro complejo de membrana que se extiende a lo largo de toda la envoltura celular y forma el canal a través del cual el tubo pasa una vez la funda se contrae. La descripción mecánica se explica en más detalle en Christie. 2019.

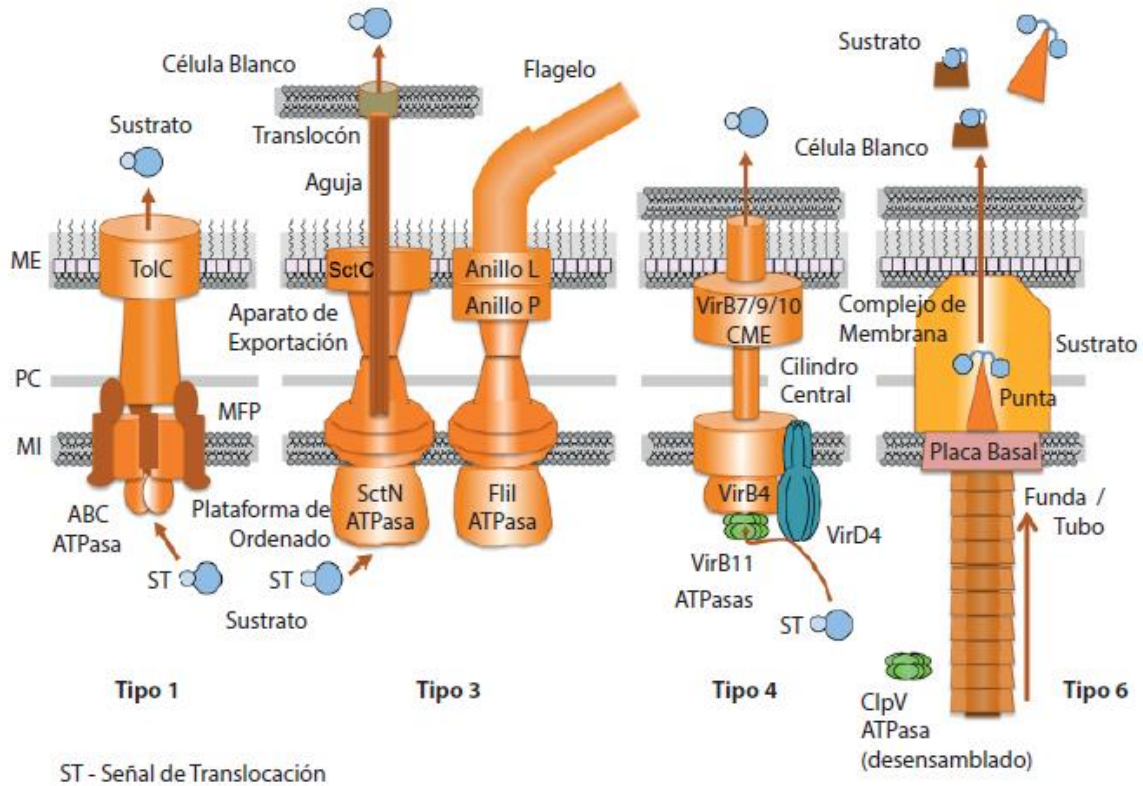


Figura 6: Sistemas de Transporte de Clase 3: Sistemas de secreción en un solo paso. Atraviesan la membrana celular completa y translocan sustratos sin un intermediario periplasmático. Tomado de Christie et al. 2019. Doi: 10.1007/s10930-019-09862-3.

### *Rhizobium leguminosarum*

La familia *Rhizobiaceae* incluye, además del género *Rhizobium*, las bacterias del género *Agrobacterium*, *Shinella* y *Carbophilus*. *Agrobacterium* incluye bacterias formadoras de tumores, así como también bacterias formadoras de nódulos fijadores de nitrógeno; *Carbophilus* no cuenta con bacterias formadoras de nódulos. Una característica de los rizobios pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* es la organización genómica en multireplicones. Más aún, las características fenotípicas distintivas de los rizobios pueden estar codificadas en replicones extracromosomales (RE).

El género *Rhizobium* fue descrito por primera vez en el año 1889 (Frank 1889). La interacción simbiótica entre *Rhizobium* y las leguminosas fue objeto de estudio durante más de un siglo dada su importancia en la agricultura sustentable. Previamente, la mayoría de los microorganismos capaces de nodular en las raíces de las leguminosas eran agrupados en el género *Rhizobium* dentro de las  $\alpha$  Proteobacteria. Los estudios filogenéticos basados en la secuenciación del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal (rARN) dividieron a los rizobios en los siguientes géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (previamente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* y *Azorhizobium* (Hassen et al. 2020).

En *Rhizobium*, *Ensifer* y *Agrobacterium*, casi la mitad del genoma puede encontrarse contenida en RE, algunos incluso involucrados en el crecimiento y la supervivencia de la bacteria. Los RE pueden ser de dos tipos, plásmidos y crómidos. Los RE que contienen genes “esenciales” con secuencia

conservada, contenido de CG similar y uso de codones similares al cromosoma bacteriano se denominan crómidos. Éstos se han propuesto como característica del género y pueden contener secuencias género específicas. En *Rhizobium*, las características fenotípicas de carácter taxonómico se encuentran codificadas en crómidos. Llamativamente, los crómidos contienen genes que son expresados por los rizobios en las raíces de las plantas. Por otro lado, los plásmidos son elementos altamente variables y confieren ventajas adaptativas como la capacidad de nodular y la fijación de nitrógeno en leguminosas; al mismo tiempo pueden ser transferidos entre bacterias (Ormeño – Orrillo et al. 2015).

*Rhizobium leguminosarum* comprende tres biovariedades de rizobios: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* que nodula frijoles del género *Phaseolus*, tribu Phaseolae y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y bv. *viciae* que nodulan leguminosas de tribus completamente diferentes, Trifoliae y Viciae respectivamente. En particular el bv. *viciae* induce nódulos fijadores de nitrógeno en *Pisum*, *Vicia*, *Lens* y *Lathyrus spp.*

*R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 cuenta con el genoma secuenciado y completamente ensamblado. El mismo está comprendido por un cromosoma bacteriano de 5 Mb, un segundo cromosoma anotado como plásmido pRL12 de 870 kb y 5 plásmidos: pRL10 de 480 kb, pRL11 de 680 kb, pRL7 de 150 kb, pRL8 de 140 kb y pRL9 de 350 kb. En conjunto el genoma completo es de 7.75 Mb con un contenido de GC de 60.87%.

### Polisacárido de *Rhizobium*

La superficie bacteriana de los rizobios está compuesta por polisacáridos complejos. Dentro de ellos se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), los polisacáridos capsulares (CPS) y extracelulares (EPS), los antígenos polisacáridicos K (KPS), los glucanos cíclicos (GC) y, para *R. leguminosarum*, polisacáridos neutros de alto peso molecular (PN o glucomanano) y *gel-forming polysaccharide* (GPS) (Frayse et al. 2003; Laus et al. 2006). Los LPS, anclados en la membrana externa, están compuestos por un *core* (o núcleo) oligosacáridico y un antígeno tipo polisacárido. Los antígenos K de los rizobios muestran analogía estructural con los antígenos K del grupo II de *E. coli* y funcionan, en algunos casos, como sustitutos funcionales del EPS (Becker et al. 2005). Los glucanos cíclicos cumplen un rol importante en la adaptación a ambientes hipo-osmóticos y en la infección de la planta, tanto para la simbiosis que implican nódulos determinados como indeterminados (Breedveld et al. 1994; Crespo-Rivas et al. 2009). Los CPS se encuentran íntimamente asociados a la superficie bacteriana; suelen ser polisacáridos neutros o ácidos y su estructura es altamente similar o idéntica a la de los EPS en la mayoría de las especies de rizobios. Contrario a lo que sucede con los CPS, los EPS se encuentran asociados muy débilmente a la superficie bacteriana siendo liberados en grandes cantidades al medio ambiente (Skorupska et al. 2006; Frayse et al. 2003). Si bien la síntesis de EPS y CPS se realiza a partir del mismo grupo de genes, se cree que las diferencias en los substituyentes no glicosídicos serían los factores que definen su destino extracelular (Philip-Hollingsworth et al. 1989, O'Neill et al. 1991).

En bacterias fijadoras de nitrógeno que establecen simbiosis con leguminosas formando nódulos indeterminados, el EPS es indispensable para una infección exitosa de las raíces de la planta (Skorupska et al. 2006). Las mutantes deficientes para la síntesis de EPS en *R. leguminosarum* y *Ensifer meliloti* están afectadas en la invasión y, como consecuencia, en la fijación de nitrógeno. No obstante, en algunas especies los antígenos K pueden reemplazar la funcionalidad del EPS y en otras, ni el antígeno K ni el EPS son necesarios para la nodulación exitosa. En conclusión, a pesar de que el

EPS suele ser esencial para una simbiosis eficiente con nódulos indeterminados, se han observado casos donde el mismo no cumple una función relevante. Los mismos suelen estar asociados a la formación de nódulos determinados (Janczarek. 2011; Acosta-Jurado et al. 2021).

El EPS es un heteropolímero cuya estructura varía al nivel de especie. Las unidades repetitivas están constituidas por un número variable de hexosas y ácidos urónicos conectados por enlaces glicosídicos del tipo  $\alpha$  o  $\beta$ . Pueden ser lineales o ramificados. Además, varios sustituyentes no glicosídicos pueden formar parte del mismo, principalmente, succinato, piruvato o acetato, los cuales contribuyen al carácter ácido de este polisacárido (Frayse et al.; 2003; Spaink et al. 2012; López-Baena et al. 2016)

Como se se mencionó, diferentes cepas de la especie *R. leguminosarum* pertenecientes a las biovariedades *trifolii*, *viciae* y *phaseoli* (actualmente reclasificado *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*) establecen relaciones simbióticas con diferentes hospedadores (*Trifolium*, *Pisum*, *Vicia* y *Phaseolus* spp.). Estas biovariedades producen un EPS con una estructura básica similar pero que varían en los patrones de las modificaciones no azucaradas.

El EPS está compuesto por unidades repetitivas de 8 monosacáridos conteniendo D-glucosa, ácido D-glucurónico y D-galactosa en una proporción 5:2:1, unido mayormente por uniones glicosídicas  $\beta$  1-3,  $\beta$  1-4 y  $\beta$  1-6 y sustituido con grupos acetil (OAc), piruvil (Pyr) y 3-hidroxi butanoil (OHb) (Figura 7) (Janczarek. 2011). La excepción es la cepa *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248 cuyas unidades repetitivas cuentan con una unidad extra de ácido glucurónico y ausencia de las sustituciones con 3-hidroxi butanoilo (Cremers et al. 1991).

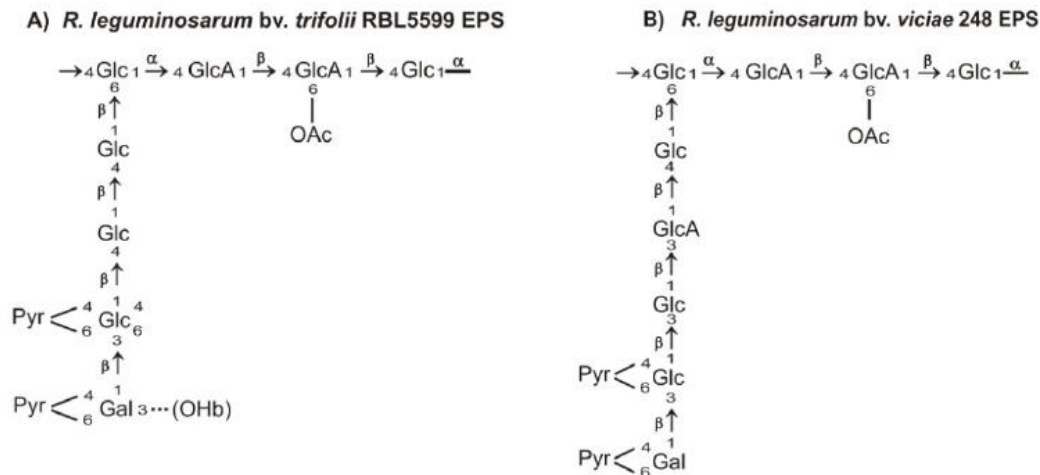


Figura 7: Estructura química de las unidades repetitivas de los EPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y bv. *viciae* 248. Adaptado de Janczarek. 2011. doi:10.3390/ijms12117898.

La síntesis de EPS es llevada a cabo por un complejo multi-proteico localizado en ambas caras de la membrana plasmática. La molécula undecaprenil fosfato, anclada en la cara interna de la membrana interna, es el aceptor de azúcares tanto para la síntesis de EPS como de otros heteropolisacáridos bacterianos. Los nucleótidos difosfo-azúcares sirven como precursores y se unen secuencialmente al aceptor final por la acción de glicosiltransferasas, resultando en la acumulación de subunidades de polisacárido. Finalmente, las subunidades son translocadas a través de la membrana interna

hacia el periplasma por vías de una translocasa tipo Wzx (Whitfield y Paiment. 2003; Liu et al. 1996). La polimerización de unidades repetitivas se encuentra probablemente acoplada a la exportación de la cadena creciente de polímero hacia la superficie bacteriana. Este proceso involucra la actividad de dos proteínas: una polimerasa tipo Wyz y una proteína auxiliar tipo Wzc anclada en la cara periplasmática de la membrana interna (Paulsen et al. 1997; Whitfield y Paiment. 2003).

En *R. leguminosarum*, la gran mayoría de los genes involucrados en la síntesis del EPS se encuentran localizados en una región cromosómica grande, llamada Pss-I, que comprende aproximadamente 30 genes. Esta región se encuentra altamente conservada en los genomas de *R. leguminosarum* secuenciados, aunque diferencias en la organización genómica a raíz de reordenamientos genéticos pueden ser encontrados al nivel de especie (Acosta – Jurado et al. 2021).

Además de los genes *pss* mencionados, otros genes esenciales para la síntesis de EPS, pero no directamente relacionados con el proceso, se encuentran en el cluster de genes Pss-I, dentro de ellos se incluyen *plyA* y los genes *prsDE* que codifican un sistema de secreción tipo 1 (descriptos en más detalle, más adelante) (Król et al. 2007).

#### Sistemas de secreción de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841

Krehenbrink y Downie (2008) identificaron los genes que codifican para SecA (RL4298), SecB (RL0006), SecD (RL0680), SecE (RL1759), SecF (RL2055), SecG (RL2512) y SecY (RL1794) en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, los cuales son suficientes para constituir una maquinaria funcional del sistema de exportación general (*GEP* por sus siglas en inglés). Estos genes están codificados en el cromosoma bacteriano, pero no se encuentran formando parte de operones ni se encuentran cercanos entre ellos. Además, solo se identificó una copia de los genes que codifican para la peptidasa tipo I (RL1510) y tipo II (RL0410) en todo el genoma. Con respecto al sistema de translocación *Tat*, no encontraron copias del gen *tatE* pero sí de *tatA* (RL2046), *tatB* (RL2047) y *tatC* (RL2048), agrupados en un operón. La organización genómica de estos genes es similar en *Agrobacterium tumefaciens*, *R. etli* y *E. meliloti* (*Sinorhizobium*).

Por otro lado, los mismos autores identificaron un sistema de secreción putativo tipo IV y tres sistemas de secreción tipo V o autotransportadores. Finalmente identificaron cuatro sistemas de secreción tipo I: entre ellos tres presentan homología con los transportadores proteicos del tipo AprD (proteasa alcalina) de *P. aeruginosa*: *prsDE* (RL3658 y RL3657), *toaDE* (RL0072 y RL 0071) y *tobDE* (RL0623 y RL0622); y un cuarto con similitud a los transportadores de bacteriocina/lantibióticos *bltDE* (pRL90164 y pRL90165).

#### Sistema de secreción tipo I (SSTI) PrsDE

El SSTI PrsDE fue descrito inicialmente en *R. leguminosarum* bv. *viciae* por Finnie y colaboradores (1997) y en *R. bv. trifolii* por Król y Skorupska (1997). Utilizando en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 8401 una biblioteca de transposones Tn5 y como criterio de selección aquellas cepas transconjugantes que consistentemente no pudiesen secretar la proteína NodO al medio extracelular, identificaron una región génica que comprendía dos genes: *prsD* cuyos homólogos más fuertes eran AprD de *P. aeruginosa* y PrtD de *Erwinia chrysanthemi*, y *prsE* cuyos homólogos son AprE de *P. aeruginosa* y PrtE de *E. chrysanthemi*. Estas proteínas conformarían los componentes del tipo ABC y la MFP respectivamente de un SSTI; además se demostró que eran altamente homólogas con genes involucrados en la secreción de endoglucanasas de *E. meliloti* (*Sinorhizobium*) (Finnie et al. 1997).

Contrario a otros SSTI en los que los tres genes necesarios para el sistema de translocación se encuentran formando parte de un operón, solo *prsD* y *prsE* forman parte de un operón; el tercer marco de lectura abierto río abajo de la posible región promotora no presenta homología con PtrF o AprF, las OMP de *P. aeruginosa* y *E. chrysanthemi*. Más aún, interrupciones de este marco de lectura con un transposón Tn5 no fueron capaces de impedir la secreción al medio extracelular de NodO ni de otras proteínas de unión a calcio, lo cual diferencia a PrsDE de otros SSTI.

Las mutantes en el locus *prsDE* presentaron colonias muy viscosas y una disminución marcada en la actividad de glicanasa extracelular en un ensayo *in placa* utilizando a la carboximetilcelulosa como sustrato modelo (Finnie et al. 1998). En línea con estos fenotipos, se observó una disminución en la cantidad de azúcares reductores en el EPS (Finnie et al, 1997). Se pudo demostrar que PrsDE es responsable de la secreción de dos glicanasas  $\beta$ -1,4 denominadas PlyA y PlyB (por *polysaccharide lyase*) (Finnie et al. 1998), lo cual permitió establecer una relación entre este SSTI PrsDE y el procesamiento del polisacárido de *R. leguminosarum* (descriptas en más detalle en la sección siguiente).

Ensayos experimentales de nuestro laboratorio confirmaron que la secreción de otras 6 proteínas en *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 8401 pRL1JI (llamada también A34) es dependiente de PrsDE (Russo et al. 2006 – Abordado en sección resultados y discusión también). Por otro lado, ensayos *in silico* y experimentales permitieron establecer la posible secreción de hasta 13 sustratos diferentes en la cepa 3841 (Krehenbrink y Downie. 2008 – Tarsitano et al. 2022). Por lo tanto, el SSTI tiene características inusuales, no solo por el particularmente alto número de sustratos sino también porque los genes de los mismos no se encuentran adyacentes al locus secretor (Krehenbrink y Downie 2008; Tarsitano et al. 2022).

## Proteínas Rap

Las proteínas Rap (*Rhizobium adhering proteins*) fueron definidas como tales luego de que Ausmees y colaboradores identificaran por medio de un *phage display* proteínas que eran capaces de adherirse a la superficie de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 (2001). Dentro de este grupo de proteínas identificaron a RapA1, RapA2, RapB y RapC. Todas ellas, al igual que las mencionadas PlyA y PlyB contaban con al menos un dominio Ra (*Rhizobium adhering*). Mientras que RapA1/RapA2 sólo están formadas por dos de estos dominios, el resto de las Rap(s) presenta una región adicional que no comparte similitud significativa con Ra ni con ningún otro dominio de función conocida. Un trabajo posterior de nuestro laboratorio mostró que los dominios Ra se encuentran presentes no solo en bacterias sino en algunas arqueas y en eucariotas y son semejantes a los dominios presentes en cadherinas eucariotas acuñando el término Ra/CHDL (*Rhizobium adhering - cadherin like domain*) (Abdian et al. 2013). Estas proteínas se encuentran circunscriptas a un grupo muy reducido de rizobios, en particular *R. leguminosarum* con sus biovares y *R. etli* (Ausmees 2001; Tarsitano et al. 2022). Más aún se observó que al igual que PlyA y PlyB las Rap(s) son secretadas por el SSTI PrsDE (Russo et al. 2006).

### RapA1/RapA2

RapA1 y su parólogo RapA2 se encuentran formados únicamente por dos dominios Ra/CHDL en tándem separados por una región *linker* (Abdian et al. 2013). Los ensayos realizados en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 permitieron establecer que es capaz de unirse a un receptor en las células rizobiales. Más aún se demostró que son proteínas de unión a calcio de localización polar

involucrada en la auto agregación de las células (Ausmees et al. 2001). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, el locus *rapA1* estaría constituido por un pseudogen mientras que el equivalente activo es *rapA2* (pRL100451). Análisis in vitro con RapA2 recombinante permitieron establecer que es una proteína de unión a calcio cuya estructura secundaria, la cual está compuesta principalmente por hojas plegadas  $\beta$ , y estabilidad térmica dependen de la interacción con este ion en una concentración mayor a la presente en el citosol. Esta característica es coincidente con el mecanismo de secreción a través de un SSTI, el cual transloca sustratos desplegados (Bumba et al. 2016; Motlova et al. 2020). La proteína adquiriría su estructura nativa en el ambiente extracelular en el que la concentración de calcio se encuentra dentro del orden milimolar. RapA2 fue capaz de interactuar específicamente con el EPS de *R. leguminosarum* y no con el de especies emparentadas como *E. meliloti* (*Sinorhizobium*) sin necesidad de la presencia de otras proteínas, lo cual confirmó trabajos anteriores que proponían a los dominios Ra/CHDL como módulos de unión a carbohidratos (Cao et al. 2005; Abdian et al. 2013). Pese a contar un dominio Ra/CHDL no se pudo demostrar que la misma formara oligómeros consigo misma (como sucede con las cadherinas eucariotas) ni con otra proteína Rap, como RapB recombinante (Abdian et al. 2013). Ensayos in vivo permitieron demostrar que RapA2 se secreta al medio extracelular a través de un polo de la bacteria y que al ser sobreexpresada, la misma adquiere una localización similar a la del polisacárido capsular, presumiblemente por su interacción con el mismo. Cuando se alteran los niveles de RapA2 extracelular se modifica el balance entre EPS/CPS lo cual altera no solo la autoagregación de los rizobios sino también la arquitectura del biofilm al alterarse las interacciones entre bacterias que se encuentran embebidas en el polisacárido (Vozza – Abdian et al. 2016)

#### PlyA/PlyB

PlyA y PlyB son glicanasas extracelulares codificadas en el cromosoma de *Rhizobium spp.* que clivan las cadenas de polisacárido limitando su longitud (Finnie et al. 1998; Zorreguieta et al. 2000). Al igual que las proteínas Rap cuentan también con un dominio Ra/CHDL; no obstante, la localización del mismo difiere con las otras Rap (ver sección Resultados, figura 1) y se limita al extremo C terminal (Ausmees et al. 2001). Ensayos con diversas mutantes PlyA y PlyB permitieron establecer que la glicanasa de mayor actividad en el medio extracelular es PlyB (Zorreguieta et al. 2000). Además, se pudo observar que pese a ser similares en secuencia, solo PlyA queda retenida sobre la superficie celular mientras que PlyB es capaz de difundir y despegarse de la superficie de la célula. Curiosamente, la actividad glicanasa de ambas proteínas se ve limitada al contacto con la superficie de *Rhizobium* de manera dependiente de la producción del CPS/EPS. Se propuso que las glicanasas PlyA y PlyB se activan luego de interactuar con el polisacárido naciente en un polo de la bacteria (Zorreguieta et al. 2000). La observación por microscopía confocal de cultivos de bacterias marcadas con la proteína verde fluorescente GFP permitió establecer que la ausencia de estas proteínas en el medio extracelular altera la maduración del biofilm, principalmente por su efecto sobre el tamaño de las cadenas del polisacárido (Russo et al. 2006).

# Hipótesis

## Capítulo I:

Mediante el análisis *in silico* de aquellas proteínas que poseen dominios Ra/CHDL codificadas en el genoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, se identificó una nueva proteína Rap a la que se denominó RapD, cuyo locus RL2702 está contenido el cromosoma bacteriano (Abdian et al. 2013). RapD presenta un dominio Ra/CHDL en la región amino-terminal, similar a los presentes en RapA2.

La hipótesis de este trabajo es que RapD **es un sustrato del SSTI PrsDE y que se encuentra involucrado en la modificación de la matriz extracelular y maduración del biofilm.**

## Capítulo II:

Mediante ensayos de actividad glicanasa se observó que PlyB es capaz de degradar carboximetilcelulosa y es la glicanasa de principal actividad en el medio extracelular (Zorreguieta et al. 2000). Además, los efectos de la ausencia de PlyB extracelular tienen un efecto muy marcado sobre el polisacárido ácido de *Rlv* lo cual afecta la maduración del biofilm (Finnie et al. 1997; Russo et al. 2006)

La hipótesis de este trabajo es que PlyB **es una glicanasa que actúa específicamente sobre el EPS y cliva los enlaces  $\beta$  1,4 presentes en el mismo**



# Objetivos

## Capítulo I:

**El objetivo general de esta tesis es comprender la función que cumplen las proteínas asociadas a la matriz de los biofilms de los rizobios.** En particular, se propone determinar si RapD es un sustrato del SSTI PrsDE, analizar su rol en la modificación de la matriz del biofilm y determinar la localización espacial de la misma tanto en contexto de biofilm como de la bacteria.

### **Por lo tanto, los objetivos específicos:**

- Determinar si RapD es dependiente de PrsDE y se co-secreta con otras Rap(s)
- Investigar las condiciones de crecimiento donde RapD se secreta más prominentemente
- Averiguar la localización extracelular de RapD
- Determinar si RapD es capaz de unir calcio y el mismo tiene un efecto sobre la estructura secundaria de esta proteína
- Corroborar si RapD es incapaz de formar multímeros como las cadherinas eucariotas
- Confirmar la interacción de esta proteína con el polisacárido de *Rhizobium leguminosarum* y analizar qué residuo glicosídico está involucrado en su interacción
- Evaluar los efectos de la delección de esta proteína sobre características distintivas relacionadas a la formación de biofilm

## Capítulo II:

**El objetivo es poder caracterizar más a fondo la glicanasa PlyB, glicanasa de mayor actividad glicanolítica en el medio extracelular (Zorreguieta et al. 2000; Russo et al. 2006).** Se propone evaluar los efectos de la sobreexpresión constitutiva de PlyB en el fenotipo de *R/v* y analizar los efectos de la sobreexpresión sobre el EPS.

### **Los objetivos específicos de este capítulo son:**

- Generar una nueva cepa de sobreexpresión que permita secretar de manera constitutiva PlyB
- Identificar el efecto de la sobreexpresión de PlyB sobre el EPS
- Determinar el sitio de corte de PlyB en el EPS

# Materiales y Métodos

## Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* fueron cultivadas en medio rico TY (Tryptone – Yeast) o en medio mínimo Y (Beringer, 1974; Sherwood, 1970) utilizando manitol 0.2% como fuente de carbono a 28° C con agitación de 200 rpm.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron crecidas en medio Luria – Bertani (LB) a 37° C con agitación de 220 rpm.

El crecimiento bacteriano se evidenció como la turbidez del medio de cultivo medida por dispersión de luz a 600nm en un espectrofotómetro Novaspec II – Pharmacia Biotech.

### LB

Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (cuando necesario)	15 g/L

### TY

Triptona	5 g/L
Extracto de Levadura	3 g/L
CaCl <sub>2</sub> – 2H <sub>2</sub> O	0.87 g/L
Agar (cuando necesario)	15 g/L

Y	Concentración stock	Concentración final
MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	10 % p/v	0.4 mM
CaCl <sub>2</sub> – 5H <sub>2</sub> O	22 % p/v	1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22 % p/v	1.25 mM
FeCl <sub>3</sub>	2 % p/v (En 0.1 M HCl)	0.1 mM
Glutamato de Sodio	4.4 % p/v	6.5 mM
Manitol	10 % p/v	11 mM
Biotina	0.1 g/L (En buffer fosfato pH 7)	2 µM
Clorhidrato de Tiamina	0.1 g/L (En buffer fosfato pH 7)	2 µM
Ácido D-Pantoténico	0.1 g/L (En buffer fosfato pH 7)	2 µM
Agar (cuando necesario)	15 g/L	1.5 %

Como suplemento para ensayo de actividad glicanasa se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) 2.5%. Se agregaron 4 ml de CMC cada 100 ml de medio de cultivo.

## Antibióticos utilizados

Antibiótico	Stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)	
		<i>E. coli</i>	<i>R. leguminosarum</i>
Ampicilina	200	400	-
Cloranfenicol	25	50	-
Gentamicina	20	20	20
Kanamicina	50	30	50
Estreptomicina	200	-	400
Tetraciclina	5	10	5 (TY) ; 2 (Y)

## Cepas y plásmidos utilizados

Cepa	Características relevantes	Origen o referencia
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	F $\phi$ 80dlacZΔM15 Δ(lacZY A-argF)U169 deoR, recA1, endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	New England
pRK600	Cepa helper conjugación, Tra+, plásmido movilizable cloranfenicol	Finan et al. 1986
BL21 (DE3)	<i>fhuA2[lon] ompT gal</i> (λ DE3) [ <i>dcm</i> ] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gen 1) i21 Δnin5</i>	New England
S17	Cepa para conjugación biparental	Simon et al. 1989

### ***R. leguminosarum***

A3	Cepa silvestre 3841	Johnston & Beringer, 1975
A895	3841 <i>prsD::Tn5</i>	Krehenbrink & Downie, 2008
A1073	3841 <i>pssA::Tn5</i>	Williams et al., 2008
Δ <i>rapA2</i>	3841 <i>rapA2</i> (pRL100451/Q1M755)::Gen <sup>R</sup>	Vozza – Abdian et al., 2016
Δ <i>rapD</i>	3841 delección gen <i>RapD</i> (RL2702/Q1MFT2)	Esta tesis
Δ <i>rapA2</i> Δ <i>rapD</i>	3841 <i>RapA2</i> (pRL100451/Q1M755)::Gentamicina <sup>R</sup> ; delección gen <i>RapD</i> (RL2702/Q1MFT2)	Esta tesis
A34	Cepa derivada de 8401 con pSym pRL1Jl	Downie 1983
A412	A34 <i>prsD1::Tn5</i>	Finnie 1997
A600	A34 <i>plyB1::Tn5</i>	Finnie 1998
A603	A34 con inserción de un transposón Tn5 en un sistema de dos componentes	Russo 2006 (tesis doctoral)-Zorreguieta no publicado

Plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
pET-22b	Plásmido de expresión de proteínas recombinantes con 6xHis C terminal	Novagen
pET-22b <i>rapD</i> Ct	pET-22b con inserto (479 pb) <i>rapD</i> C terminal (desde +379) (RL_RS13955) en sitios NdeI y NotI. Amp <sup>R</sup>	Esta tesis
pET-22b <i>rapD</i>	pET-22b con inserto <i>rapD</i> (854 pb) (secuencia codificante completa) (RL_RS13955) en sitios NdeI y NotI. Amp <sup>R</sup>	Esta tesis

pk18mobsacB	Vector de clonado suicida inducible por sacarosa 10% para generación de cepas mutantes por recombinación. Kana <sup>R</sup>	Schaffer et al., 1994
pk18mobsacB - $\Delta rapD$	pk18mobSacB con inserto de 1244 pb de regiones vecinas a la región decificante del gen <i>rapD</i> (RL_RS13955) Kana <sup>R</sup>	Esta tesis
pBBR1-MCS2	Plásmido de expresión de alto espectro. Kana <sup>R</sup>	Kovach et al. 1995
pBBR1-MCS2 – <i>rapD</i>	pBBR1 – MCS2 con inserto en fase con lacZ del gen <i>rapD</i> (RL_RS13955) para expresión constitutiva	Esta tesis
pBBR1-MCS5	Plásmido de expresión de alto espectro. Gent <sup>R</sup>	Kovach et al. 1995
pBBR1-MCS5 – <i>plyB</i>	pBBR1 – MCS2 con inserto en fase con lacZ del gen <i>plyB</i> (RL_RS15620) para expresión constitutiva	Esta tesis

### Preparación de ADN genómico de *Rhizobium*

A partir de un precultivo de 48 hs (DO ~ 1.2) se inoculó un cultivo de 20 ml con una dilución 1/100 (DO<sub>i</sub> = 0.01) y se incubó a 28° C hasta llegar a una DO ~ 0.5 (fase exponencial). Se separaron las bacterias por centrifugación a máxima velocidad a 4° C por 5 minutos. Se lavó el pellet dos veces con buffer TE20 – 0.1 % sarcosil y dos veces con TE20. Luego de los lavados se resuspendieron las bacterias en 1 ml de buffer TE – 25% sacarosa.

Se agregó lisozima hasta una concentración final de 1.5 mg/ml y EDTA hasta 0.1 M, se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos a 37° C. Se adicionaron 2 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ para llevar a un volumen de 3ml y se agregó SDS 10% hasta una concentración final de 0.625%. Se incorporó ARNasa para concentración final 0.15 mg/ml y se dejó actuar por 5 minutos a 37° C.

Se realizó una extracción con 1 volumen de fenol – cloroformo (1:1) y se centrifugó a 4° C a máxima velocidad para separar las fases. Se recolectó la fase acuosa (superior) y se repitió el proceso. Se tomó la fase acuosa de esta segunda extracción y se realizó una tercera extracción con 1 volumen de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1).

Para precipitar el ADN genómico, se agregaron 1/9 volúmenes de Acetato de potasio 3M pH 4,8 a la fase acuosa y se mezcló por inversión suavemente. Se agregaron 2 volúmenes de etanol 100% y se centrifugó por 10 minutos a 4° C a máxima velocidad (>10000 x g). El ADN precipitado se lavó dos veces con etanol 70% centrifugando a 16000 x g a 4° C por 10 minutos. Se dejó secar al aire el pellet y se resuspendió en agua MilliQ.

#### **Buffer TE20:**

50 mM Tris-HCl pH 8  
20 mM EDTA pH 8  
1 M NaCl

#### **Buffer TE20 – Sarcosil:**

50 mM Tris HCl pH 8  
20 mM EDTA pH 8  
1 M NaCl  
Sarcosil 0.1%

#### **Buffer TE:**

---

10 mM Tris HCl pH 8  
1 mM EDTA pH 8

**Buffer TE – Sacarosa:**

---

10 mM Tris HCl pH 8  
1 mM EDTA pH8  
Sacarosa 25%

**Preparación de ADN plasmídico**

La extracción de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos overnight de *E. coli* DH5α portadoras de vectores de interés incubados con los antibióticos apropiados y cosechados por centrifugación a máxima velocidad. Se utilizaron columnas de sílica EconoSpin™ para retener el ADN siguiendo el protocolo del fabricante y empleando las soluciones que se indican a continuación. La elución del ADN retenido en las columnas se efectuó con H<sub>2</sub>O.

**Buffer P1 (buffer de Resuspensión):**

---

50mM Tris-HCl pH 8  
10mM EDTA pH 8  
50µg/ml RNAsa A

**Buffer P2 (buffer de lisis):**

---

200mM NaOH  
1% SDS

**Buffer N3 (buffer de neutralización y binding):**

---

4M Cloruro de Guanidinio  
0.5M Acetato de Potasio pH 4.2

**Buffer PB (primer lavado o buffer de binding):**

---

5M Cloruro de guanidinio  
20mM Tris-HCl pH 6.6  
38% Etanol

**Buffer PE (segundo lavado):**

---

20mM NaCl  
2mM Tris-HCl pH 6.6  
80% Etanol

**Amplificación de genes por PCR**

Amplificación a partir de ADN obtenido por lisado de bacterias con Taq polimerasa (Pegasus®)

Para el genotipado de nuevas cepas bacterianas o la corroboración de incorporaciones de plásmidos se utilizó la enzima comercial TaqPegasus, una enzima de procesividad media sin actividad *proof-reading*. Se generaron moldes de ADN genómico a partir de bacterias crecidas en placas. 50µl de agua MilliQ o agua apirógena fueron inoculadas con una punta de escarbidentes de bacteria. Se homogeneizó la suspensión y se calentaron por 10 minutos a 95° C para lisar las bacterias. El protocolo de amplificación general fue el siguiente:

	Volumen	Concentración Final
Taq Pegasus® 5 U/μl	0.2 μl	1 U
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 μl	1.5 mM
Taq Pegasus Buffer 10X	2.5 μl	1X
Primer forward 10 μM	1.25 μl	0.5 μM
Primer reverse 10 μM	1.25 μl	0.5 μM
dNTPs 10 mM	0.5 μl	0.2 mM
Molde	2 μl	1 pg – 1 ng
H <sub>2</sub> O	16.55 μl	c.s.p. 25 μl

#### Amplificación a partir de ADN genómico de *Rhizobium* para clonados empleando Pfu

La amplificación de genes de *R. leguminosarum* para clonados o deleciones se realizó utilizando una polimerasa (Pfu) con actividad *proof-reading* adaptando el protocolo provisto por el fabricante, PB-L: Productos Bio - Lógicos®.

	Volumen	Concentración Final
Pfu 2 U/μl	1 μl	2 U
Pfu Buffer 10X	5 μl	1X
Primer forward 10 μM	2.5 μl	0.5 μM
Primer reverse 10 μM	2.5 μl	0.5 μM
dNTPs 10 mM	1 μl	0.2 mM
Genómico <i>R. leguminosarum</i>	1 μl	0.5 ng
H <sub>2</sub> O	37 μl	c.s.p. 50 μl

#### Termociclados y productos de amplificación

A continuación, se detallan las distintas combinaciones de primers utilizadas, los ciclos de amplificación utilizados en la termocicladora y la secuencia del producto obtenido en cada caso.

#### Fragmento "A" PCR recombinante para deleción del gen *rapD*

**Primer forward** *ΔrapD-A-fwd\_BamHI*  
5' – GAGTAGGGATCCTTCTTCTTCATAGGCGT – 3'

**Primer reverse** *ΔrapD-A-rev\_linker*  
5' – TCGATACTCTCCTTCTTTTCAGTGGCTTGCATTTGTCATTTG – 3'

**Amplicon** 658 pb  
GAGTAGGGATCCTTCTTCTTCTTCATAGGCGTCCATGACGCCGCGGGCGAGCGCTGCCGTATCCTC  
GCCATCGGTCCAGACCCTGCGGCCTTTCTTGCCCATGATGATCGCCGTGCCGGTGTCTTGGCACA  
TGGGCAGCACGCCGCCGGCGGCGATATTGGCGTTCTTCAAGAGATCGTAGGCGACAAAACGGTCA  
TTGTCGGTCGCTTCGGGATCGTCGAGGATCGAGGCGAGCTGTTTCAGGTGGCCGGGACGCAGCAG  
GTGGTTGATGTCCGCAAGGCGGTTTCGGCCAGCAGGCGGATGCCTTCCGGCTCGACGGTCAGGA  
TCTCTGGCCCTTGAACGTATCGACCGAGACATGGTTCGCCGCTGATCTTGCGATAGGGGGTGGCA  
TCCTTGCCGAGGGGGAAGAGATCGTCAGCCATCGAAGTGACCTTTCTGGTAGGGCGTGCGTCGCT  
AGATTGGAACCGGTCTAAATCCGCTGCGGGGCAAAAGCAATCGGGACCACGCGCGGGCGGATGAGG  
CGAACCGTCGAAATCGGTCCGACAAAAGACGACTTCAAGTTGCCCTTTTCGAGGCCAGTACA  
TATTCGCGCAGCGTTAACCTGCCGGGGCTTCAAATGACAAATGCAAAGCCA CTGAAAGAAGGAG  
AGTATCGA

**Termociclado** 94° C 5'

94° C	30''	x 35 ciclos
60° C	30''	
70° C	45''	
70° C	5'	

**Fragmento "B" PCR recombinante para delección del gen *rapD***

**Primer forward** *ΔrapD*-B-fwd\_linker  
 5' – CTGAAAGAAGGAGAGTATCGATTTTCGCTGTTTGCCTTGCTA – 3'

**Primer reverse** *ΔrapD*-B-rev\_BamHI  
 5' – ATTGGATCCCAATCCGACCCAGTGCGAG – 3'

**Amplicon** 607 pb

CTGAAAGAAGGAGAGTATCGATTTTCGCTGTTTGCCTTGCTATAGGCTGGAGGGAGTCGAGGGCGT  
 TGGCGCATATCACCTTGGCCCCGCGAGCGGGGTCCGAAGGACGGGTCGAGACCTGTGGCTCGAC  
 CCCGGTTGGTGGCGGCAGCCGGATGAGGGGCTGTGGCCTATGCGACCTTCCTACTTCGGCCCGAT  
 CATCGTTTCCGGCCGGACGATCGCGTCATACTCTCCGACGTCAGTACTAGGCCGCTGGCGAGGCTCT  
 CTTCCCTCAGCGTCGTGCCGTTCTTGTGGGCGGTCTTGGCGATCTTGGCGGCTGCGTCGTAGCCG  
 ATCTTCGGGGCAAGTGCCGTCACCAGCATCAGCGAGCGTTTCGAGGCCGGCCTTGATATTGTCCCTC  
 GCGGCCTCGATGCCGACGACGAATTGTCCGTTGAAGGAGACGGCGGGCGTCGGCGAGCAGCTGCA  
 CCGACTGCAGGAAATTATAGGCCATCATCGGATTGTAGACGTTGAGCTCGAAATGGCCCTGGCTG  
 TCGGCGAAGGTCAGAGCCGCGTTGTGCCGAAGATATGGATGCAGACCTGCGTCAGCGCCTCGCA  
 CTGGGTCGGATTGGATCCAAT

**Termociclado**

94° C	5'	x 35 ciclos
94° C	30''	
60° C	30''	
70° C	45''	
70° C	5'	

**PCR recombinante fragmentos A+B para delección del gen *rapD***

**Primer forward** *ΔrapD*-A-fwd\_BamHI  
 5' – GAGTAGGGATCCTCTTCTTCTCATAGGCG – 3'

**Primer reverse** *ΔrapD*-B-rev\_BamHI  
 5' – ATTGGATCCCAATCCGACCCAGTGCGAG – 3'

**Amplicon** 1244 pb

GAGTAGGGATCCTCTTCTTCTCATAGGCGTCCATGACGCCGCGGGCGAGCGCTGCCGTATCCTC  
 GCCATCGGTCCAGACCCTGCGGCCTTTCTTGGCCATGATGATCGCCGTGCCGGTGTCTTGGCACA  
 TGGGCAGCACGCCGCCGGCGGCGATATTGGCGTCTTCAAGAGATCGTAGGCGACAAAACGGTCA  
 TTGTCGGTCGCTTCGGGATCGTCGAGGATCGAGGCGAGCTGTTTCAGGTGGCCGGGACGCAGCAG  
 GTGGTTGATGTCCGCAAAGGCGGTTTCGGCCAGCAGGCGGATGCCTTCCGGCTCGACGGTCAGGA  
 TCTCTGGCCCTTGAACGTATCGACCGAGACATGGTCCCGCTGATCTTGGCATAGGGGGTGGCA  
 TCCTTGGCGAGGGGGAAGAGATCGTCAGCCATCGAAGTGACCTTTCTGGTAGGGCGTGCGTCGCT  
 AGATTGGAACCGGTCTAAATCCGCTGCGGGGCAAAGCAATCGGGACCACGCGCGGCGGATGAGG  
 CGAACCGTCGAAATCGGTCCGACAAAAGACGACTTCAAGTTGCCCTTCTTTTCGAGGCCAGTACA  
 TATTCGCCGAGCGTTAACCTGCCGGGGCTTCAAATGACAAATGCAAAGCCACTGAAAGAAGGAG  
AGTATCGATTTTCGCTGTTTGCCTTGCTATAGGCTGGAGGGAGTCGAGGCGTTGGCGCATATCAC  
 CTTGGCCCCGCGAGCGGGGTCCGAAGGACGGGTCGAGACCTGTGGCTCGACCCCGGTTGGTGGC  
 GGCAGCCGGATGAGGGGCTGTGGCCTATGCGACCTTCCTACTTCGGCCCGATCATCGTTTCCGGC

CGGACGATCGCGTCATACTCTTCCGACGTCCTAGGCCGCTGGCGAGGCTCTCTTCCTTCAGCGT  
 CGTGCCGTTCTTGTGGGCGGTCTTGGCGATCTTGGCGGCTGCGTCGTAGCCGATCTTCGGGGCAA  
 GTGCCGTCACCAGCATCAGCGAGCGTTTCGAGGCCGGCCTTGATATTGTCCTCGCGCGCCTCGATG  
 CCGACGACGCAATTGTCGGTGAAGGAGACGGCGGCGTCGGCGAGCAGCTGCACCGACTGCAGGAA  
 ATTATAGGCCATCATCGGATTGTAGACGTTGAGCTCGAAATGGCCCTGGCTGTGCGCGAAGGTCA  
 GAGCCGCGTTGTTGCCGAAGATATGGATGCAGACCTGCGTCAGCGCCTCGCACTGGGTTCGGATTG  
GGATCCAAT

<b>Termociclado</b>	94° C	5'		x 35 ciclos
	94° C	30''		
	62° C*	30''		
	70° C	1' 30''		
	70° C	5'		

\*60° C para Colony PCR

**PCR para genotipado de cepas *ΔrapD* y cepas *wt***

**Primer forward** *ΔrapD*-A-fwd\_BamHI  
 5' – GAGTAGGGATCCTTCTTCTCATAGGCGT – 3'

**Primer reverse** *rapD*full-rev\_XbaI  
 5' – GCTCCCTCTAGACTATAGCAAGGCAAACA – 3'

**Amplicon** *ΔrapD* 694 pb  
 GAGTAGGGATCCTTCTTCTTCTCATAGGCGTCCATGACGCCGCGGGCGAGCGCTGCCGTATCCTC  
 GCCATCGGTCCAGACCCTGCGGCCTTTCTTGGCCATGATGATCGCCGTGCCGGTGTCTTGGCACA  
 TGGGCAGCACGCCGCCGGCGGCGATATTGGCGTTCTTCAAGAGATCGTAGGCGACAAAACGGTCA  
 TTGTCCGTCGCTTCGGGATCGTCGAGGATCGAGGCGAGCTGTTTCAGGTGGCCGGGACGCAGCAG  
 GTGGTTGATGTGCGCAAAGGCGGTTTCGGCCAGCAGGCGGATGCCTTCCGGCTCGACGGTCAGGA  
 TCTCTGGCCCTTGAACGTATCGACCGAGACATGGTCGCCGCTGATCTTGGCATAGGGGGTGGCA  
 TCCTTGGCGAGGGGGAAGAGATCGTCAGCCATCGAAGTGACCTTTCTGGTAGGGCGTGCCTCGCT  
 AGATTGGAACCGGTCTAAATCCGCTGCGGGGCAAAGCAATCGGGACCACGCGCGGGCGGATGAGG  
 CGAACCCTCGAAATCGGTCCGACAAAAGACGACTTCAAGTTGCCTTCTTTTCGAGGCCAGTACA  
 TATTCGCCGCGAGCGTTAACCTGCGGGGGCTTCAAATGACAAATGCAAAGCCACTGAAAGAAGGAG  
 AGTATCGATTTTCGCTGTTTGCTTATAGTCTAGAGGGGAGC

**Amplicon** *wt* 1465 pb  
 GAGTAGGGATCCTTCTTCTTCTCATAGGCGTCCATGACGCCGCGGGCGAGCGCTGCCGTATCCTC  
 GCCATCGGTCCAGACCCTGCGGCCTTTCTTGGCCATGATGATCGCCGTGCCGGTGTCTTGGCACA  
 TGGGCAGCACGCCGCCGGCGGCGATATTGGCGTTCTTCAAGAGATCGTAGGCGACAAAACGGTCA  
 TTGTCCGTCGCTTCGGGATCGTCGAGGATCGAGGCGAGCTGTTTCAGGTGGCCGGGACGCAGCAG  
 GTGGTTGATGTGCGCAAAGGCGGTTTCGGCCAGCAGGCGGATGCCTTCCGGCTCGACGGTCAGGA  
 TCTCTGGCCCTTGAACGTATCGACCGAGACATGGTCGCCGCTGATCTTGGCATAGGGGGTGGCA  
 TCCTTGGCGAGGGGGAAGAGATCGTCAGCCATCGAAGTGACCTTTCTGGTAGGGCGTGCCTCGCT  
 AGATTGGAACCGGTCTAAATCCGCTGCGGGGCAAAGCAATCGGGACCACGCGCGGGCGGATGAGG  
 CGAACCCTCGAAATCGGTCCGACAAAAGACGACTTCAAGTTGCCTTCTTTTCGAGGCCAGTACA  
 TATTCGCCGCGAGCGTTAACCTGCGGGGGCTTCAAATGACAAATGCAAAGCCAACTGCTGTGCGAG  
 ACCTTCTCGTTTTTTTTTGAAGACAATTGGATCCGCGGGAATCTGCTGCGCCTCTCCAGCGATCCC  
 GAGGGAGCGGACATGTATGTTGCTTTCGTCATGCGGTGCGTATCGACGCCAAACATGGGCCTGA  
 CCACGAAACGATCATAAGGGGCGAGTACGGAACCTTTCAGACTGAAACCTGACGGTCACTTCGAGT  
 ACGAGCTGGACTACACGCTCGACGTCGTGAAAAATTTAACGAAATACGATCAGCTCATCGAGAAG  
 CTGAGCTTCAAGATGTCAGATGGCTCAGGAGGCACGGACTTCGGCGTGTGACGCTCGCGATCGA  
 CGGCGTCAACGAAGGCGACAAATACCATGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCA



GGGCAGATAATTTCTCTCTGCCTGACTATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAA  
 GTGACGCTTCTGAACGGCATCGTCTACGACACGATCCCGGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGG  
 TTTTCAGCGATAACCGTTCTATCGCCGGGTTCTGCGCCCGTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAG  
 AATTCACCTTTTCAGAGCGTTTCGATTGCCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTACCTCACGCTCACC  
 GCGCTGAACGACGGTCAGATCGTCTATCAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCCACTCTCGAGGT  
 CAATCTCGAAGACATCGAAGAAATCCGTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTCTGATGGACAATT  
 TTTTCGCTGTTTGCTTATAGTCTAGAGGGAGC

<b>Termociclado</b>	94° C	5'		x 35 ciclos
	94° C	30''		
	60° C	30''		
	72° C	1' 40''		
	72° C	5'		

### **Amplificación gen *rapD* para expresión constitutiva en pBBR1-MCS2**

**Primer forward**     *rapD*full-fwd\_KpnI  
 5' – GAAGGTACCGACAAATGCAAAGCCAACT – 3'

**Primer reverse**     *rapD*full-rev\_XbaI  
 5' – GCTCCCTCTAGACTATAGCAAGGCAAACA – 3'

**Amplicon**             853 pb

GAAGGTACCGACAAATGCAAAGCCAACTGCTGTGCGACGACCTTCTCGTTTTTTTTTCGAAGACAATT  
 GGATCCGCGGGAATCTGCTGCGCTCTCCAGCGATCCCGAGGGAGCGGACATGTATGTTTCGCTTC  
 GTCAATGGCGTGCATCGACGCCAAACATGGGCCTGACCACGAAACGATCATAAGGGGCGAGTA  
 CGGAACCTTCAGACTGAAACCTGACGGTCACTTCGAGTACGAGCTGGACTACACGCTCGACGTCG  
 TGAAAAATTTAACGAAATACGATCAGCTCATCGAGAAGCTGAGCTTCAAGATGTCAGATGGCTCA  
 GGAGGCACGGACTTCGGCGTGTGACGCTCGCGATCGACGGCGTCAACGAAGGCGACAAATACCA  
 TGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCAGGGCAGATAATTTCTCTCTGCCTGACT  
 ATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAAGTGACGCTTCTGAACGGCATCGTCTAC  
 GACACGATCCCGGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGGTTTCAGCGATACCGTTCTATCGCCGGG  
 TTCTGCGCCCGTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAGAATTCACCTTTTCAGAGCGTTTCGATTG  
 CCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTACCTCACGCTCACCGCGCTGAACGACGGTCAGATCGTCTAT  
 CAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCCACTCTCGAGGTCAATCTCGAAGACATCGAAGAAATCCG  
 TTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTCTGATGGACAATTTTTTCGCTGTTTGCTTATAGTCTA  
GAGGGAGC

<b>Termociclado</b>	94° C	5'		x 35 ciclos
	94° C	30''		
	60° C	30''		
	70° C	60''		
	70° C	5'		

### **PCR para genotipado de cepas con expresión constitutiva *rapD* en pBBR1-MS2**

**Primer forward**     T7  
 5' – AATACGACTCACTATAG – 3'

**Primer reverse**     T3  
 5' – ATTAACCCTCACTAAAG – 3'

**Amplicon** pBBR1-MCS2 – *rapD* 924 pb

ATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG**GGTACC**GACAAATGCAAAGCCAACTGCTGTGACG  
ACCTTCTCGTTTTTTTTTCGAAGACAATTGGATCCGCGGGAATCTGCTGCGCCTCTCCAGCGATCCC  
GAGGGAGCGGACATGTATGTTTCGCTTCGTCAATGGCGTGCATCGACGCCAAACATGGGCCTGA  
CCACGAAACGATCATAAGGGGCGAGTACGGAACCTTCAGACTGAAACCTGACGGTCACTTCGAGT  
ACGAGCTGGACTACACGCTCGACGTCGTGAAAAATTTAACGAAATACGATCAGCTCATCGAGAAG  
CTGAGCTTCAAGATGTCAGATGGCTCAGGAGGCACGGACTTCGGCGTGTGACGCTCGCGATCGA  
CGGCGTCAACGAAGGCGACAAATACCATGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCA  
GGGCAGATAATTTCTCTCTGCCTGACTATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAA  
GTGACGCTTCTGAACGGCATCGTCTACGACACGATCCCGGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGG  
TTTCAGCGATAACCGTTCTATCGCCGGTTCTGCGCCCCTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAG  
AATTCACCTTTCAGAGCGTTTCGATTGCCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTCACCTCACGCTCACC  
GCGCTGAACGACGGTCAGATCGTCTATCAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCCACTCTCGAGGT  
CAATCTCGAAGACATCGAAGAAATCCGTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTGCTGATGGACAATT  
TTTCGCTGTTTGCTTATAG**TCTAGA**GCGGGGCGGACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTA  
TAGTGAGTCGTATT

**Amplicon** pBBR1-MCS2 164 pb

ATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG**GGTACC**GGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGA  
TAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGT**TCTAGA**GCGGGGCGGACCGCGG  
TGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATT

<b>Termociclado</b>	94° C	5'	x 35 ciclos
	94° C	30''	
	55° C	30''	
	72° C	1' 5''	
	72° C	5'	

---

**Amplificación *rapD* secuencia codificante completa (RL\_RS13955) para clonado en pET-22b**

---

**Primer forward** *rapD*full-NdeI\_fwd  
5' – GCCCTCCATATGACAAATGCAAAGCCAACT – 3'

**Primer reverse** *rapD*-NotI\_rev  
5' – CTCGCGGCCGCATATAGCAAGGCAAA – 3'

**Amplicon** 854 pb

GCCCTC**CATATG**ACAAATGCAAAGCCAACTGCTGTGACGACCTTCTCGTTTTTTTTTCGAAGACAA  
TTGGATCCGCGGGAATCTGCTGCGCCTCTCCAGCGATCCCGAGGGAGCGGACATGTATGTTTCGCT  
TCGTCAATGGCGTGCATCGACGCCAAACATGGGCCTGACCACGAAACGATCATAAGGGGCGAG  
TACGGAACCTTCAGACTGAAACCTGACGGTCACTTCGAGTACGAGCTGGACTACACGCTCGACGT  
CGTAAAAATTTAACGAAATACGATCAGCTCATCGAGAAGCTGAGCTTCAAGATGTCAGATGGCT  
CAGGAGGCACGGACTTCGGCGTGTGACGCTCGCGATCGACGGCGTCAACGAAGGCGACAAATAC  
CATGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCAGGGCAGATAATTTCTCTCTGCCTGA  
CTATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAAGTGACGCTTCTGAACGGCATCGTCT  
ACGACACGATCCCGGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGGTTTCAGCGATAACCGTTCTATCGCCG  
GGTCTGCGCCCCTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAGAATTCACCTTTCAGAGCGTTTCGAT  
TGCCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTCACCTCACGCTCACC GCGCTGAACGACGGTCAGATCGTCT  
ATCAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCCACTCTCGAGGTCAATCTCGAAGACATCGAAGAAATC  
CGTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTGCTGATGGACAATTTTTTCGCTGTTTGCTTATAT**GC**  
**GGCCGC**GAG

<b>Termociclado</b>	94° C	5'	x 35 ciclos
	94° C	30''	
	60° C	30''	
	70° C	60''	
	70° C	5'	

### **Amplificación *rapD* C terminal para clonado en pET-22b**

<b>Primer forward</b>	<i>rapD</i> -NdeI_fwd 5' – GGAGGCC <u>CATATG</u> TACCATGAAAACCTGGAT – 3'
<b>Primer reverse</b>	<i>rapD</i> -NotI_rev 5' – CTCGCGGCCGCATATAGCAAGGCAA – 3'

**Amplicon** 479 pb  
GGAGGCCCATATGTACCATGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCAGGGCAGATAA  
TTTCTCTCTGCCTGACTATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAAGTGACGCTTC  
TGAACGGCATCGTCTACGACACGATCCCGGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGGTTTCAGCGAT  
ACCGTTCTATCGCCGGTTCTGCGCCCGTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAGAATTCACCTT  
TCAGAGCGTTTCGATTGCCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTCACCTCACGCTCACCGCGCTGAACG  
ACGGTCAGATCGTCTATCAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCCACTCTCGAGGTCAATCTCGAA  
GACATCGAAGAAATCCGTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTCTGATGGACAATTTTTTCGCTGTT  
TGCCTTGCTATATGCGGCCGCGAG

<b>Termociclado</b>	94° C	5'	x 35 ciclos
	94° C	30''	
	58.8° C	30''	
	68° C	45''	
	68° C	5'	

### **Primers utilizados para amplificación por PCR**

En la siguiente tabla se detallan los primers diseñados para la amplificación de los diversos genes clonados. Se detalla también en el anexo de la secuencia, los sitios de apareamientos de los primers con el ADN genómico.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>	<b>Usado para</b>
<i>ΔrapD</i> -A-fwd_BamHI	GAGTAGGGATCCTTCTTCTTCATAGGCGT	Delección gen <i>rapD</i>
<i>ΔrapD</i> -A-rev_linker	TCGATACTCTCCTTCTTTCAGTGGCTTTGCATTTGTCATTTG	
<i>ΔrapD</i> -B-fwd_linker	CTGAAAGAAGGAGAGTATCGATTTTCGCTGTTTGCCTTGCTA	
<i>ΔrapD</i> -B-rev_BamHI	ATTGGATCCAATCCGACCCAGTGCGAG	Expresión constitutiva gen <i>rapD</i>
<i>rapD</i> full-fwd_KpnI	GAAGGTACCGACAAATGCAAAGCCAACT	
<i>rapD</i> full-rev_XbaI	GCTCCCTCTAGACTATAGCAAGGCAAACA	Expresión heteróloga en <i>E. coli</i>
<i>rapD</i> full-NdeI_fwd	GCCCTCCATATGACAAATGCAAAGCCAACT	
<i>rapD</i> -NdeI_fwd	GGAGGCCATATGTACCATGAAAACCTGGAT	

<i>rapD</i> -NotI_rev	CTCGCGGCCGCATATAGCAAGGCAAA	
A34 <i>plyB</i> fwd	ATGAATTCCAAGGCGATATGGCATC	Expresión constitutiva
A34 <i>plyB</i> red	ATTCTAGAATCAGGTCAGCAAGCCAT	gen <i>plyB</i>
T7	AATACGACTCACTATAG	Genotipado de cepas
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	portadoras del vector pBBR1-MCS2 y PBBR1-MCS5

**Secuencia genética gen *rapD* (RL2702 / Q1MFT2) y regiones 700 pb río arriba y río abajo**

CCTTCCTCGTAGATGTCGATCTGGGCCGGCAGGTTATTCCCTGGTATTCTTCTCCTCGAACATTTTG  
 ACCGGCGCGAGCTGCGAGTAACGCAGGTTCTTCTTCTCATAGGCGTCCATGACGCCGCGGGCGAGC  
 GCTGCCGTATCCTCGCCATCGGTCCAGACCCTGCGGCCTTTCTTGCCCATGATGATCGCCGTGCCG  
 GTGTCCTGGCACATGGGCAGCACGCCGCCGGCGGCATATTGGCGTTCTTCAAGAGATCGTAGGCG  
 ACAAACGGTCATTGTCGGTTCGCTTCGGGATCGTCGAGGATCGAGGCGAGCTGTTTCAGGTGGCCG  
 GGACGCAGCAGGTGGTTGATGTCGGCAAAGGCGGTTTCGGCCAGCAGGCGGATGCCTTCCGGCTCG  
 ACGGTCAGGATCTCCTGGCCCTTGAACGTATCGACCAGACATGGTCGCCGCTGATCTTGCATAG  
 GGGGTGGCATCCTTGCCGAGGGGGAAGAGATCGTCAGCCATCGAAGTGACCTTTCTGGTAGGGCGT  
 GCGTCGCTAGATTGGAACCGGTCTAAATCCGCTGCGGGGCAAAGCAATCGGGACCACGCGCGGCG  
 GATGAGGCGAACCGTTCGAAATCGGTCCGACAAAAAGACGACTTCAAGTTGCCTTCTTTTCGAGGCC  
 AGTACATATTCCCAGCAGCGTTAACCTGCCGGGGCTTCAAATGACAAATGCAAAGCCAAGTCTGTGT  
 CGACGACCTTCTCGTTTTTTTTTCGAAGACAATTGGATCCGCGGGAATCTGCTGCGCCTCTCCAGCGA  
 TCCCGAGGGAGCGGACATGTATGTTTCGCTTCGTCATGGCGTGCATCGACGCCAAACATGGGCC  
 TGACCACGAAACGATCATAAGGGGCGAGTACGGAACCTTCAGACTGAAACCTGACGGTCACTTCGA  
 GTACGAGCTGGACTACACGCTCGACGTCGTGAAAAATTTAACGAAATACGATCAGCTCATCGAGAA  
 GCTGAGCTTCAAGATGTCAGATGGCTCAGGAGGCACGGACTTCGGCGTGTGACGCTCGCGATCGA  
 CGGCGTCAACGAAGGCGACAAA TACCATGAAAACCTGGATTTTCGACGATTTGGGCGTCTTATCCAG  
 GGCAGATAATTTCTCTCTGCCTGACTATCGCAACTTTGCGCTCTCGGTGAATGGAAGCCACGAAGT  
 GACGCTTCTGAACGGCATCGTCTACGACACGATCCCAGGCGTCAACGCCATCACCGAGGACGGTTT  
 CAGCGATACCGTTCTATCGCCGGGTTCTGCGCCCGTAAGCTTGAAAATGCTCGATGGCGGAGAATT  
 CACCTTTCAGAGCGTTTCGATTGCCGAATTGTCGGCAGCGCCCTTTCACCTCACGCTCACCGCGCT  
 GAACGACGGTCAGATCGTCTATCAGCAGGAGCTCGAGGTCACCGGCCCACTCTCGAGGTCAATCT  
 CGAAGACATCGAAGAAATCCGTTTCGACTTCATGGGCAATTCTGTCGTGATGGACAATTTTTTCGCT  
 CTTTTCGCTTTCCTATAG GCTGGAGGGAGTTCGAGGCGTTGCGGCATATCACCTTGGCCCCGCGAGCGG  
 GGGTCCGAAGGACGGGTTCGAGACCTGTGGCTCGACCCCGGTTGGTGGCGGCAGCCGGATGAGGGGC  
 TGTGGCCTATGCGACCTTCTACTTTCGGCCCCGATCATCGTTTCCGGCCGGACGATCGCGTCATACT  
 CTTCGACGTCACTAGGCCGCTGGCGAGGCTCTCTTCCCTTCAGCGTCGTGCCGTTCTTGTGGGCGG  
 TCTTGGCGATCTTGGCGGCTGCGTCGTAGCCGATCTTCGGGGCAAGTGCCGTCACCAGCATCAGCG  
 AGCGTTCGAGGCCGGCCTTGATATTGTCCTCGCGCGCCTCGATGCCGACGACGCAATTGTCGGTGA  
 AGGAGACGGCGGCGTTCGGCGAGCAGCTGCACCGACTGCAGGAAATATAGGCCATCATCGGATTGT  
 AGACGTTGAGCTCGAAATGGCCCTGGCTGTCGGCGAAGGTCAGAGCCGCGTTGTTGCCGAAGATAT  
 GGATGCAGACCTGCGTCAGCGCCTCGCACTGGGTCGGATTGACCTTGCCGGGCATGATCGAGGAGC  
 CGGGCTCGTTTTCCGGCAGCGCCAGCTCGCCGAGGCCGGCGCGTGGGCCGGAACCGAGCAGGCGGA  
 TGTCGTTGGCGATCTTGAAGAGGGCGGCGGCTGCCGCATTGATGGCGCCGTGGGAA

- ΔrapD-A-fwd\_BamHI     rapDfull-rev\_XbaI
- ΔrapD-A-rev\_linker     rapDfull-NdeI\_fwd
- ΔrapD-B-fwd\_linker     rapD-NdeI\_fwd
- ΔrapD-B-rev\_BamHI     rapD-NotI\_rev
- rapDfull-fwd\_KpnI     Secuencia codificante rapD

## Digestión de ADN con enzimas de restricción

La digestión de ADN plasmídico o de productos de PCR se realizó según el siguiente protocolo de las enzimas de restricción provisto por New England Biolabs.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O MilliQ	16.3 µl
Buffer 10X	2µl
BSA Acetilada 10 µg/µl	0.2 µl
DNA	c.s.p. 1 µg
Enzima(s) de Restricción 10u/µl	0.5 µl
Fosfatasa Alcalina (cuando requiriese) 1 u/µl	1 µl

Las enzimas se incubaron a la temperatura óptima de corte por 4 horas. Una vez cumplido este tiempo se inactivó la reacción por calentamiento a 65° C por 15 minutos.

En el caso de clonados con una única enzima de restricción, para evitar la religación del plásmido se agregó fosfatasa alcalina a la mezcla de reacción de la digestión 2 horas después de haber iniciado la misma y se dejó actuar hasta completar las 4 horas.

## Purificación del ADN de geles de agarosa

La construcción de nuevos vectores requiere la incorporación de insertos amplificados mediante PCR en plásmidos previamente digeridos con enzimas de restricción. Dado que la digestión de los vectores genera fragmentos que pueden interferir durante el proceso de ligación. los insertos de PCR y vectores abiertos mediante la digestión fueron purificados utilizando el kit “Wizard® SV Gel and PCR clean-up system” #catálogo A9282 - PROMEGA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## Ligación

La ligación de fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR con plásmidos o vectores que fueron digeridos con enzimas de restricción se llevó adelante siguiendo el protocolo provisto por New England Biolabs.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O MilliQ	c.s.p. 20 µl
10X T4 DNA Ligasa buffer	2 µl
Plásmido purificado	0.02 pmoles
Inserto purificado	0.06 (o 0.1) pmoles
T4 DNA Ligasa	1 µl

Las ligaciones se incubaron overnight a 16° C y se inactivaron las enzimas por calentamiento a 65° C durante 10 minutos previo a la transformación de bacterias.

Para el cálculo de molaridad se utilizó la siguiente fórmula tabulada para DNA doble cadena lineal:

$$M = (607.4 * pb + 158)g * mol^{-1}$$

Donde:

- M = Masa molar del fragmento doble cadena de DNA en g/mol  
 pb = Longitud del fragmento doble cadena, sea plásmido o inserto (sin unidades)

### Preparación de *E. coli* electrocompetentes

A partir de un cultivo fresco en placa de LB sin antibióticos de *E. coli* DH5 $\alpha$  se inocularon 5 ml de LB sin antibiótico y se incubó overnight a 37° C con agitación de 220 rpm (cultivo semilla).

Se inocularon 500 ml de medio 2xYT con 5ml del cultivo semilla y se crecieron hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 – 0.6. Se trasvasaron las células a tubos pre enfriados y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se centrifugaron las bacterias a 4000 x g durante 20 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante. Manteniendo siempre las células en frío se resuspendieron suavemente con glicerol 10% frío preparado en agua MilliQ y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados más de la misma forma (3 lavados total con incubación de 30 minutos en frío) y se resuspendió el pellet en un volumen de glicerol 10% frío. Se alicuotaron las bacterias de a 50  $\mu$ l en tubos eppendorf pre – enfriados y se volcaron sobre nitrógeno líquido. Las bacterias electrocompetentes se almacenaron a -80° C.

#### **Medio 2 x YT**

Triptona	16 g/L
Extracto de Levadura	10 g/L
NaCl	5 g/L
NaOH 5N	C.s.p. pH 7

### Transformación mediante electroporación

Para la electroporación se incubó 1 $\mu$ l de una ligación o de una dilución de ADN plasmídico (generalmente entre 1 y 10  $\mu$ g de DNA disuelto en agua milliQ o apirógena) con una suspensión de bacterias electrocompetentes en cubetas de electroporación de 2mm (BioRad). El electroporador utilizado fue un Gene Pulser Transfection System (BioRad) en las condiciones detalladas abajo.

Luego de la electroporación se resuspendieron las bacterias en 1 ml de medio de recuperación SOC y se incubaron por 1 hora a 37° C a 220 rpm. Finalmente se plaquearon en medio LB con los antibióticos que permiten la selección de las bacterias que recibieron el ADN de interés mediante la electroporación.

#### **Condiciones de electroporación**

Capacitancia	25 $\mu$ FD
Voltaje	2.5 V
Resistencia	200 $\Omega$

#### **Medio de recuperación SOC**

Extracto de levadura	0.5%
Triptona	2%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

### Conjugación bi y triparental

La transferencia de plásmidos a *R. leguminosarum* se realizó por conjugación. La transferencia del plásmido pk18mobsacB fue realizada por conjugación biparental. Se obtuvieron cultivos líquidos overnight de la cepa dadora *E. coli* S17 portadora del vector y de 48 hs de la cepa receptora (ambos en fase estacionaria). En un tubo eppendorf se colocaron 700 µl de la cepa dadora y 300 µl de la cepa receptora, se separaron las bacterias por centrifugación a 1180 x g por 4 minutos y se resuspendieron en 20µl de medio TY. La suspensión se inoculó en una placa de medio TY sin antibióticos y se incubó 16 – 24 horas a 28° C. Las bacterias se cosecharon en 500 µl de medio TY y se sembraron 100 µl de diluciones seriadas en placas frescas de medio Y – manitol conteniendo los antibióticos de selección (dado que la cepa dadora es resistente a estreptomycin al igual que la cepa receptora, se utilizó medio mínimo para desfavorecer el crecimiento de *E. coli* S17).

La transferencia de los plásmidos pBBR se realizó por conjugación triparental. Brevemente, en una placa fresca de medio TY sin antibiótico se coinocularon la cepa receptora (*R. leguminosarum*), la cepa dadora (DH5α) y la cepa helper (RK600) en proporción aproximada 2:1:1 mientras que en otra zona de la placa se inocularon las 3 cepas por separado (zona control). Las placas se colocaron en estufa a 28° C durante 16 – 24 horas y se realizaron placas réplica en TY con los antibióticos apropiados para realizar la selección. Se estrió de las zonas de crecimiento (corroborando que no hubiera crecimiento en los inóculos por separado) en placas nuevas de TY con los antibióticos de selección para obtener colonias aisladas. Se seleccionaron las cepas transconjugantes por resistencia a antibiótico y por PCR.

### Obtención de mutantes por recombinación homóloga

Las colonias transconjugantes obtenidas por conjugación biparental fueron estriadas en paralelo en placas de TY-estreptomycin-kanamicina con y sin sacarosa 10%. Se corroboró la presencia del plásmido en presencia del antibiótico (Kan<sup>R</sup>). En presencia de sacarosa se seleccionan negativamente las transconjugantes que fueron capaces de integrar el plásmido y conservan el gen *sacB* mientras que en el caso de las que lograron excindir el plasmido y perder el gen suicida por recombinación homóloga persisten en presencia de sacarosa. Aquellas colonias que fuesen sensibles a sacarosa y resistentes a kanamicina fueron cultivadas overnight en medio líquido TY sin antibióticos y plaqueadas en TY-estreptomycin con y sin sacarosa 10% (por tratarse de transconjugantes, el plasmido puede mantenerse integrado al cromosomal bacteriano y en aquellas bacterias en las que se produce doble recombinación homóloga el gen *sacB* junto con el plásmido se pierden siendo Kan sensibles). Aquellas colonias que fuesen kanamicina sensibles y sacarosa resistentes fueron estriadas nuevamente en placas de medio fresco TY-estreptomycin para obtener colonias aisladas y analizadas por PCR para corroborar la delección del gen de interés.

### Preparación y purificación de proteínas recombinantes

#### RapD C terminal

Se clonó el dominio C terminal de la proteína (Sin el dominio Ra/CHDL) en un vector de expresión heteróloga inducible pET-22b para obtener la construcción pET-22b*rapDCt*. La misma se utilizó para transformar *E. coli* BL21 y obtener proteína recombinante taggeada con 6 Histidinas terminales para



inmunizar ratones y obtener anticuerpos policlonales específicos contra RapD. Los cultivos de la cepa BL21 DE3 – pET-22*brapD* Ct con una DO ~0.6 – 0.8 se indujeron con 0.5 mM de isopropiltiogalactósido (IPTG) a 18° C overnight con agitación de 200 rpm. Se cosecharon las bacterias y se realizó un lavado del pellet con Tris HCl 30 mM pH 8. Se resuspendieron en buffer A – IMAC con el agregado de 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se lisaron en prensa francesa a 18000 psi 5 veces. El lisado se ultracentrifugó durante 1 hora a 100000 x G y el sobrenadante se filtró por una columna de níquel Ni-NTA HiTrap Chelating column (GE Healthcare) la cual cuenta con una resina quelante capaz de unir níquel. Este metal cumple la finalidad de funcionar como ancla de los tags de histidina permitiendo una purificación por afinidad de la proteína de interés. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de imidazol en un lapso de 40 minutos (buffer B IMAC). Las fracciones conteniendo RapD Ct se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -80° C.

### RapD

Análogamente al apartado anterior, se obtuvo una cepa de expresión heteróloga de *E. coli* BL21 DE3 que expresase la secuencia codificante de RapD completa con un tag de histidina (contenida en el plásmido pET-22*brapD*). Los cultivos de la cepa BL21 DE3 pET-22*brapD* se indujeron con 0,1 mM de IPTG overnight a 18° C y una vez cosechados se resuspendieron en buffer A – IMAC con el agregado de 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y sin agregado de PMSF. El sobrenadante ultracentrifugado se filtró en una columna Ni-NTA HiTrap Chelating column (GE Healthcare) y la elución se realizó con buffer B – IMAC suplementado con CaCl<sub>2</sub> 1 mM en un gradiente lineal de 0 a 100% de buffer B en 40 minutos. Las fracciones conteniendo RapD con mayor grado de pureza se juntaron y dializaron contra Buffer S200 suplementado con etilen glicol-bis (β-aminoetil éter)-*N,N,N',N'*-ácido tetra acético (EGTA) 10 mM overnight en cámara fría para decalcificar la muestra. El pool de fracciones decalcificado fue concentrado por ultrafiltración y filtrado por peso molecular en una columna Superdex 200 preparativa (Pharmacia Biotech) en Buffer S200 sin el agregado de EGTA. Las fracciones conteniendo RapD se concentraron nuevamente por ultrafiltración, se cuantificaron por el método de Bradford y se almacenaron en ultrafreezer a -80° C.

#### Buffer A – IMAC:

20mM Tris-HCl pH 8  
NaCl 0.5M  
Imidazol 10mM  
(CaCl<sub>2</sub> 1mM)

#### Buffer B - IMAC:

20mM Tris-HCl pH 8  
NaCl 0.5M  
Imidazol 500mM  
(CaCl<sub>2</sub> 1mM)

#### Buffer S200:

20mM Tris-HCl pH 8  
NaCl 150mM

## Cuantificación de proteínas por Bradford

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando “Bradford Reagent 5X” (BioPack) según las indicaciones del fabricante. Brevemente se colocaron 200µl de reactivo de Bradford 1X en una placa de 96 pocillos, se agregó la muestra y se llevó a un volumen final de 250µl. Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de 0 a 5µg. Las muestras se dejaron reaccionar entre 5 y 10 minutos antes de leer la absorbancia a 595nm en un lector de placas Dtx 880 multimode detector – Beckman Coulter.

## Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y tinción con Coomassie Blue

Con el objetivo de separar por peso molecular las proteínas obtenidas de los cultivos extracelulares de *Rhizobium* y poder identificar las proteínas de interés mediante técnicas inmunológicas, las muestras proteicas se calentaron a 95 – 100° C por 5 minutos y fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida 10% o 15% según el tamaño de proteínas de interés a separar.

<b>Solución stock</b>	<b>Stacking gel</b>	<b>gel corrida 10%</b>	<b>gel corrida 15%</b>
H <sub>2</sub> O	3.4 ml	4 ml	2.3 ml
Tris HCl 1 M pH 6.8	630 µl	-	-
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	-	2.5 ml	2.5 ml
Acrilamida (30% Acrilamida – 0.8% Bisacrilamida)	830 µl	3.3 ml	5 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED	2.5 µl	5 µl	5 µl
Volumen final	5 ml	10 ml	10 ml

### Tinción con Coomassie Blue R-250

Una vez terminada la corrida electroforética se colocaron los geles en solución de tinción al menos 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego se destiñeron con solución decolorante *overnight*. Alternativamente, los geles se destiñeron colocándolos en agua y calentándolos en el microondas por 10 minutos a potencia media (450 W).

### Solución de tinción:

0.1% Coomassie Blue R – 250  
40% Metanol  
10% Ácido acético

### Solución de desteñido:

40% Metanol  
10% Ácido acético

## Western Blot

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare) a 100V durante 1 hora y media en buffer de transferencia frío. Una vez transferidas se enjuagó la membrana con TBS-Tween20 (TBT-T) y se bloqueó durante al menos dos horas en leche descremada 5% en TBS-T. Se

realizaron 3 o 4 lavados de 5 – 10 minutos cada uno con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario en TBS – BSA 1% overnight a 4° C con agitación. La membrana se lavó 3 o 4 veces de 5 – 10 minutos con TBS-T y se incubó con la dilución apropiada del anticuerpo secundario hecha en TBS – BSA 1% a temperatura ambiente durante 1 hora y media. Finalmente se realizaron dos lavados con TBS-T y 2 lavados con TBS de 5 minutos cada uno. La membrana fue revelada utilizando ECL Prime (GE Healthcare) y un lector ImageQuant LAS4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences) según indicaciones del fabricante.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Observaciones</b>
α – RapD	1:8000	Antisuero policlonal de ratón. Esta Tesis
α – RapA2	1:5000	Antisuero policlonal de conejo. Abdian et al., 2016
α – PlyB	1:10000	Antisuero policlonal de conejo. Abdian et al., 2016
α – ratón – HRP	1:60000	Antisuero monoclonal de cabra. Comercial (Jackson ImmunoResearch – Producto 115-036-062)
α – conejo – HRP	1:30000	Anticuerpo monoclonal anti conejo. Comercial. Préstamo Laboratorio Dr. Pitossi

#### **Buffer de Transferencia**

Tris Base	3.75 g/L
Glicina	18 g/L
Metanol	20%

#### **TBS**

Tris HCl pH 8	10 mM
NaCl	150 mM

#### **TBS – Tween20**

Tris HCl pH 8	10 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0.05%

## **Preparación de antisuero policlonal en ratón**

### **Antisuero anti-RapD C terminal**

A partir de una preparación de RapD C terminal parcialmente purificada (detallado en apartado: Purificación de proteínas) se obtuvo el antígeno para inmunizar ratones. Por cada ratón de un total de 5 se prepararon 100 – 120 µg de proteína recombinante. Las proteínas recombinantes fueron sembradas en geles de poliacrilamida y una vez realizada la corrida electroforética se fijaron los geles con glutaraldehído 2% durante al menos 40 minutos con agitación. Se realizaron 3 – 4 lavados de 60 minutos con agua MilliQ y se dejó en agua overnight con agitación. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue y se escindieron las bandas correspondientes a RapD C terminal con bisturí estéril. Las bandas proteicas fueron liofilizadas y conservadas a -80° C. Se disgregó la muestra liofilizada con un mortero y se resuspendió en PBS estéril. Se agregó 1 volumen de adyuvante y se emulsionó la mezcla previa a la inyección de los animales.

### Protocolo de Inmunización

Los ratones fueron inyectados con 300  $\mu$ l de suspensión (conteniendo 100 – 120  $\mu$ g de antígeno) en cada evento de inmunización por un total de 1 inyección y 4 boosters. En la tabla siguiente se detalla el cronograma de inmunización y los adyuvantes utilizados:

<b>Días post inyección</b>	<b>Adyuvante</b>	<b>Observaciones</b>
0	Freund Completo	Pre Sangrado – Suero pre inmune
+14	Freund Incompleto	-
+28	Freund Incompleto	-
+42	Freund Incompleto	Pre sangrado – Suero inmune
+56	Freund Incompleto	-
+62	-	Sangrado total

La especificidad de los antisueros se corroboró por western blot utilizando las mismas muestras de antígeno que fueron inyectadas en los ratones y cultivos de proteínas extracelulares de *R. leguminosarum* con diferentes diluciones del anticuerpo (desde dilución 1:1000 a dilución 1:8000). Como control negativo se utilizó el suero pre inmune de los ratones.

### **Preparación de proteínas extracelulares de *Rhizobium***

Las cepas de *R. leguminosarum* se cultivaron a 28° C en medio rico o en medio mínimo hasta la  $DO_{600nm}$  de cultivo deseada. Se eliminaron las bacterias por centrifugación a 10000 x g dos veces durante 15 minutos y se agregó al sobrenadante ácido tricloroacético (TCA) hasta llegar a una concentración final de 10%. Las muestras se incubaron 16 – 24 hs en frío. Las proteínas precipitadas se separaron del sobrenadante por centrifugación a 6800 x g durante 1 hora y media a 4° C. Se lavaron los pellets de proteínas con acetona fría 100% 2 veces y se dejaron secar al aire durante al menos 24 horas para eliminar rastros de la misma. Las muestras fueron resuspendidas en cracking buffer y conservadas a -20° C.

#### **Cracking buffer 3X:**

SDS 12%  
 $\beta$  – Mercaptoetanol 6%  
Glicerol 30%  
Azul de bromofenol 0.05%  
Tris HCl 150 mM pH 7  
Urea 8 M

### **Preparación de proteínas de superficie de *Rhizobium***

Las cepas de *R. leguminosarum* se cultivaron a 28° C en medio rico o en medio mínimo a partir de diluciones estandarizadas a una  $DO_{600nm}$  de 0.01 hasta una  $DO_{600nm}$  de 0.7 – 0.8 (fase exponencial de crecimiento). Se cosecharon las células por centrifugación a 10000 x g durante 15 minutos y se lavaron con Tris HCl 30 mM pH 8.4. Se resuspendió el pellet en buffer Tris HCl 30 mM pH 8.4, NaCl 1.5 M y se pasó el cultivo por una jeringa de 26 o 27 G al menos 20 veces. La presión mecánica a la que es sometido el cultivo en un buffer con alta fuerza iónica permite el desprendimiento de las proteínas interactuando con la superficie de la bacteria. Se centrifugó la suspensión a 5500 x g durante 20 minutos para eliminar cualquier resto de células y luego a 21500 x g durante 1 hora. Se

tomó el sobrenadante y se concentraron las proteínas por precipitación con TCA (Ver apartado anterior).

### **Análisis proteómico del secretoma de *Rhizobium leguminosarum***

Para el análisis por espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida de las proteínas secretadas al medio extracelular (secretoma) de *Rhizobium*, se obtuvieron preparaciones de las mismas a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600nm}$  0.7 – 0.8) en medio rico TY con los antibióticos apropiados. El pellet obtenido a partir de la precipitación de proteínas con TCA 10% fue parcialmente resuspendido en bicarbonato de amonio 50 mM. Luego de cuantificar las muestras por Bradford se enviaron al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires) donde fueron analizadas. A continuación, se detalla el protocolo seguido:

Se tomaron 20  $\mu$ g de proteínas de cada muestra, se redujeron con ditiotreitól (DTT) 20 mM durante 45 minutos en buffer Bicarbonato de amonio 50 mM a 56° C y se alquilaron con Iodoacetamida (IAA) 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Luego se realizó la digestión con tripsina. A los digeridos con tripsina se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por *Speed Vac* y vueltas a resuspender con 10  $\mu$ l de Ácido Fórmico 0,1%. Se analizó el contenido peptídico por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. La ionización de las muestras se realizó por electrospray y el análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Proteome Discoverer.

Se utilizó un cromatógrafo marca Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa (C18, Thermo Scientific, modelo EASY-Spray Accucore (P/N ES801)). El análisis de los espectros obtenidos se analizó con el programa Proteome Discoverer utilizando a *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 como base de datos.

### **Morfología de la macrocolonia**

Se estudió la capacidad de desarrollar biofilm sobre una superficie semisólida, mediante el cultivo de macrocolonias sobre placas de agar en diferentes condiciones nutricionales. Se sembraron 20  $\mu$ l de suspensiones estandarizadas de bacterias a una  $DO_{600nm}$  de 0.05. Para observar la presencia de (1-4)  $\beta$  – D – Glucopiranosidos secretados se usó Rojo Congo 10 $\mu$ g/ml y para detectar la presencia de fibras amiloides se utilizó Coomassie Brilliant Blue 20 $\mu$ g/ml. Los colorantes se utilizaron por separado y en combinación adicionados al medio de cultivo (Serra et al. 2013; Voza-Abdian et al. 2016).

### **Ensayo de Actividad Glicanasa – Degradación CMC**

El ensayo de actividad glicanasa se realizó sobre placas de agar suplementadas con carboximetilcelulosa (CMC) 0.1%. La misma fue adicionada al agar durante la preparación de las placas de un stock autoclavado de CMC 2,5% (Zorreguieta et al. 2000).

Se inocularon las placas con 20  $\mu$ l de suspensiones bacterianas en una  $DO_{600nm}$  de 0.05 y se colocaron en estufa a 28° C durante 72 y 120 horas. Transcurrido el período de incubación se lavaron las bacterias de la placa con agua destilada o agua MilliQ no estéril frotando suavemente la superficie del agar con los dedos. El lavado se repitió al menos 3 veces hasta remover completamente las bacterias de la placa. Se cubrió la superficie del agar con una solución de Rojo Congo 0.15% y se

mantuvo en agitación orbital durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el exceso de colorante con NaCl 1M durante 5 minutos con agitación. Finalmente, el colorante se fijó con una solución de ácido acético 5%. El tiempo de coloración varió dependiendo de la intensidad con la que se fijara el colorante. El rojo congo vira hacia el azul violáceo al revelarlo con el ácido acético y las zonas donde hubo degradación del polímero pierden la coloración y se observa un halo traslúcido. La reacción se frenó por lavado con exceso de agua.

### Formación de biofilm sobre placas de poliestireno. Cuantificación con cristal violeta

La formación de biofilm sobre la superficie de placas de poliestireno se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner) y se evaluó mediante la tinción con cristal violeta. Se inocularon 100 µl de una suspensión bacteriana a una  $DO_{600nm}$  de 0.001 por pocillo y se crecieron a 28° C durante 5 – 7 días en agitación o estático en cámara húmeda con estreptomycin como único antibiótico en condiciones de privación de nutrientes (medio mínimo Y – manito) o de exceso de nutrientes (medio rico TY) (Russo et al. 2006).

Transcurrido el tiempo de cultivo se midió la absorbancia de los cultivos de cada pocillo a 595nm utilizando un lector de placas Dtx 880 multimode detector – Beckman Coulter. Se removió el cultivo de cada pocillo utilizando una pipeta multicanal y se lavaron los mismos utilizando 200 µl de solución fisiológica. La biomasa adherida al plástico se tiñó con 150 µl de cristal violeta 0.1% y se dejó en incubación estática al resguardo de la luz por 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el cristal violeta y se realizaron dos lavados con solución fisiológica. El colorante retenido en las bacterias que permanecieron adheridas a las paredes del pocillo se extrajo con etanol 96% y se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos donde se midió la absorbancia a 595 nm.

### Cálculo de adhesión al soporte inerte

Los valores de absorbancia de cristal violeta obtenidos para cada cepa se calcularon según la siguiente fórmula:

$$CV_{595nm}^{cepa} = \frac{(CV_{cepa} - CV_{blanco})}{(DO_{cepa} - DO_{blanco})}$$

Donde:

- $CV_{cepa}$  = Absorbancia a 595nm del cristal violeta de los pocillos con bacterias
- $CV_{blanco}$  = Absorbancia a 595nm del cristal violeta de los pocillos control con medio de cultivo
- $DO_{cepa}$  = Densidad óptica del cultivo a 595nm
- $DO_{blanco}$  = Densidad óptica del medio de cultivo a 595nm

Para el análisis comparativo entre cepas se relativizaron los valores de CV obtenidos por cada cepa a los valores obtenidos por la cepa silvestre (wt). En caso de que las cepas a comparar presentaran DO similares, únicamente se comparó los valores de absorbancia del cristal violeta.

### Ensayos de Motilidad tipo *swimming* y *swarming*

#### Swimming

El análisis de movilidad tipo *swimming* se realizó utilizando placas de medio con agar 0.3%. Se crecieron bacterias durante 48 hs a 28° C hasta llegar a fase estacionaria (comúnmente una  $DO_{600nm} \sim 1.2 - 1.3$ ). Se inocularon las placas con escarbadiantes estériles descargando aproximadamente 5 veces cada cepa en el mismo punto sin pinchar el agar para evitar el

enquistamiento de las bacterias y se crecieron durante 72 hs a 28° C. Se cuantificó la movilidad como el diámetro de crecimiento alcanzado por cada cepa (Merritt et al. 2007)

### Swarming

Los análisis de swarming se realizaron inoculando 5 µl de suspensiones bacterianas en estado estacionario (comúnmente una  $DO_{600nm} \sim 1.2 - 1.3$ ) o suspensiones estandarizadas a una  $DO_{600nm}$  de 0.05 sobre placas de agar 0.6%. Se crecieron las bacterias durante 72 hs a 28° C y se cuantificó el swarming como el diámetro del halo de crecimiento (Tambalo et al. 2010).

### **Preparación de EPS**

Distintas cepas de *R. leguminosarum* fueron crecidas a 28° C en medio mínimo Y durante 5 días a 200 rpm. Se clarificaron los medios de cultivo por centrifugación en frío (5 – 10° C) a 10000 x g durante 15 minutos dos veces. Se adicionó NaCl 5M al sobrenadante hasta llegar a una concentración final de 0.25 M y se precipitó el polisacárido por agregado de 2 ½ volúmenes de etanol 100%. Se agitaron las suspensiones y se dejó precipitar overnight a 4° C. Luego se descartó el sobrenadante por centrifugación a 6800 x g a 4° C durante 15 minutos y se lavó dos veces con etanol 70% y 90% respectivamente. Finalmente se dejó secar el pellet al aire durante al menos 48 hs y se resuspendió en agua milli Q.

### Cuantificación de EPS

#### Método de Antrona – Ácido sulfúrico (Loewus 1952)

El método de antrona – ácido sulfúrico se utilizó para cuantificar la cantidad de hexosas presentes en una mezcla compleja de polisacárido obteniéndose un valor de “equivalentes de glucosa”. En 1 ml de solución conteniendo el polisacárido disuelto se agregaron 250µl de Antrona 2% disuelta en Acetato de Etilo. Se mezcló la solución, se adicionaron 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 M y se homogeneizó por vortex permitiendo la hidrólisis del polisacárido y su interacción con la antrona precipitada por la evaporación del acetato de etilo. Se dejó reaccionar la solución al menos 10 minutos y se midió la absorbancia a 620 nm. Para la curva de calibración se utilizó glucosa sabiendo que la linealidad con la técnica se obtiene hasta los 80 µg de la misma.

#### Método de Meta-Hidroxidifenilo (Blumenkrantz & Absoe-Hansen 1973)

La cuantificación por este método se basa en la aparición de un producto coloreado al reaccionar con los ácidos glucurónicos, galacturónicos e idurónicos. Se utilizó para obtener un valor más representativo de la cantidad de unidades repetitivas del polisacárido ya que la estructura del EPS de *R. leguminosarum* es un octasacárido en tándem de glucosa, ácido glucurónico y galactosa en proporción 5:2:1. En 200 µl de solución conteniendo el polisacárido se agregaron 1,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18M. Se incubó por 5 minutos en baño de agua a 100° C y se enfriaron en hielo hasta llegar a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 20 µl de meta-hidroxidifenilo 0.15% (disuelto en NaOH 0.5%), se homogeneizó la solución con vortex y se midió, al cabo de 10 minutos, la absorbancia a 520 nm.

### Tratamiento del EPS con proteinasa K

La purificación de polisacárido para eliminar proteínas contaminantes se llevó a cabo incubando el EPS con proteinasa K de acuerdo al protocolo propuesto por Jefferson & Cerca (2006). Se colocó el EPS en el buffer de digestión y se incubó a 60° C por 1 hora. La proteinasa K fue inactivada por incubación a 80° C durante 30 – 40 minutos y se eliminó de la solución por centrifugación a 10000 - 16000 x g durante 30 minutos. El EPS en solución fue precipitado y resuspendido tal cual fue descrito en el apartado “Preparación de EPS”. Una vez resuspendido fue cuantificado nuevamente por el método de ácidos urónicos.

#### **Buffer de digestión:**

50 mM Tris-HCl pH 8  
 Proteinasa K 2 mg/ml  
 EPS 1 mg/ml (según ácidos urónicos)

#### **Perfil de EPS por peso molecular**

Se analizó el perfil de especies del EPS de acuerdo al peso molecular. Para ello, se tomaron muestras de EPS de las cepas a ser analizadas obtenidas de cultivos de 100 ml en medio Y – manitol crecidas a 28° C durante 5 días, se llevaron a una concentración final de 1 mg/ml según ácidos urónicos y se incubaron a 100° C durante 10 minutos para coagular las proteínas. Las muestras se centrifugaron por media hora a 10000 x g y se corrieron de forma isocrática 200 µl en una columna Superosa 6 HR 10/30 equilibrada con buffer fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M. Se colectaron fracciones de 1 ml las cuales fueron cuantificadas posteriormente según el método de Antrona – Ácido sulfúrico. Como marcadores de peso molecular se utilizaron:

<b>Marcador</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Observación</b>
Blue Dextran	2 MDa	Marca V0 (volumen muerto)
Acetona	58 Da	Marca V0 + Vi (volumen total de la columna)
Tiroglobulina A	67 kDa	
Ribonucleasa A	13.7 kDa	

#### **Inmunofluorescencia**

Para analizar la localización de RapD o PlyB en cultivos en suspensión, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Cultivos starter/semilla se diluyeron hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.025 y se cultivaron por 24 hs a 28° C en medio rico TY con los antibióticos apropiados. Se cosecharon las células en fase exponencial de crecimiento (DO<sub>600nm</sub> 0.8) y se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS a 28° C durante 20 minutos. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y se bloquearon con gelatina 0.2% (RapD) o 2% (PlyB) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras, se incubaron con antisueros policlonales de ratón anti-RapD (1:200) o de conejo anti-PlyB (1:300) en buffer de bloqueo por 1 hora y media a temperatura ambiente. Luego, se reveló la presencia de RapD o de PlyB empleando anticuerpos secundarios anti – mouse conjugados a Cy3 (1:200) o anticuerpos secundarios anti – conejo conjugado a Alexa488 (1:400) respectivamente, en buffer de bloqueo. Se incubaron las muestras con los anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en un volumen final de 20 µl de PBS. Se colocaron las células sobre portaobjetos con pads de agarosa 1% en PBS y se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axio Observer 3. Para las imágenes, el fluoróforo fue pseudo



coloreado cyan (RapD) o verde (PlyB). El objetivo empleado para esta observación fue un 100X apocromático utilizado con aceite de inmersión (A.N. 1.42) y el software utilizado para la edición de imágenes obtenidas Zen v2.3.

### Colony blot

Con el fin de evaluar la secreción de proteínas al medio extracelular en un contexto biofilm (utilizando como aproximación experimental la macrocolonia), se colocó sobre placas de agar una membrana de nitrocelulosa estéril de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro ( $\mu\text{microclar}$ ). Se inocularon las membranas con 5  $\mu\text{l}$  de suspensiones estandarizadas de bacterias a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.05 y se dejaron crecer durante 72 hs a 28° C. Las macrocolonias fueron removidas de la nitrocelulosa por sucesivos lavados con agua MilliQ. Los lavados, bloqueo y revelados se realizaron de acuerdo a lo detallado en el apartado “Western Blot”

### ELISA

La técnica de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es una técnica inmunológica mediante la cual se pueden detectar antígenos que se unen a un sustrato fijado sobre una placa de poliestireno. La misma consiste en fijar el ligando a la placa de poliestireno para ser expuesto posteriormente al antígeno o molécula de la cual se desea evaluar la unión. Con el fin de evaluar la interacción de RapD con el EPS se llevaron a cabo distintos ELISA tanto directos como indirectos. Estos ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos Microlon®, High Binding (Greiner Bio – One). El EPS en una concentración de 0.1 mg/ml (según cuantificación por ácidos urónicos) fue fijado a las placas por incubación *overnight* a 4° C en buffer de fijación (100  $\mu\text{l}$ ) sellando la placa con parafilm. Se hicieron dos lavados con TBS-T, uno con TBS (ver apartado “Western Blot”) de 200  $\mu\text{l}$  cada uno y se bloqueó durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (200  $\mu\text{l}$ ) con TBS – BSA 1%. Se lavó la placa dos veces con TBS-T, una con TBS y se incubó el EPS con las proteínas (0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 2 horas a temperatura ambiente (100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ). Se lavó nuevamente la placa y se dejó incubando *overnight* a 4° C con el anticuerpo  $\alpha$  – RapD preparado 1:8000 en TBS – BSA 1% (100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ). Al día siguiente se lavó nuevamente la placa y se incubó con el anticuerpo  $\alpha$  – Mouse-Hrp 1:10000 en TBS – BSA 1% (100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Luego de lavar el anticuerpo secundario se reveló el ensayo con 100  $\mu\text{l}$  de buffer de revelado por pocillo, se dejó reaccionar 4 minutos y se frenó la reacción con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M (o 4N). Se cuantificó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas *Multiskan Go* (Thermo Scientific).

#### Buffer de fijación

$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{HNaCO}_3$	50 mM
EPS (según urónicos)	0.1 mg/ml

#### Buffer de incubación de proteínas

TBS	1X
Proteína	variable
$\text{CaCl}_2$	1 mM

#### Buffer de Revelado

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	100 mM
Citrato de sodio/Ácido cítrico – pH 5	100 mM

OPD (O – feniendiamina)	2 mg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 8.82 M	1 µl/mg de OPD

### BIA EPS

La especificidad de interacción con los polisacáridos se ensayó mediante una técnica de ELISA indirecta llamada Ensayo de Inhibición del Binding (o BIA por sus siglas en inglés). A diferencia del ELISA de interacción directa, las proteínas (1 µg/ml) se pre incubaron con diluciones seriadas al décimo de polisacárido (empezando desde una concentración de 0.1 mg/ml, en presencia de 1 mM de calcio) o buffer durante 30 minutos a temperatura ambiente. De esta forma, solo el competidor que es capaz de interactuar con la proteína de interés durante la preincubación será capaz de desplazar la unión de la proteína al sustrato fijado en la placa de poliestireno. El EPS fijado a la placa de poliestireno y las cantidades de proteína fueron las mismas que las utilizadas para los ELISA directos (Ver apartado ELISA). La mezcla de proteína - competidor se incubó con el EPS fijado sobre las placas de ELISA y se dejó interactuar por dos horas a temperatura ambiente. Luego de lavar el competidor y las proteínas no adheridas al sustrato fijado, se reveló la cantidad de RapD adherida a la placa de manera análoga a los descrito en el apartado ELISA.

### BIA monosacáridos

Para determinar el sitio de binding de RapD en el EPS, se realizaron ensayos de BIA utilizando como competidor los distintos monómeros que componen el EPS (Glucosa, Ácido glucurónico y Galactosa). Mediante esta técnica, solo aquellos azúcares que sean reconocidos por RapD serán capaces de competir con el EPS fijado a la placa de poliestireno desplazando la unión EPS - proteína. De manera análoga a lo detallado en la sección “BIA EPS”, se pre incubaron las proteínas (1 µg/ml) con concentraciones crecientes de los monómeros que componen la unidad repetitiva del polisacárido de *R. leguminosarum* 3841 en un rango de concentraciones de 5 mM a 300 mM por 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado de la técnica fue el mismo que el ELISA directo y el BIA (Ver apartado ELISA y BIA).

### Ensayo de competencia con RapA2 por el sitio de binding en el EPS

Con el fin de analizar si los sitios de binding de RapD en el EPS son compartidos o se solapan con los de RapA2, se llevaron a cabo dos experimentos distintos de competencia basados en la técnica de ELISA. En primer lugar, se evaluó la capacidad de RapD de unirse con el EPS habiendo este interactuado previamente con concentraciones crecientes de RapA2, BSA o buffer (en el rango de 5 ng a 1000 ng por pocillo). Brevemente, se pre incubó el EPS inmovilizado (0.1 mg/ml) durante dos horas a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de RapA2 o BSA (0.05 µg/ml - 10µg/ml) en presencia de 1 mM de calcio. Luego de lavar, se incubó el EPS con RapD de acuerdo al protocolo detallado en el apartado ELISA.

En segundo lugar, se evaluó la capacidad de RapD de interactuar con el EPS en simultáneo con concentraciones crecientes de RapA2, BSA o buffer (en el rango de 5ng a 1000ng por pocillo), también en presencia de 1mM de calcio. El EPS inmovilizado fue incubado de manera simultánea con una combinación de RapD – BSA, RapD – RapA2 o RapD sola (0.05 µg/ml – 10 µg/ml para cada proteína) por 2 horas a temperatura ambiente.

El revelado de RapD asociado al EPS en ambas técnicas se realizó de acuerdo a lo especificado en el apartado ELISA.

## Caracterización de propiedades biofísicas de RapD

### Dicroísmo circular en el UV lejano

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que permite visualizar el grado de dispersión de luz polarizada por parte de una molécula. Esta dispersión se encuentra afectada, entre otras cosas, por la estructura que tiene esa molécula. Para el caso particular de las proteínas, el espectro de dicroísmo circular está relacionado con la estructura secundaria que presente. Los análisis de dicroísmo circular de RapD se utilizaron para poder determinar la estructura secundaria de la proteína y ver los cambios que ocurren en la misma en respuesta al calcio. Los ensayos se llevaron a cabo en buffer Tris 15 mM pH 8, NaCl 15 mM y la concentración adecuada de calcio (0 – 1.25 mM), NaCl (0 – 500 mM) o EPS (0 – 12 µg/ml equivalentes de ácidos urónicos). Los espectros de dicroísmo en el uv lejano fueron medidos a 25° C en un espectropolarímetro Jasco J-815. RapD recombinante se diluyó hasta una concentración de 3.75 µM (0.12 mg/ml) y se colocó en una celda de 1 mm de grosor. Los espectros se adquirieron en el rango de 195 a 260 nm. Las mediciones se realizaron en una celda contenedora termostatazada por peltier utilizando un camino de celda de 1 mm. Los espectros obtenidos fueron el promedio de 6 escaneos para reducir el ruido de fondo.

### Espectroscopía de fluorescencia

Esta técnica se utiliza para visualizar el microambiente proteico y para observar cambios en la topología de la proteína. Es comúnmente utilizada en conjunto con otras técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular para entender qué es lo que le sucede a la proteína en respuesta a un estímulo el cual puede ser, como en el caso de esta tesis, un ligando. La misma se basa en la excitación de aminoácidos capaces de emitir fluorescencia como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina y en la medición de su espectro de emisión. Los espectros de emisión de fluorescencia de RapD recombinante (3.75 µM o 0.375 µM) fueron realizados a 25° C entre los 305 y 400 nm con una longitud de onda de excitación de 295 nm (la cual excita únicamente los residuos de triptófano) y un grosor de banda de emisión y excitación de 5 nm en un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Las condiciones de medición, así como los buffers utilizados, fueron los mismos que los detallados en el apartado anterior. Los espectros de emisión de las proteínas se obtuvieron luego de sustraer los espectros de fluorescencia del agua o del buffer.

### Ensayos de oligomerización

100 µl de RapD (1 mg/ml) o 500 µl de RapD (0.12 µg/ml) fueron sembrados en una columna Superdex 200 (Pharmacia Biotech) y la cromatografía de exclusión molecular fue llevada a cabo con un flujo de 1 ml/min en buffer Tris 20 mM pH 8, 150 mM NaCl y CaCl<sub>2</sub> (0 – 1.25 mM). Las fracciones de 1 ml fueron concentradas por precipitación con ácido tricloroacético 10%, resuspendidas en loading buffer y analizadas por SDS – PAGE. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Ferretina (440 kDa), BSA (67 kDa), OVA (45 kDa) y lisozima (15 kDa). Blue Dextran y acetona fueron utilizados como marcadores de V<sub>0</sub> y V<sub>0</sub> + V<sub>i</sub>.

### Herramientas de análisis bioinformático empleadas.

Para evaluar las diversas especies del género *Rhizobium* que poseen RapD y el nivel de conservación de la misma, la secuencia codificante de esta proteína (Rlv 3841 - RL2702) fue utilizada como query para los análisis por Protein Blast excluyendo las especies de *R. leguminosarum* y limitadas al género

*Rhizobium*. Los ortólogos encontrados fueron usados en comparaciones de a pares en análisis locales para detectar similitudes, así como para alineamientos globales utilizando ClustalO.

Con el objetivo de atribuir una función biológica a RapD, se buscaron ortólogos fuera del género *Rhizobium* y de la familia *Rhizobiaceae*. Para ello, se realizó un blast iterativo excluyendo de la búsqueda a dicho género o familia.

Para la identificación de los diversos dominios de las proteínas Rap presentes en el genoma de *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841, se utilizó el predictor de dominios de la base de datos del NCBI utilizando los valores predeterminados. Para el análisis de los dominios tipo cadherina presentes en las diversas Rap se modificó el umbral de significación a 0.2. Para identificar la región que corresponde al dominio Ra/CHDL en las proteínas Rap de *R/v* 3841, se utilizaron comparaciones de a pares usando como molde la proteína RapA2 la cual consiste únicamente en 2 dominio Ra/CHDL.

## Resultados

### Capítulo I – RapD

RapD es una proteína altamente conservada de estructura similar a otras proteínas Rap. A través de una búsqueda *in silico* en busca de proteínas que tuvieran dominios Ra/CHDL (Cao et al. 2005; Abdian et al. 2013), se identificó en el genoma de *Rlv* 3841 otro miembro de la familia Rap llamada RapD (RL2702). Dentro de esta familia de proteínas se encuentran las glicanasas Ply, las lectinas RapA, RapB y RapC (Figura 8). Para identificar si RapD presenta alguna similitud con otras proteínas Rap, las cuales son secretadas por el SSTI PrsDE, se realizaron comparaciones de pares utilizando a RapD como referencia. Tanto la estructura de dominios como el tamaño de RapD son similares a los de RapB (248 aa.) ya que contiene un dominio Ra2 en su extremo N terminal (aa. 1 – 122) y una región C terminal (aa. 123 – 277) de función desconocida, compartiendo ambas una similitud global del 49% (Figura 8). Posteriormente, se identificó si la proteína se encuentra conservada en otras especies del género con el fin de determinar si la secuencia de RapD de *Rlv* 3841, codificada en el locus RL2702, presenta indicios de ser un pseudogen. Alineamientos locales (Pblast) y globales (Clustal) de RapD con sus ortólogos de otras especies del género *Rhizobium* como *R. valis*, *R. phaseoli*, *R. etli* y *R. esperanzae*, entre otros, mostraron porcentajes de similitud mayores al 85% sugiriendo que esta proteína se encuentra altamente conservada y que en *Rlv* 3841 no hay indicios de que se trate de un pseudogen (Figura 9). Sabiendo que RapD se encuentra altamente conservada y que la misma tiene una estructura similar al de otras proteínas Rap, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas fuera del género y de la familia Rhizobiaceae con el fin de asignar a la proteína una posible función biológica. No obstante, alineamientos iterativos en busca de ortólogos fuera del género *Rhizobium* no resultaron en la identificación de homólogos.

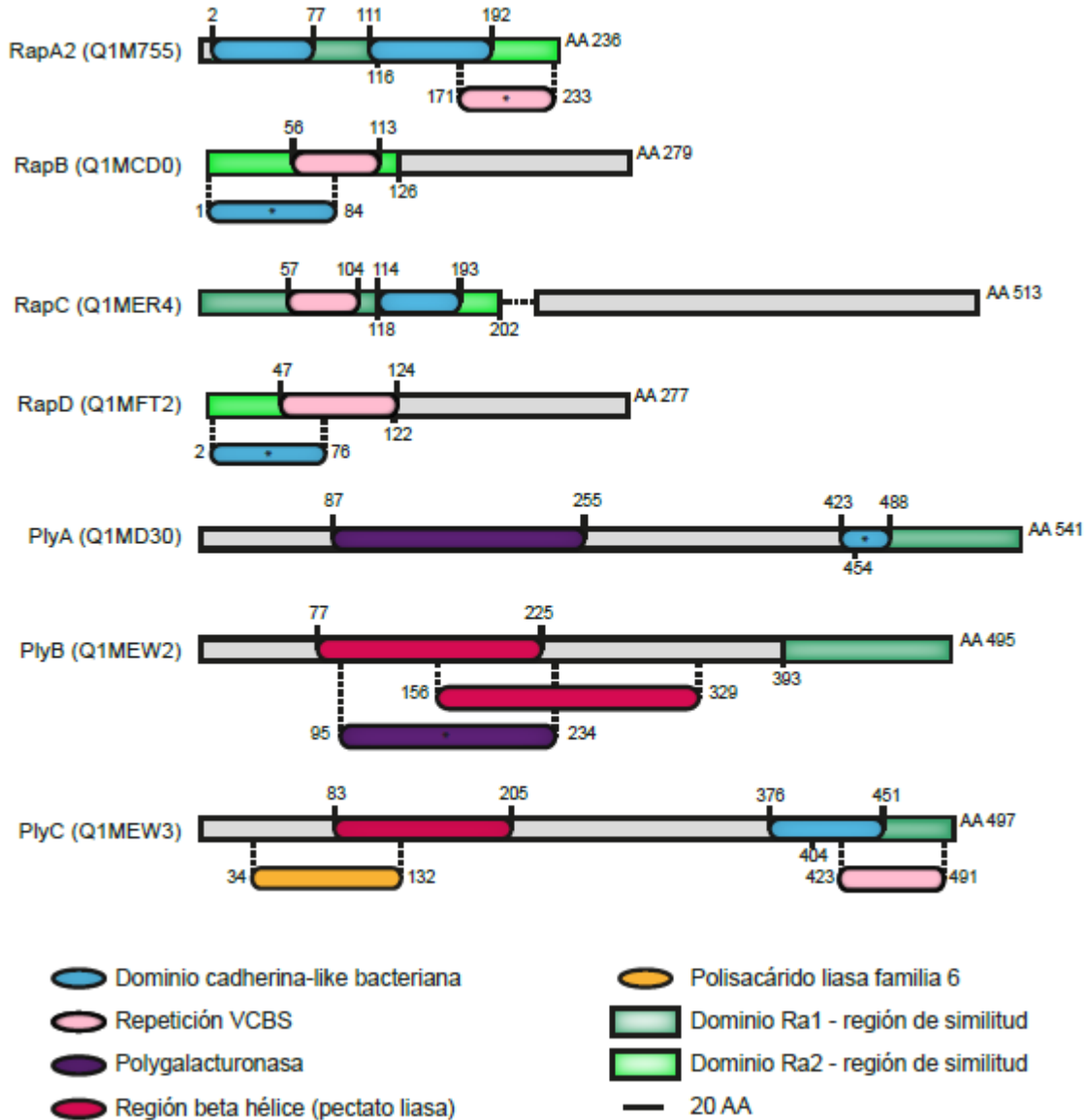


Figura 8: Familia de proteínas Rap secretadas por el sistema de secreción PrsDE en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841. Los dominios Ra1 y Ra2/CHDL se encuentran representados con cajas de color verde oscuro y verde claro respectivamente. Las regiones que alinean con esos dominios en las otras proteínas Raps están representadas como las cajas del color correspondiente. RapC se encuentra truncada en *Rlv* 3841 (aa 202), respecto a otras cepas analizadas, debido a una delección de 5 nucleótidos que generan un codón stop alternativo dibujado en el esquema como una línea punteada. (\*) Los asteriscos indican la presencia de dominios visibles únicamente luego de cambiar el valor de significación (E – value) a 0.1 con la excepción de RapB en la cual el umbral de significación fue cambiado por 0.2 (siendo el valor por defecto 0.01). Los dominios Ra/CHDL están conformados por aproximadamente 110 residuos y se encuentran en numerosas proteínas bacterianas con un alto grado de similitud con las proteínas de unión a calcio que pertenecen a la familia de las cadherinas eucariotas involucradas en las interacciones célula – célula. Los dominios Ra (Ra1 y Ra2) fueron definidos como dominios CHDL bacterianos (Ausmees et al. 2001; Abdian et al. 2013). Los dominios CHDL se encuentran presentes en numerosas proteínas bacterianas y de arqueas y se propuso que los mismos confieren la habilidad de interactuar con carbohidratos (Cao et al. 2005). Los dominios polygalacturonasa, pectato liasa y polisacárido liasa familia 6 corresponden a dominios encontrados en glicanasas y se encuentran

relacionados con su actividad enzimática. Las repeticiones VCBS son dominios de aproximadamente 100 aminoácidos que se encuentran en múltiples copias en proteínas grandes del género *Vibrio*, *Colwellia*, *Bradyrhizobium* y *Shewanella* cuyas funciones están relacionadas con las interacciones célula – célula (InterPro domain IPR010221).

	10	20	30	40	50	60	70	80
sp. WYCCWR	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLASD	PEGADMYARF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IKGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. indigoferae</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. L43	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. laguerreae</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. WYCCWR10014	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. Lv. 3841</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. PEPV16	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. N122	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. J15	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLASD	PEGADMYARF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. ecuadorensis</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. C16	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. C5	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. Pop5	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. vallis</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. H4	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. phaseoli</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. etli</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. NXC14	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. L9	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. etli</i> CFN42	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
<i>R. esperanzae</i>	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL
sp. R635	MTNAKPTAVDDL	VFFEDNWI	RGDLLRLSSD	PEGADMYVRF	VNGVVR	DAKHGPDHET	IRGEYGTFRVK	PDGHEEYELDYTL

	90	100	110	120	130	140	150	160
sp. WYCCWR	VKNLGYDQL	IEKLSYKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	DVGEKYEHL	DFDDMGVT	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. indigoferae</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. L43	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. laguerreae</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. WYCCWR10014	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. Lv. 3841</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. PEPV16	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. N122	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. J15	VKNLGYDQL	IEKLSYKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. ecuadorensis</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. C16	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. C5	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. Pop5	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. vallis</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. H4	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. phaseoli</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. etli</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. NXC14	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. L9	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. etli</i> CFN42	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
<i>R. esperanzae</i>	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN
sp. R635	VKNLTYDQL	IEKLSFKMSD	SGGTDLGV	TLAIDGV	VNEGDKYEHL	DFDDMGVLS	SRADNFS	LPDYRN





suplementaria 1 y 2). La abundante proteína citoplasmática RhiA no fue detectada en los secretomas de ninguna de las dos cepas sugiriendo que las proteínas halladas no provienen de lisis celular (Krehenbrink 2008).

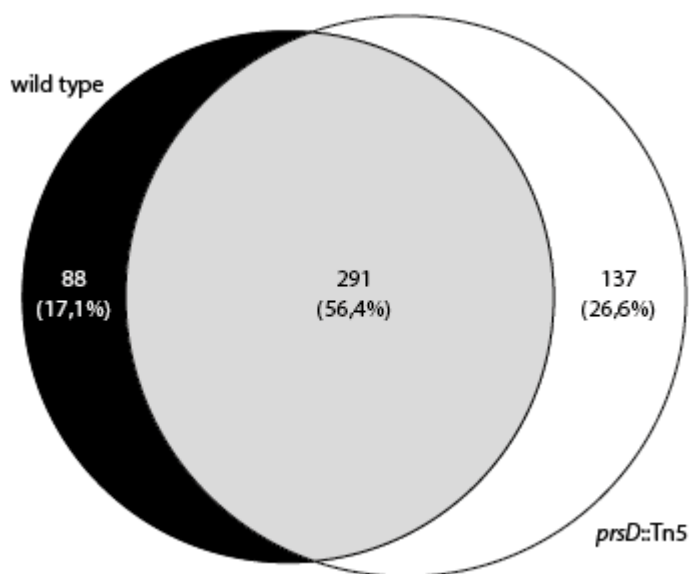


Figura 10: Representación gráfica de las proteínas que componen el secretoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841. Se muestran las proteínas extracelulares de la cepa wt y su mutante isogénica *prsD::Tn5* agrupadas según si se encuentran exclusivamente en algún grupo (regiones negra (wt) y blanca (*prsD*)) o si se encuentran en los secretomas de ambas cepas (región gris). Los porcentajes representados indican la proporción de proteínas de cada grupo con respecto al total de proteínas halladas en ambos secretomas.

Un número considerable de proteínas detectadas en la cepa wt estuvieron ausentes en el medio extracelular de la mutante *prsD*. Como fue demostrado anteriormente (Zorreguieta et al. 2000, Russo et al. 2006, Krehenbrink 2008), la secreción de RapA2 (Q1M755), RapC (Q1MER4), PlyA (Q1MD30) y PlyB (Q1MEW2) es PrsDE – dependiente (Tabla 1). Además, la proteína RapD (Q1MFT2) fue identificada en el secretoma de la cepa wt y estuvo ausente en el de la mutante de secreción *prsD*. Se corroboró la secreción de otras proteínas dependientes de PrsDE tales como 3 proteínas RTX de unión a calcio (Q1MF23, Q1M7J7 and Q1MGL7), una proteína con dominio beta hélice (Q1M8U8) y NDK-nucleósido difosfato kinasa (Q1ML69) las cuales fueron propuestas mediante técnicas *in silico* como sustratos del SSTI PrsDE por Krehenbrink (2008). Por último, se encontraron 3 nuevos sustratos dependientes de PrsDE en la cepa 3841: una Zn-metaloproteasa (Q1ML69), RapB (Q1MCD0) y la glicanasa PlyC (Q1MEW3). Estas proteínas a excepción de RapD habían sido propuestas mediante análisis *in silico* como sustratos putativos de los SSTI (Krehenbrink 2008) (Tabla 2).

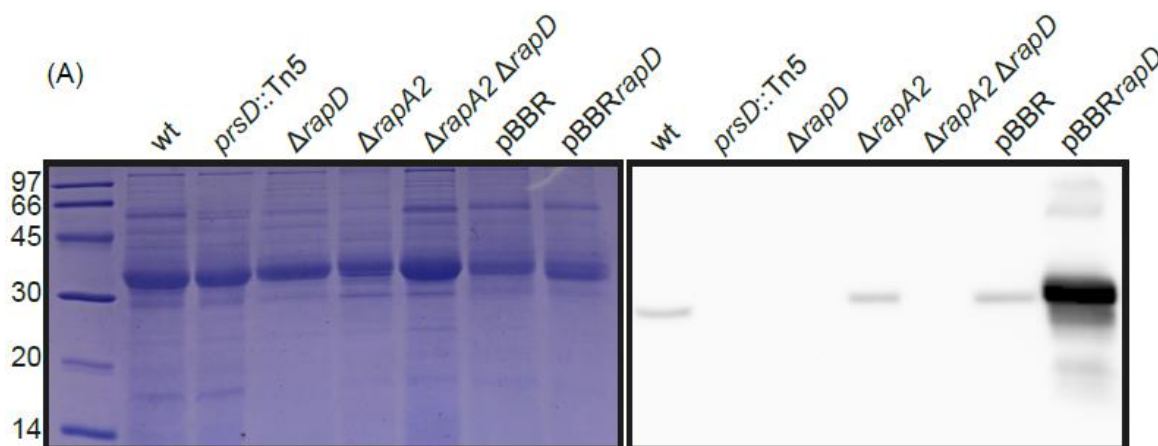
Nombre del locus	PM predicho (kDa)	Descripción	Referencia
RL3024 Q1MEW2	51.6	PlyB	Finnie et al., 1998
RL0790* Q1ML69	160	RTX Zn – metaloproteasa putativa de unión a calcio	Krehenbrink 2008
pRL90140 Q1M8U8	78.9	Proteína con dominio beta hélice	Krehenbrink 2008
RL2961 Q1MF23	95.1	Proteína RTX cadherina-like putativa de unión a calcio	Krehenbrink 2008
pRL100175 Q1M7X8	30	NodO	Finnie et al. 1997; Downie & Surin 1990
pRL100309 Q1M7J7	60.8	Proteína RTX cadherina-like putativa de unión a calcio	Krehenbrink 2008
pRL100451 Q1M755	24.9	RapA2	Russo et al. 2006 Ausmees et al., 2001
RL3659* Q1MD30	56.1	PlyA	Finnie et al., 1998
RL2412 Q1MGL7	64.6	Proteína RTX putativa de unión a calcio	Krehenbrink 2008
RL2702* Q1MFT2	30.6	RapD	Abdian et al., 2013
RL3023* Q1MEW3	51.8	PlyC	Krehenbrink 2008
RL3073 Q1MER4	30.3	RapC (región C terminal)	Ausmees 2001 Russo et al. 2006
RL3911* Q1MCD0	30.3	RapB	Ausmees 2001
RL1580 Q1MIY5	15.3	NDK – nucleósido difosfato kinasa	Krehenbrink 2008 Chakrabarty 1998

Tabla 2: Proteínas extracelulares PrsDE dependientes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841. El asterisco indica sustratos nuevos de PrsDE. Las proteínas Rap se encuentran ordenadas en orden decreciente de acuerdo al puntaje obtenido en el análisis del secretoma por LC-MS/MS (el puntaje es indicativo de la abundancia y el número de péptidos trípticos encontrados).

La presencia de RapD en el medio extracelular de *Rlv* 3841 fue corroborada por Western blot utilizando anticuerpos policlonales específicos generados en ratón contra la región C terminal de RapD (Figura 11A). En este análisis se incluyeron una mutante por delección del gen *rapD* (obtenida por doble recombinación homóloga clonando en un vector no replicativo las regiones río arriba y río abajo del gen *rapD*) ( $\Delta rapD$ ), una cepa derivada de la wt que sobreexpresa RapD en un plásmido multicopia (obtenida por clonado de la región codificante del gen *rapD* como fusión traduccional al gen *lacZ*, río abajo del promotor de expresión constitutiva del gen *lacZ*) (pBBR*rapD*), una mutante obtenida por delección del gen *rapA2* ( $\Delta rapA2$ ) (Voza – Abdian et al. 2016) y una doble mutante *rapA2 rapD* obtenida por recombinación homóloga a partir de la mutante *rapA2*. Coincidiendo con

el análisis proteómico, se corroboró la ausencia de RapD en el medio extracelular de la mutante de secreción *prsD*; también se observaron altos niveles de RapD extracelular en la cepa que sobreexpresa RapD (pBBR*rapD*) y no se observaron diferencias entre la cepa wt y la cepa mutante *rapA2*. En relación a la cantidad total de proteínas en el medio extracelular producida por la cepa wt tanto en medio rico (TY) como en medio mínimo (Y), RapD mostró un patrón de acumulación estable en el medio extracelular. No obstante, una estimación obtenida mediante densitometría sugiere que la acumulación de RapD en el medio extracelular a una  $DO_{600nm}$  de 0.8 (fase exponencial) con respecto al total de proteínas fue considerablemente mayor (de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud más grande) que lo observado en medio rico (Figura 11B). Esa observación es llamativa dado que grandes cantidades de EPS son producidas en Y – manitol y *Rlv* forma biofilms estructurados en este medio de cultivo tanto in vitro como en raíces de arveja (Russo et al. 2006; Williams et al. 2008; Vozza et al. 2016). En conjunto, estos resultados muestran que RapD se cosecreta con otras proteínas Rap de manera PrsDE-dependiente.

Cabe destacar que RapD fue detectada, en la cepa wt, tanto como una banda difusa como una banda intensa que difiere ligeramente en su peso molecular entre el medio TY o Y (Figura 11B). No obstante, en ambos casos el peso molecular, ubicado entre los 25 y los 32 kDa, coincide con el peso molecular estimado a partir de la secuencia aminoacídica de 30 kDa (Figura 4B). Aún no hemos determinado la razón por la cual RapD se presenta como una doble banda, y desconocemos a qué se debe el comportamiento desigual en diferentes condiciones de cultivo.



(B) Proteínas Extracelulares

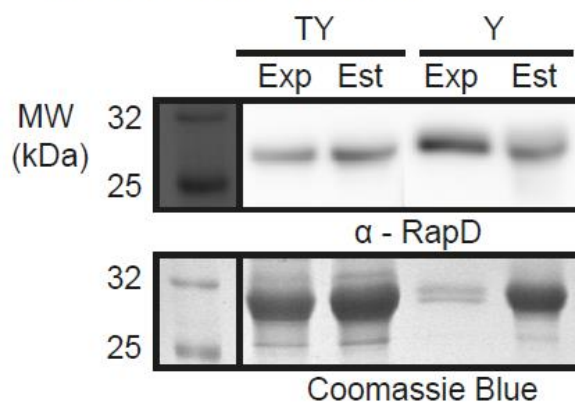


Figura 11: Dependencia de PrsDE para la secreción de RapD. A) Las proteínas extracelulares de cultivos de *R/v* 3841 y de las cepas isogénicas fueron analizadas por SDS-PAGE 15% y Western blot. La inmunodetección de RapD fue llevada a cabo con antisuero policlonal anti-RapD de ratón revelados con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a peroxidasa de rabanito (Hrp). B) Secreción de RapD en diferentes condiciones nutricionales, medio rico (TY) o mínimo (Y adicionado con manitol como fuente de carbono) en cultivos de fase exponencial (Exp) ( $DO_{600nm} = 0.7 - 0.8$ ) y fase estacionaria (Est) ( $DO_{600nm} 1.2 - 1.5$ ). Western blot detectando proteína RapD en el secretoma (superior) y tinción de las proteínas con Coomassie blue (inferior).

Para poder determinar si RapD se secreta cuando la bacteria es cultivada en biofilms, se utilizó como modelo del mismo las macrocolonias que se desarrollan en medio semisólido (Branda et al. 2005). Las bacterias fueron cultivadas sobre un filtro de nitrocelulosa colocado sobre medio semisólido en diferentes condiciones nutricionales (medio rico TY o medio mínimo Y con manitol) por 3 días. Luego de lavar las macrocolonias, la proteína RapD extracelular retenida sobre la membrana de nitrocelulosa fue revelada con anticuerpos anti-RapD. Se observó una señal moderada correspondiente a RapD en la cepa wt. Como se esperaba, esta señal estuvo ausente en las mutantes *prsD* y  $\Delta rapD$  (Figura 12A). Por otro lado, se observó una señal muy fuerte en la posición correspondiente a la macrocolonia de la cepa que sobreexpresa RapD (*pBBRrapD*). En conjunto, estas observaciones apoyan la idea de que la proteína RapD es secretada por los rizobios en cultivos sésiles (biofilms).

Como fue mencionado anteriormente, la mayor secreción de RapD se dio en Y – manitol donde se secretan cantidades copiosas de EPS y donde *R/v* forma biofilms estructurados. Esto podría sugerir una relación funcional entre RapD y el EPS. Con el fin de determinar si la secreción de RapD está afectada por la ausencia de polisacárido, la mutante *pssA* (William et al. 2008) también fue incluida en el análisis por colony blot. La cepa *pssA* posee una mutación en la primer glicosil transferasa involucrada en la vía de síntesis del polisacárido, razón por la cual es incapaz de sintetizar y secretar EPS/CPS. Sorprendentemente tanto en medio Y como TY se observó una señal muy fuerte de RapD (Figura 12A). Para determinar si este comportamiento fue debido a una característica intrínseca de la cepa o un artefacto producto de la técnica utilizada, se analizaron los niveles de RapD en los medios extracelulares de cultivos líquidos. Esto permitió corroborar que no se trataba de un comportamiento general de la cepa mutante ya que los niveles de expresión/secreción de RapD en la cepa deficiente para la síntesis de EPS analizados por Western blot, mostraron niveles de RapD incluso menores que aquellos de la cepa wt (Figura 12B). Como era de esperar, las colonias de la cepa mutante *pssA* fueron visiblemente secas tanto en medio TY como medio Y (Figura 12A). Es probable que la fuerte señal de RapD extracelular observada en el colony blot esté relacionada de alguna forma con el fenotipo EPS-deficiente. Las lectinas RapA, cosecretadas con RapD por el SSTI PrsDE, se encuentran parcialmente retenidas por el polisacárido capsular (CPS) en la superficie de la célula y modulan la cohesión celular, así como el balance entre CPS/EPS (Vozza et al. 2016). Con el fin de evaluar la secreción de RapD en un contexto donde las propiedades adhesivas de la bacteria y la distribución de polisacárido se encuentra afectada, una cepa deficiente en la síntesis de RapA2 fue cultivada en las mismas condiciones sésiles. Semejante a lo observado para la cepa deficiente en la síntesis de EPS, se observó una señal prominente de RapD en el contexto  $\Delta rapA2$  en TY, medio en el cual la colonia presenta un fenotipo seco (Vozza et al. 2016) (Figura 12A). Nuevamente, los niveles de RapD extracelular en esta cepa cultivada en condiciones plantónicas en medio rico fue similar a los niveles de la cepa wt (Figura 12B) sugiriendo que lo observado en el colony blot no es un comportamiento general de la cepa. Como tanto la mutante *pssA* (en medio rico TY y medio mínimo

Y manitol) y la mutante *rapA2* (únicamente en medio TY) desarrollan macrocolonias secas, la explicación más simple para estas observaciones es que RapD extracelular es más eficientemente retenida por la membrana de nitrocelulosa en contextos donde el EPS se encuentra ausente (fenotipo seco) mientras que en colonias mucosas, una proporción considerable de la proteína es lavada conjuntamente con la biomasa bacteriana, probablemente debido a la fuerte interacción de la proteína con el EPS o el CPS.

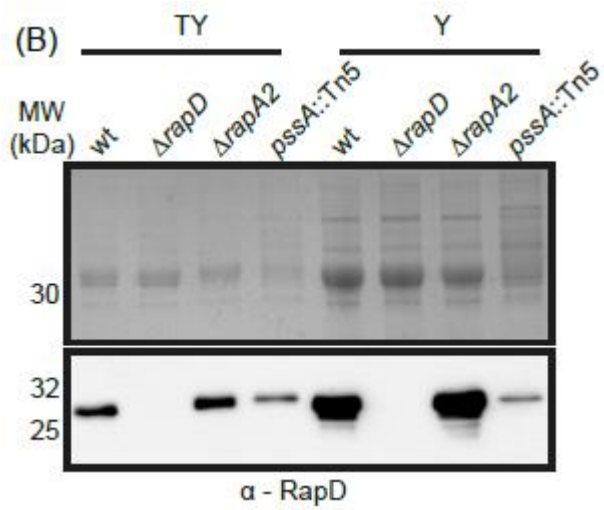
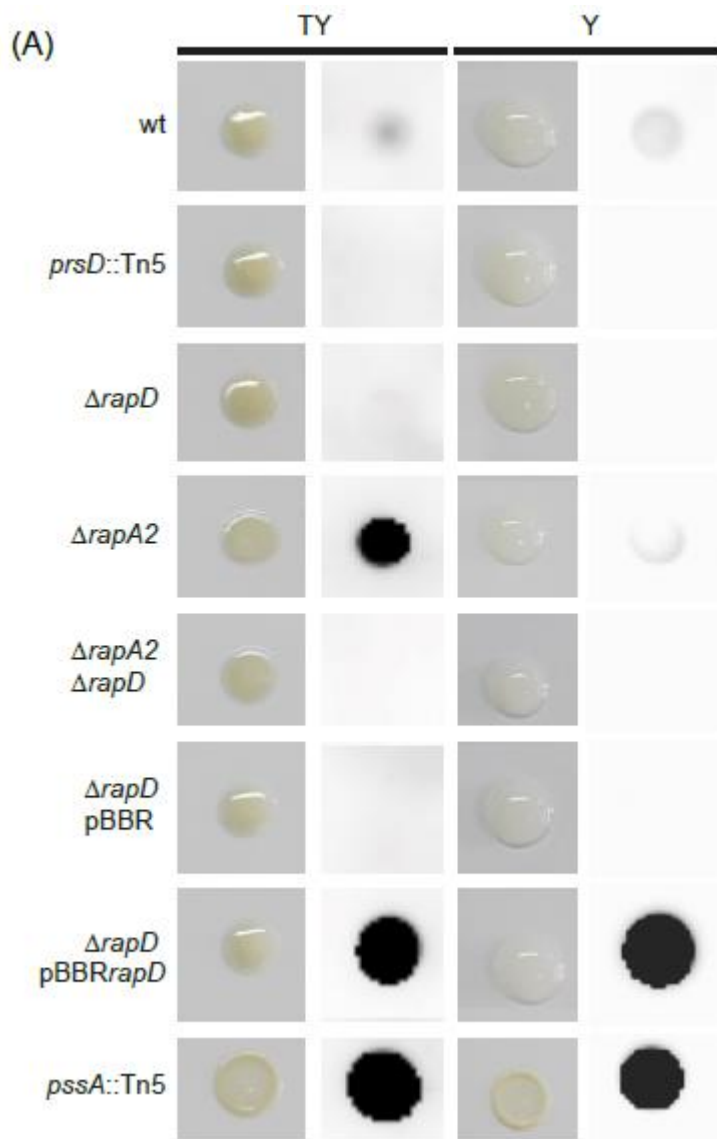


Figura 12: Detección de la proteína RapD mediante Colony Blot. A) Aspecto macroscópico de colonias derivadas de *Rlv* 3841 cultivadas en medio mínimo Y - manitol o medio rico TY a 28° C e inmuno-detección de RapD secretada y retenida sobre filtros de nitrocelulosa empleando el antisuero policlonal anti-RapD fabricado en ratón y un anticuerpo secundario anti ratón conjugado a peroxidasa de rabanito. B) Análisis por Western blot de las proteínas extracelulares secretadas por cepas derivadas de *Rlv* 3841 luego de 72 hs de cultivo en medio TY y Y – manitol, analizadas por SDS-PAGE 15% (superior). La inmunodetección de RapD en los secretomas fue realizada con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Hrp.

### RapD no se asocia a la superficie bacteriana

Como fue mencionado en la sección anterior, luego de su secreción, una proporción considerable de RapA es retenida sobre la superficie bacteriana (Vozza et al. 2016). Además, por inmunofluorescencia se mostró que en condiciones de expresión endógena varias células de *Rlv* muestran una señal de RapA en un polo bacteriano, presumiblemente relacionado con el sitio de secreción de PrsDE. En estas mismas condiciones, algunas bacterias presentaron una señal fluorescente reminiscente de la cápsula bacteriana; más aún, en condiciones de sobre-expresión de *rapA1*, un alto porcentaje de células mostraron este comportamiento. Este efecto se debe a la actividad de lectina de las proteínas RapA hacia el CPS (Abdian et al. 2013, Vozza et al. 2016). Para explorar la localización celular de RapD, las proteínas de superficie de la cepa wt fueron analizadas por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti RapD y fueron comparadas con el comportamiento de RapA2 (Figura 13). En contraste con esta última, RapD no fue detectada en las proteínas de superficie de los rizobios cultivados en medio rico o medio mínimo, en el que se producen grandes cantidades de EPS (Figura 13). Más aún, el análisis de preparaciones de proteínas de superficie de la cepa sobreexpresante de RapD tampoco mostró señales de localización asociada a envoltura (Figura 13).

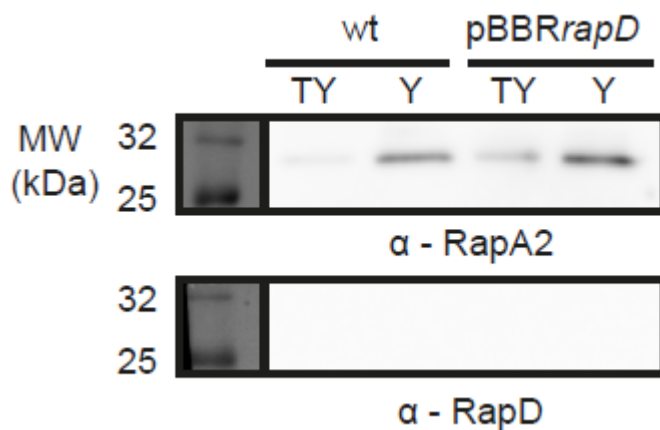


Figura 13: Western blot de proteínas asociadas a la superficie celular de cultivos de fase exponencial de *Rlv* 3841 y derivadas cultivadas en medio rico (TY) o medio mínimo (Y). Las proteínas Rap fueron reveladas con sueros policlonales anti-RapA2 (Vozza – Abdian et al. 2016) o anti-RapD y anticuerpos secundarios conjugados a Hrp.

En línea con estas observaciones, RapD tampoco fue detectada en la superficie bacteriana mediante ensayos de inmunofluorescencia de células enteras en las cepas wt o pBBRrapD (Figura 14).

Llamativamente, muy pocas células mostraron una señal polar (<2%), lo cual posiblemente se deba a la localización transitoria de la proteína luego de su secreción. Estas observaciones sugieren que, al igual que RapA, RapD se secreta por el sistema PrsDE a través de un polo de la bacteria. En conclusión, los resultados apuntan a que el destino final de la proteína RapD es distinto del de las proteínas RapA. Mientras que estas últimas son parcialmente retenidas sobre la superficie bacteriana y cumplen una función al interactuar con el CPS, RapD es completamente liberada al medio extracelular. En este contexto surge la hipótesis de que RapD interactúa con el polisacárido en su forma de EPS.

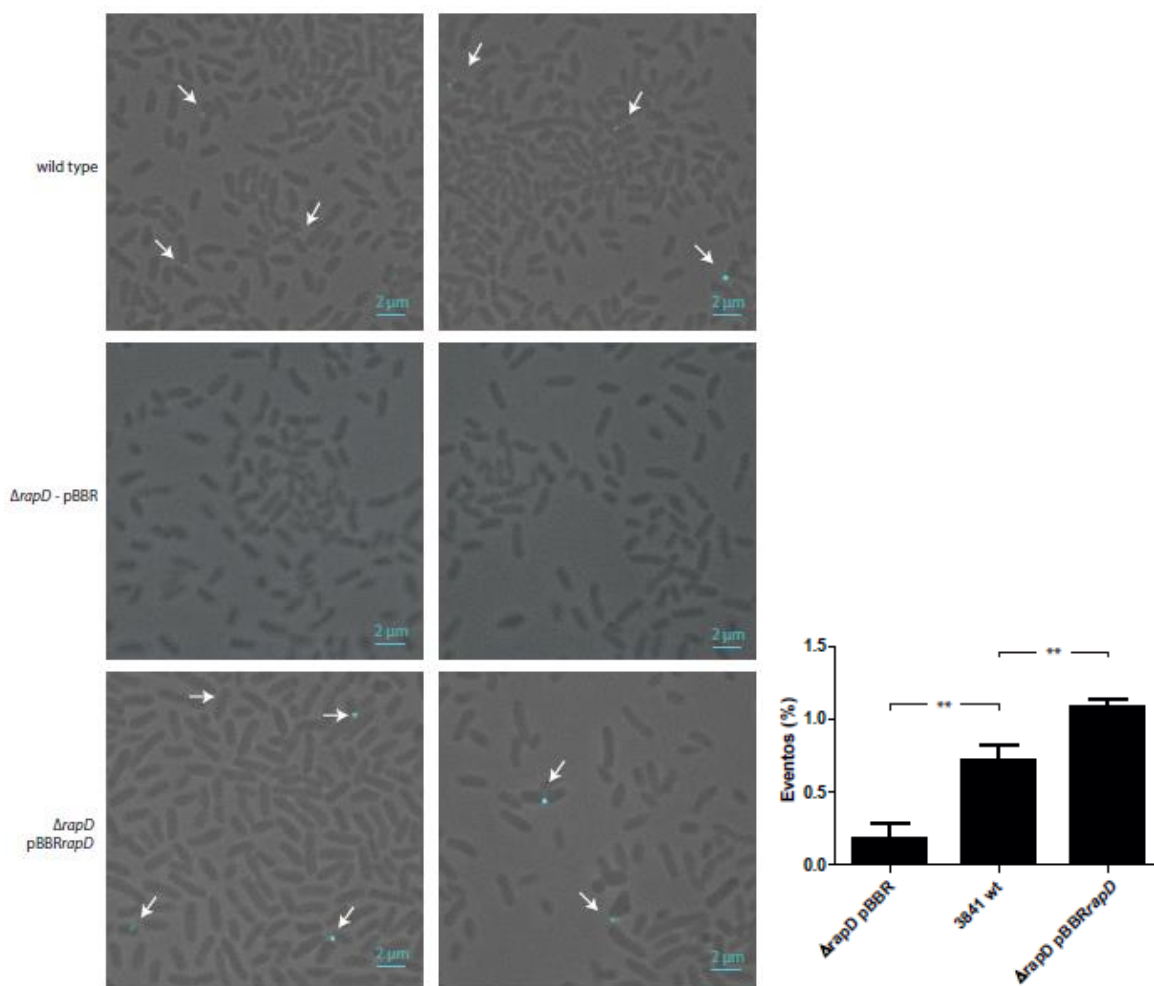


Figura 14: Análisis de la localización de RapD mediante inmunofluorescencia. Células enteras derivadas de *Rlv* 3841 fueron incubadas con el antisuero de ratón anti-RapD y revelados con un anticuerpo anti ratón conjugado a Cy3 (pseudocoloreado Cyan). Izquierda) Se muestran imágenes obtenidas de campos representativos de todas las cepas. Las células fueron observadas con un aumento de 1000X, la barra de escala representa 2 μm y las flechas blancas indican la señal polar de RapD. Derecha) El gráfico de barras muestra el promedio de eventos polares observados en las distintas réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con un  $p < 0.001$  y un nivel de significación del 5% analizados por ANOVA de un factor. Las diferencias estadísticas entre medias se analizaron con el test de Tukey.



## El calcio induce cambios conformacionales y la formación de oligómeros en RapD

RapA2 y el dominio N terminal de RapD (dominios Ra/CHDL) comparten cierta homología con cadherinas eucariotas, proteínas extracelulares de unión a calcio que median interacciones célula - célula (Pokutta et al. 1994) (Figura 8). Dado que los cationes divalentes de calcio afectan la conformación y la dinámica tanto de las cadherinas eucariotas como de RapA2, se propuso analizar si el calcio también afectaba la conformación de RapD utilizando la técnica de dicroísmo circular (DC) (Figura 15). El espectro de DC de la proteína en ausencia de calcio (llamada a partir de ahora Apo-RapD) muestra una estructura secundaria mixta con un mínimo centrado alrededor de los ~210 nm indicativo de regiones desestructuradas. El agregado de calcio en el rango de mM induce una disminución en el componente negativo de ~210 y la consolidación de una banda negativa en los ~217 nm indicando que las hojas plegadas  $\beta$  dominan la estructura de RapD unida a calcio (llamada a partir de ahora Holo-RapD). El cambio en la señal de CD a ~210 nm satura con el agregado de 0.5 mM de calcio a 3.75  $\mu$ M de RapD (Figura 15A). El agregado de calcio a la proteína Apo-RapA2 (Abdian et al. 2013) y a cadherinas eucariotas (Pokutta et al. 1994) también induce la consolidación de una estructura proteica enriquecida en hojas plegadas  $\beta$ , en concordancia con la necesidad de calcio para el plegado correcto de los dominios *cadherina-like* de RapD. Por otro lado, el agregado de otros cationes divalentes como magnesio en las concentraciones utilizadas en el experimento de calcio (Figura 15B) no indujeron ningún tipo de cambio en el espectro de DC de Apo-RapD confirmando la preferencia por iones calcio.

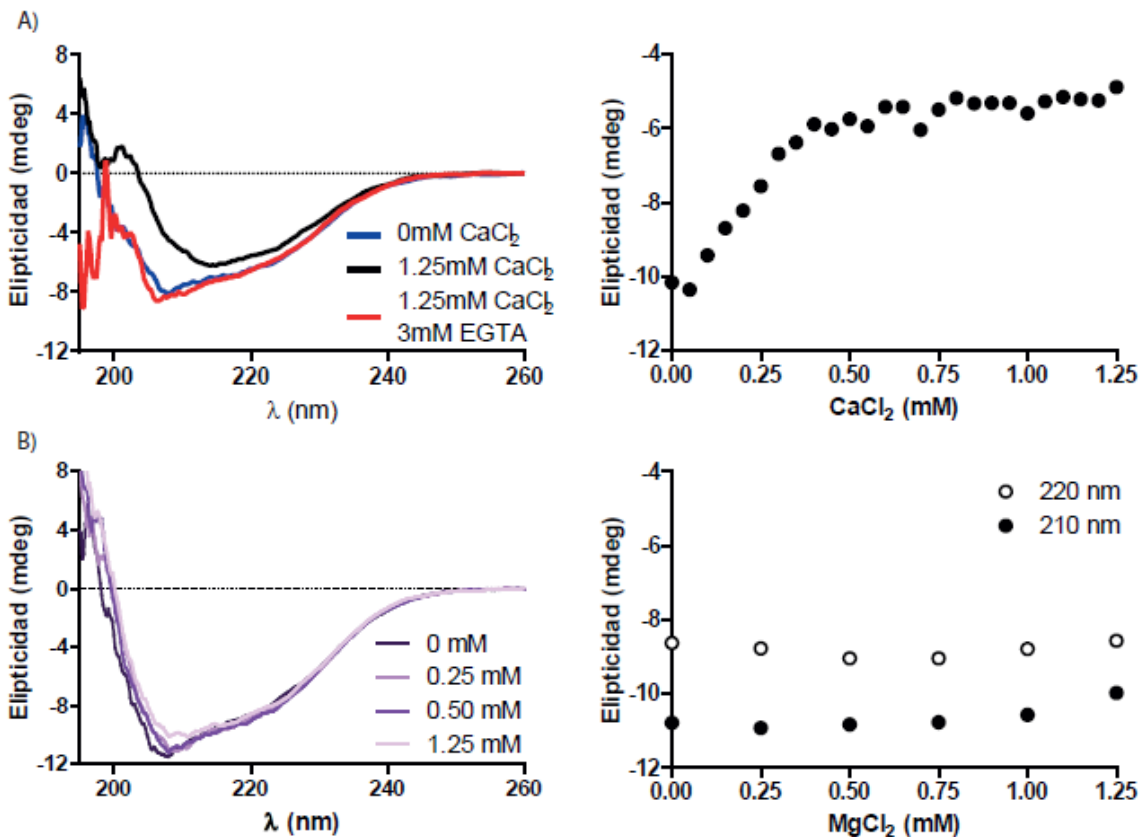


Figura 15: Efecto del calcio en la estructura de RapD. A) Espectros de dicroísmo circular de RapD recombinante en ausencia de calcio, 1.25 mM de calcio o suplementada con 3 mM de EGTA y elipticidad a 210 nm en

respuesta a concentraciones crecientes de calcio. B) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de RapD en respuesta a magnesio y elipticidad medida a 210 o 220 nm en concentraciones crecientes de magnesio desde 0 a 1.25 mM.

El efecto del calcio sobre la conformación de RapD también se analizó titulando Apo-RapD con concentraciones crecientes de calcio siguiendo el espectro de emisión de fluorescencia del único triptófano presente en la secuencia aminoacídica. La adición de calcio da lugar a un pequeño corrimiento al rojo (*redshift* en inglés) sugiriendo que el único triptófano presente en el dominio Ra/CHDL de RapD se expone parcialmente al solvente (Figura 16). Para descartar que el comportamiento observado se deba a la concentración de proteína utilizada, se repitió el experimento utilizando una dilución al décimo de RapD con las mismas concentraciones de calcio. Conforme a lo esperado, el perfil de respuesta al calcio se observó tanto con la proteína concentrada como diluida lo que sugiere que el efecto observado en respuesta a calcio se debe a un comportamiento real y no un artefacto dentro del rango de concentraciones de la proteína utilizado.

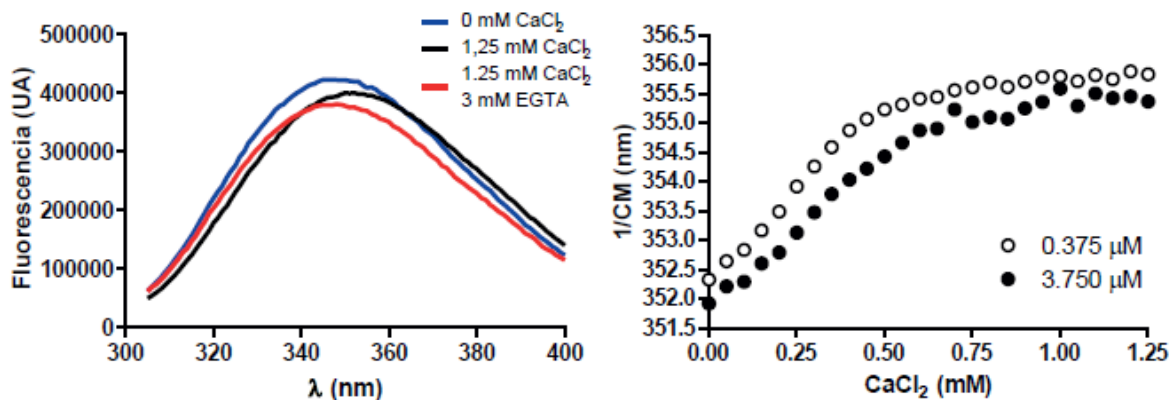


Figura 16: Espectros de fluorescencia de la proteína Apo-RapD en presencia de distintas concentraciones de calcio desde 0 a 1.25 mM. Derecha: Centro de masa espectral para ambas concentraciones de proteína (0.375 o 3.750  $\mu$ M) medida en función de la concentración de calcio.

Coincidentemente, los cambios de estructura secundaria vistos por DC así como los cambios en el espectro de fluorescencia de la proteína ocurren en el mismo rango de concentraciones de calcio (Figura 17), lo que sugiere que tanto el reordenamiento de la estructura secundaria de la proteína como el reordenamiento del microambiente proteico y la exposición del triptofano ocurren al mismo tiempo. No obstante, la exposición del triptofano al solvente podría deberse únicamente de un efecto local.

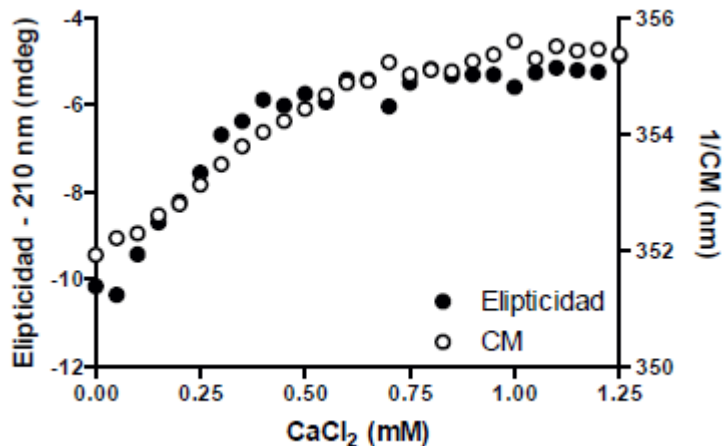
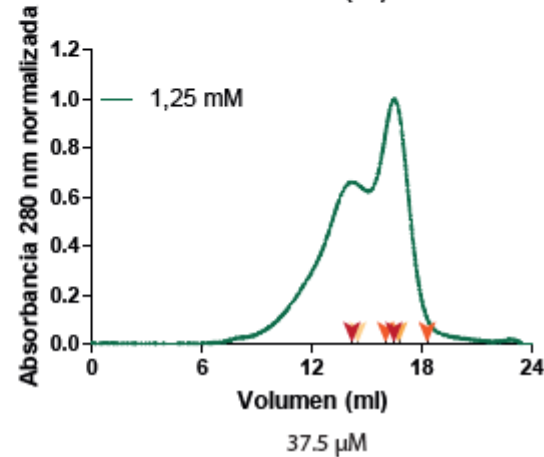
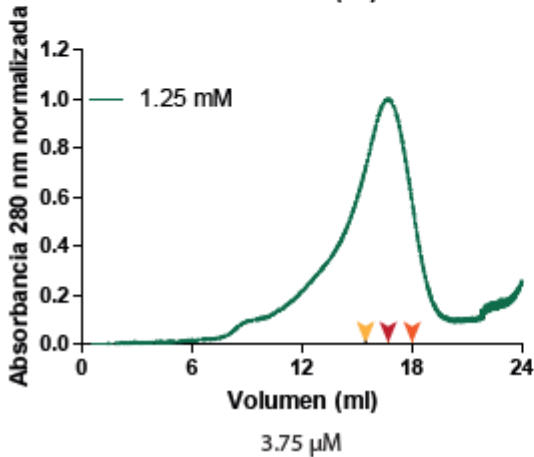
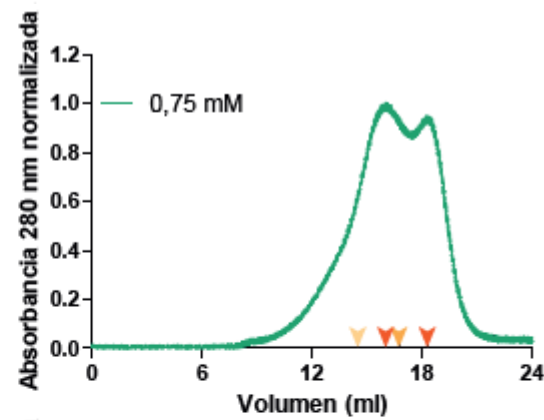
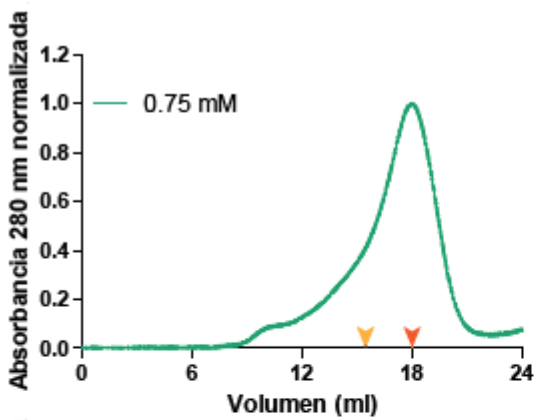
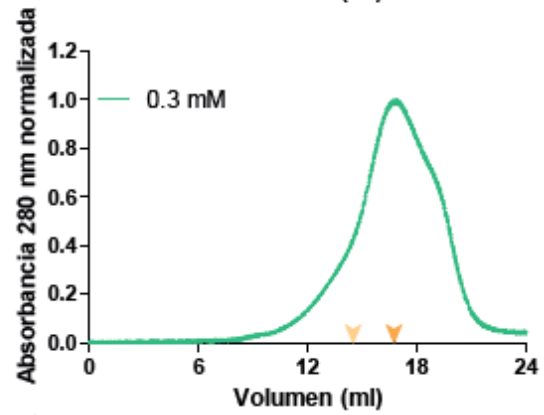
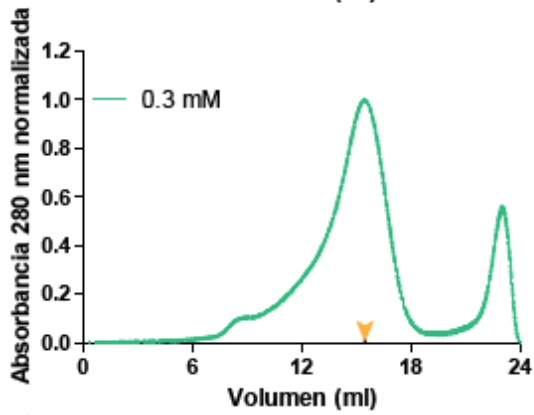
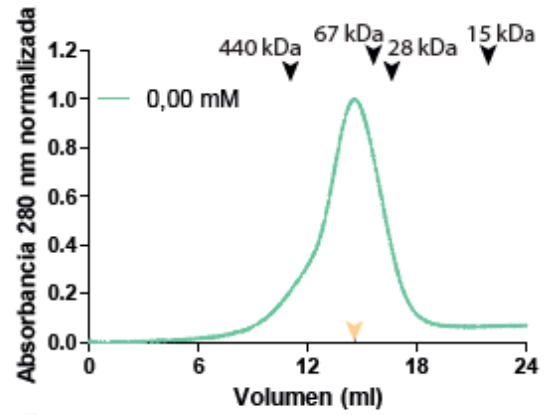
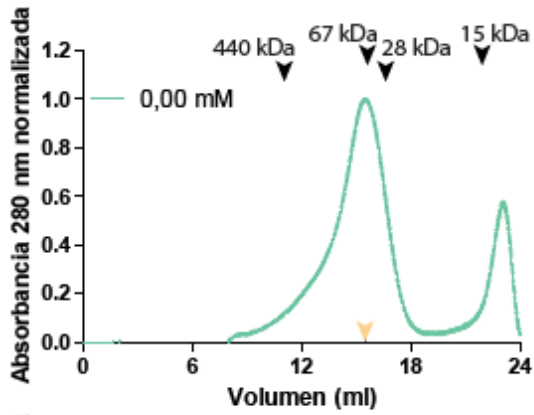


Figura 17: Elipticidad de RapD en función de diferentes concentraciones de calcio. Se muestra la elipticidad medida a 210 nm y el centro de masa espectral (CM) de Apo-RapD en respuesta a concentraciones crecientes de calcio (0 – 1.25 mM) indicando la simultaneidad de los cambios en la estructura secundaria y exposición marginal del único triptófano de la secuencia.

Se ha propuesto que las cadherinas median el contacto célula – célula a través de la dimerización de sus dominios extracelulares y que ese proceso se encuentra promovido y mantenido por los iones de calcio (Nagar et al. 1996, Pertz et al. 1999). Investigaciones previas mostraron que RapA2 recombinante y purificada es incapaz de formar oligómeros consigo misma o con otra proteína Rap como RapB. Para determinar si RapD posee la capacidad de formar oligómeros, se estudió el comportamiento agregativo de esta proteína en respuesta al calcio. El incremento en los valores de elipticidad en el espectro de dicroísmo circular, particularmente a longitudes de onda que van desde los 200 a los 205 nm pueden ser indicativos de agregación proteica, ya sea por multimerización, agregado inespecífico o a la presencia de varios sitios de unión a calcio. No obstante, el incremento en la elipticidad a 200 – 205 nm mostró un comportamiento dosis – respuesta al calcio saturando a los 0.5 mM aproximadamente. Por otro lado, la titulación de una dilución al décimo de Apo-RapD mostró el mismo comportamiento (Figura 16), apoyando la idea de que no se trata de una agregación inespecífica. Para evaluar la formación de multímeros en presencia o en ausencia de calcio se utilizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC por sus siglas en inglés) en dos concentraciones distintas de RapD (3.75  $\mu$ M y 37.5  $\mu$ M) (Figura 18). En ausencia de calcio se observó que la proteína, a ambas concentraciones, presenta un perfil de peso molecular homogéneo con máximos centrados en los 15.5 ml (3.75  $\mu$ M) y 14.5 ml (37.5  $\mu$ M), ninguno de ellos compatible con el peso molecular predicho para el monómero. A una concentración proteica de 3.75  $\mu$ M RapD, en presencia de 0.75 mM de calcio, se observó un cambio en el volumen de elución del pico hacia valores mayores (de menor radio hidrodinámico), indicando la adquisición de una estructura mucho más compacta que posiblemente corresponde al monómero estructurado. En presencia de 1.25 mM de calcio, se observó un nuevo corrimiento en el volumen de elución de la proteína hacia valores cercanos a los 67 kDa, lo cual es compatible con el peso molecular predicho para el dímero. Análogamente, cuando RapD se encuentra 10 veces más concentrada (37.5  $\mu$ M) en presencia de calcio de 0.3 mM, se observó el mismo corrimiento inicial hacia menores pesos moleculares. No obstante, a 0.75 mM de calcio se observó la presencia de dos picos discretos, uno que posiblemente corresponde al peso molecular del monómero estructurado y otro de mayor peso molecular

compatible con el peso molecular del dímero. Con el agregado de 1.25 mM de calcio, se observó la desaparición del pico de menor peso molecular (monómero) y la aparición de un tercer pico con un peso molecular estimado de más de 100 kDa el cual puede ser atribuido a un trímero o un tetrámero. Estos resultados sugieren que RapD se encuentra formando estructuras multiméricas de manera calcio dependiente de manera independiente de la concentración de proteína usada.



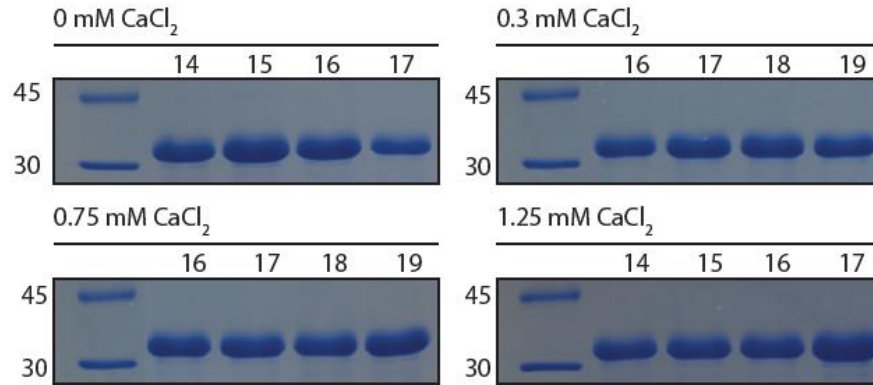


Figura 18: Cambios en el radio hidrodinámico de RapD en respuesta al calcio. Arriba) Cromatografía de exclusión molecular para RapD recombinante a diferentes concentraciones de calcio (entre 0 mM y 1.25 mM) y dos concentraciones de la proteína (3.75  $\mu$ M y 37.5  $\mu$ M). Las flechas coloreadas en el eje X indican los volúmenes de elución de los centros de cada pico en las distintas concentraciones de calcio desde naranja claro (0 mM de calcio) a naranja oscuro (1.25 mM de calcio). Abajo) SDS-PAGE 15% de las fracciones correspondientes a cada pico observado en los perfiles de elución de RapD 37.5  $\mu$ M

Los análisis por *Static Light Scattering* (SLS) de la proteína a 37.5  $\mu$ M permitieron demostrar que el pico de menor peso molecular observado a 0.75 mM de calcio corresponde al monómero (pico C) mientras que el pico de mayor radio hidrodinámico observado a 1.25 mM de calcio (pico A), cuando RapD se encuentra en una concentración mayor (37.5  $\mu$ M), corresponde a un trímero. Por último, se obtuvo un pico con un hombro de peso molecular intermedio (pico B) el cual puede ser atribuido a un equilibrio entre el monómero y el dímero ya que su peso molecular corresponde al promedio de PM entre ambas formas (Figura 19).

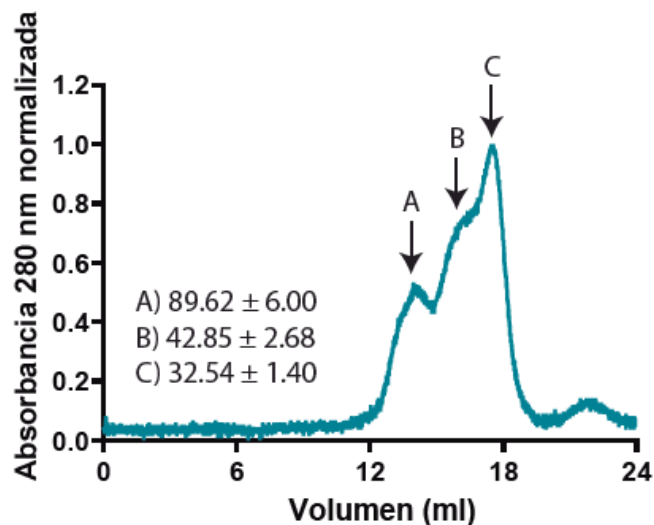


Figura 19: Ensayo de *Static light scattering* (SLS) para RapD recombinante purificada en presencia de 1.25 mM de calcio a una concentración de RapD de 37.5  $\mu$ M. Las letras indican el peso molecular calculado y su desvío estándar para los centros de cada pico (A, B, C).

## El polisacárido induce cambios conformacionales en RapD

Diferentes observaciones descritas en las secciones anteriores refuerzan la hipótesis que RapD interactúa con el EPS de *Rhizobium*. Por lo tanto, continuando con el estudio del comportamiento de la proteína RapD se analizó si la presencia del EPS ejerce algún efecto sobre la estructura secundaria de RapD. El análisis por dicroísmo circular mostró que, en presencia de 1.25 mM de  $\text{CaCl}_2$ , concentraciones crecientes de EPS pretratado con proteinasa K inducen un ligero cambio conformacional en la estructura secundaria de RapD, principalmente un incremento en la elipticidad. Estas observaciones sugieren que el EPS favorece la formación de agregados o multímeros (Figura 20). Este cambio es específico para el polisacárido ácido secretado por *Rhizobium* ya que tratamientos análogos con xantano, otro polisacárido aniónico de composición monomérica similar (producido por el patógeno de plantas *Xanthomonas campestris*), no mostró cambios en la estructura secundaria de la proteína en el rango de concentraciones analizado (Figura 20).

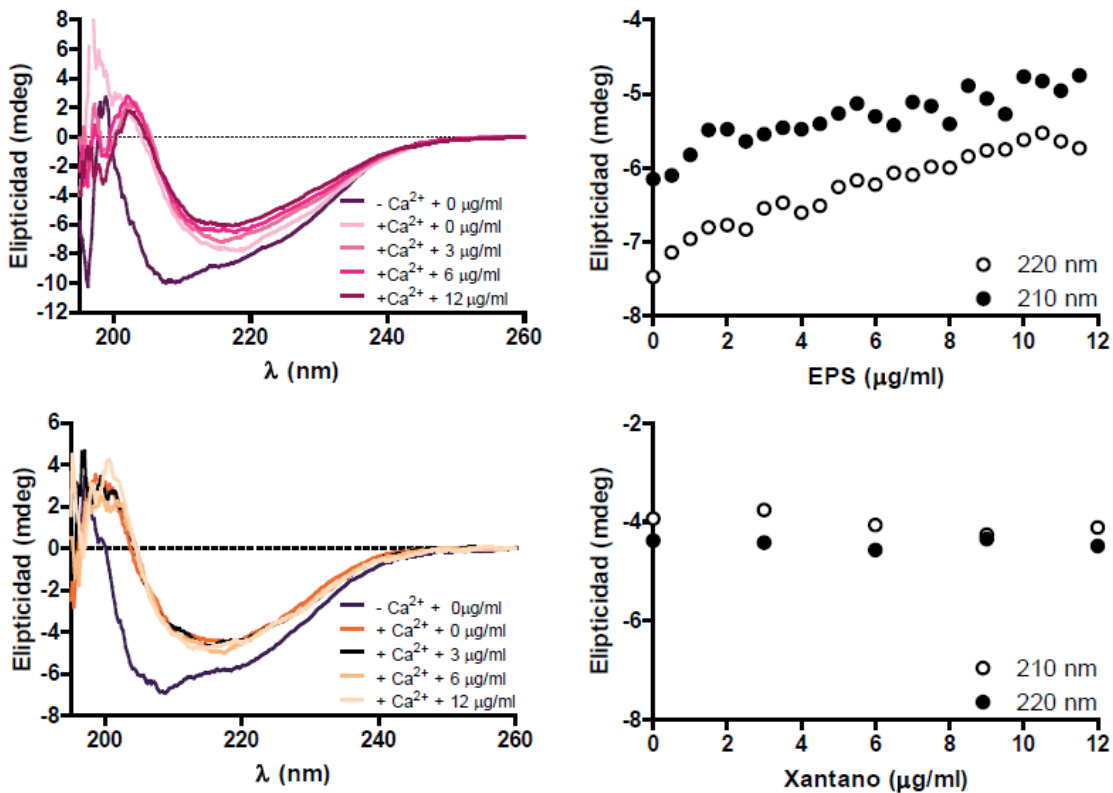


Figura 20: Efecto del EPS pretratado con proteinasa K (arriba izquierda) o el xantano (abajo izquierda) sobre la estructura secundaria de RapD. (Izquierda) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para RapD decalcificada en presencia de 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$  (+Ca<sup>2+</sup>) y con concentraciones crecientes de EPS (arriba) o xantano (abajo) (0 a 12 µg/ml). (Derecha) Elipticidad medida a 210 nm y 220 nm a concentraciones crecientes de EPS (arriba) o Xantano (abajo) desde 0 µg/ml a 12 µg/ml

El mismo efecto fue observado por espectroscopía de fluorescencia, el cual mostró un cambio al rojo (*redshift*) luego de la adición de EPS en presencia de calcio (figura 21). Cabe destacar que estos cambios fueron observados únicamente en presencia de calcio ya que el EPS por sí solo no fue capaz de gatillar ningún cambio en la estructura de la proteína.

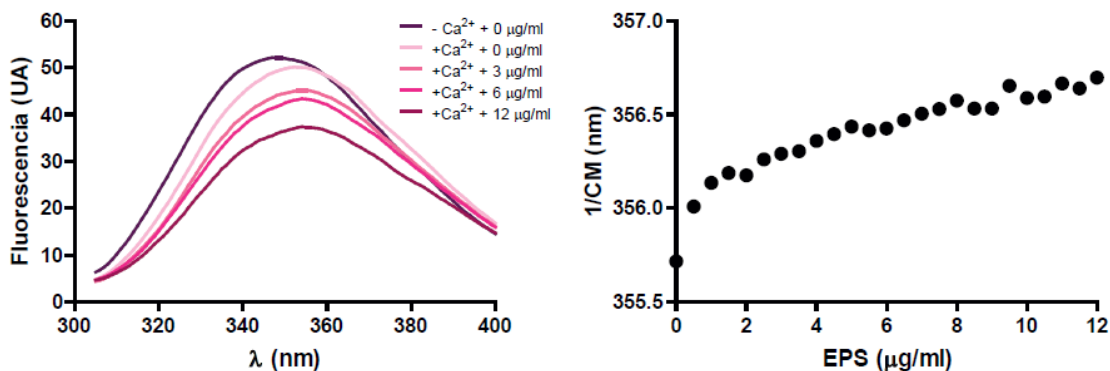


Figura 21: Espectros de fluorescencia para RapD en ausencia de calcio o 1.25 mM CaCl<sub>2</sub> en presencia de concentraciones crecientes de EPS (0 a 12 µg/ml) (izquierda); y centro de masa espectral (CM) de RapD en respuesta a concentraciones crecientes de EPS (0 a 12 µg/ml) (derecha).

La dependencia de la interacción RapD – EPS para promover estos cambios fue analizada por dicroísmo circular. RapD fue incubada con concentraciones crecientes de NaCl en presencia de calcio y EPS (Figura 22). Los resultados muestran que el NaCl no tuvo ningún efecto en los espectros de CD sugiriendo que la interacción RapD – EPS no puede ser disociada por desplazamiento iónico o que, una vez gatillado, los cambios conformacionales producto de la interacción de RapD con calcio y EPS no puede ser revertidos tras la disociación con el EPS.

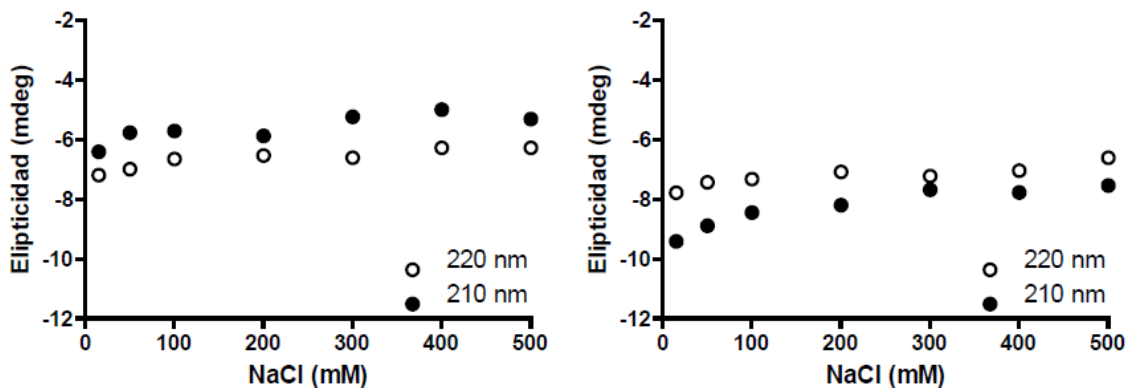


Figura 22: Espectros de dicroísmo circular en el UV – lejano a concentraciones crecientes de NaCl (0 a 500 mM). Se muestra la elipticidad medida a 210 nm y 220 nm luego de 30 minutos de incubación a 25° C de RapD – EPS en presencia de calcio (izquierda) o en ausencia de calcio (derecha).

### Interacción de RapD con el EPS

Estudios previos mostraron que los dominios Ra/CHDL le confieren a RapA2 la capacidad de unirse al polisacárido ácido ya sea en su formato capsular (CPS) o en su forma liberada (EPS) (Abdian et al. 2013). La propiedad de interactuar con hidratos de carbono de los dominios CHDL ha sido descrita en proteínas de diferentes organismos (Cao et al. 2005). El dominio N-terminal de RapD consiste en un dominio Ra/CHDL que conserva un 41% de identidad con el dominio C-terminal de RapA2 (Figura 8). Esta observación y otras descritas en las secciones anteriores sugieren que RapD podría ser capaz de unirse al polisacárido a través de este dominio. Para corroborar esto, se realizó un ELISA en el que se evaluó la presencia de RapD endógena asociada al EPS en preparaciones de éste, obtenidos del medio extracelular de la cepa wt de *R/v* 3841. Además, se las comparó con los



EPS provenientes de otras cepas mutantes (Figura 23). Brevemente, los polisacáridos fueron inmovilizados en placas *multiwell* y la proteína RapD endógena fue revelada utilizando anticuerpos específicos anti-RapD. La señal observada para la preparación de EPS proveniente de la cepa wt fue significativamente mayor que aquella de las mutantes  $\Delta rapD$ ,  $\Delta rapD\Delta rapA2$  o  $prsD$ , y de aquella obtenida de un polisacárido pretratado con proteinasa K (controles negativos), indicando que RapD es retenida en el EPS. Interesantemente, un incremento del  $(30 \pm 8) \%$  en la señal de RapD asociada al EPS se observó consistentemente en el contexto  $rapA2$  mutante. Esta observación sugiere algún tipo de interacción entre ambas Rap(s) y el EPS.

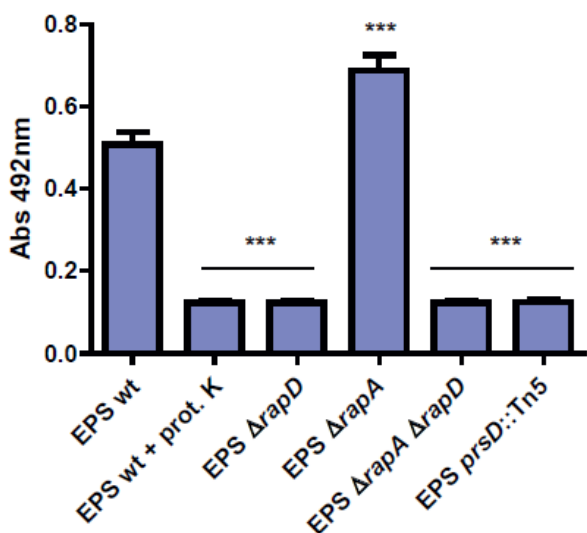


Figura 23: Inmunodetección de la interacción RapD-EPS por ELISA. Se determinó la presencia de RapD endógena asociada al EPS obtenido de varias cepas derivadas de *R/v* 3841. Las preparaciones de EPS (0.1 mg/ml) analizadas provenientes de cultivos de 5 días en medio mínimo Y manitol fueron incubadas con *R/v*.el antisuero policlonal anti RapD y se reveló con un anticuerpo secundario anti ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (Hrp). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al EPS de la cepa wt analizadas por ANOVA de un factor con un  $\alpha$  de 0.05;  $p < 0.0001$ .

La interacción entre RapD y el EPS también se analizó por un ensayo de ELISA directo utilizando como sustrato fijo EPS pretratado con proteinasa K proveniente de la cepa *R/v* 3841, y concentraciones crecientes de RapD desde 0.05  $\mu\text{g/ml}$  a 10  $\mu\text{g/ml}$  en presencia de calcio. Este análisis mostró un comportamiento dosis-dependiente en la unión de RapD con el EPS (Figura 24). Sorprendentemente, bajo las condiciones ensayadas, el xantano fue capaz de interactuar con RapD en menor medida. Esto puede deberse a semejanzas estructurales ya que ambos son aniónicos y están compuestos por unidades repetitivas de tres azúcares: dos neutros y uno aniónico; glucosa, galactosa y ácido glucurónico (en el caso del EPS de *Rhizobium*) y glucosa, ácido galacturónico y manosa (en el caso del xantano) (García – Ochoa et al. 2000)

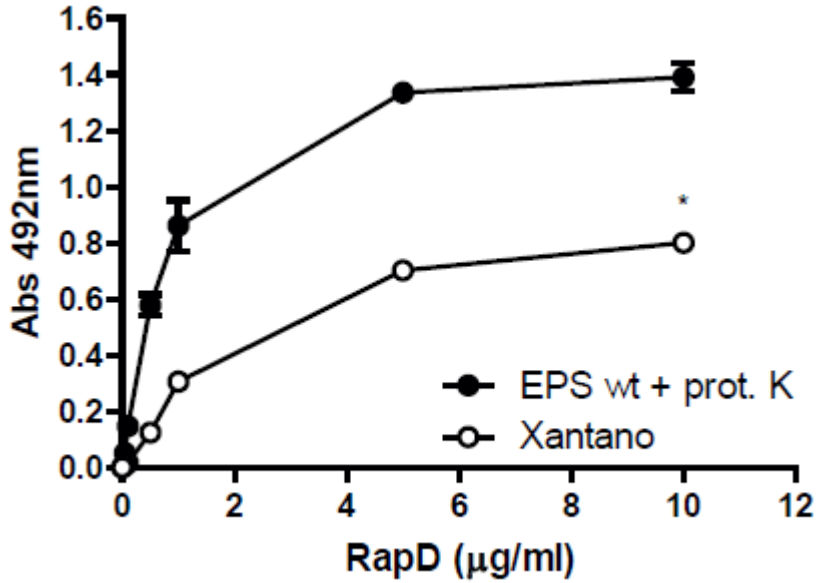


Figura 24: Ensayo de ELISA directo RapD-EPS. Se muestra la cinética de la unión de RapD a EPS pretratado con proteinasa K e inmobilizado en presencia de 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y revelado utilizando anticuerpos anti-RapD. El 50% de la unión de RapD al EPS se observó a una concentración de 0.5 µg/ml de la proteína mientras que el 50% de la unión al xantano se observó a una concentración de 1 µg/ml de la proteína. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes medidos por triplicado. Un asterisco indica diferencias significativas entre ambos polisacáridos analizando mediante un test de t pareado con un nivel de significación del 5%;  $p < 0.05$ .

Por último, la interacción entre RapD y el EPS también se examinó a través de un ensayo de inhibición del binding (BIA) utilizando un ELISA modificado. Brevemente, previo a la incubación de RapD recombinante con el polisacárido inmobilizado, la inhibición de la unión se evaluó incubando la proteína con distintas diluciones del agente competidor: EPS – Xantano – Vehículo (buffer), en presencia de calcio. Únicamente el EPS de *Rhizobium* (y no el xantano) fue capaz de inhibir la unión de RapD al EPS inmobilizado de forma concentración-dependiente, indicando que hay un reconocimiento específico del EPS por parte de RapD (Figura 25).

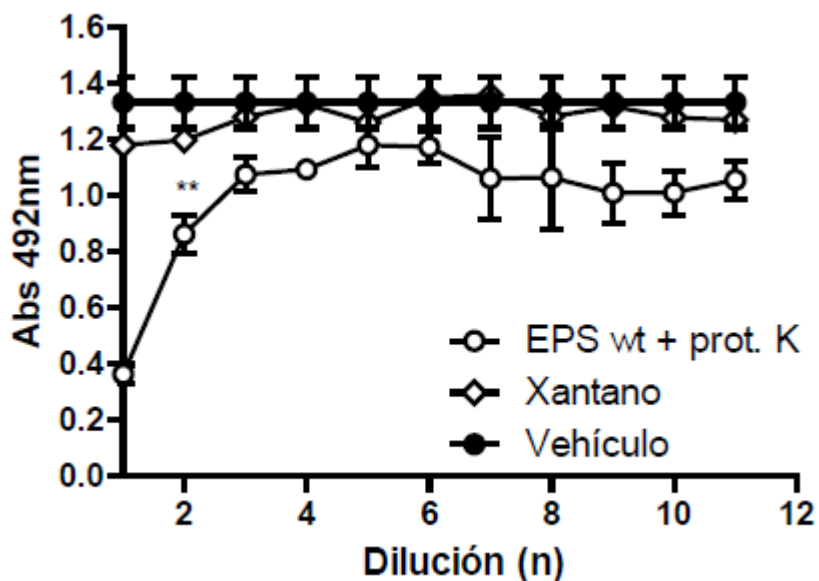


Figura 25: Ensayo de inhibición del binding (BIA) del EPS a la proteína RapD utilizando diluciones de xantano o EPS pretratado con proteinasa K como competidores en presencia de calcio. La inhibición de la unión de RapD al polisacárido inmovilizado se evaluó utilizando distintas concentraciones de competidor. En el eje X se grafican las diluciones al décimo de cada competidor respectivamente comenzando desde 0.1 mg/ml. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los 3 tratamientos en la dilución al 100 del compuesto inhibitorio. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de 1 factor con un  $\alpha$  de 0.05 utilizando un test de Tukey;  $p < 0.005$ .

Como fue mencionado anteriormente, el EPS de *R/v* 3841 está compuesto por un octasacárido repetido en tándem de glucosa, ácido glucurónico y galactosa en una proporción 5:2:1 (Robertsen et al. 1981; Laus et al. 2004). Trabajos anteriores han demostrado que la unión de RapA2 al CPS/EPS es inhibida por la presencia de ácido glucurónico en el rango de 20 – 100 mM (Abdian et al. 2013). Con el fin de evaluar si RapD reconoce algún monosacárido en particular del EPS, se realizaron ensayos de BIA en presencia de monosacáridos libres y calcio. La interacción RapD-EPS fue inhibida en presencia de altas concentraciones de galactosa en el rango de los mM, pero no fue alterada por la presencia de glucosa o ácido glucurónico (figura 26) sugiriendo que la galactosa o algún oligosacárido con galactosa estaría implicado en la estructura oligosacáridica del EPS reconocida por RapD.

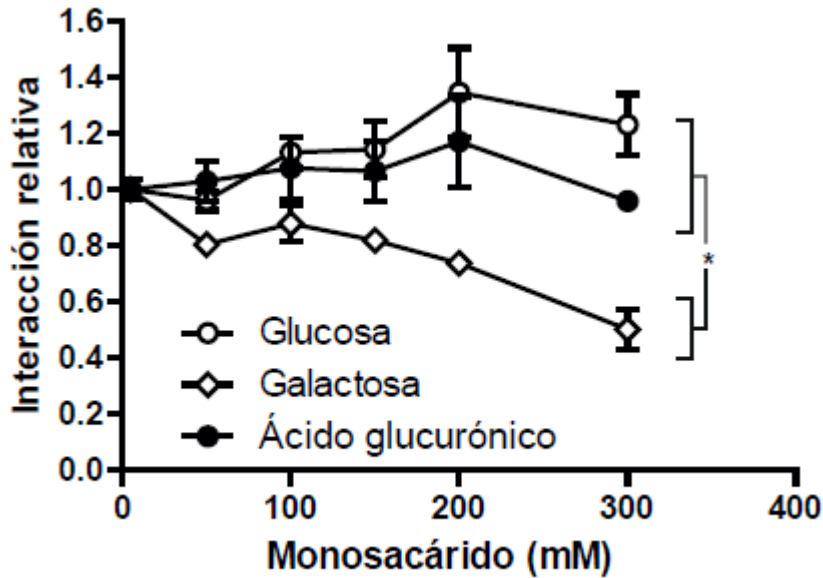


Figura 26: Dinámica de la unión de RapD al EPS analizado por BIA utilizando monosacáridos como agentes competidores. Se realizó un ensayo de BIA preincubando la proteína con concentraciones crecientes de glucosa, galactosa o ácido glucurónico (desde los 0 a los 300 mM) previo a la exposición al EPS inmovilizado pretratado con proteinasa K. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas independientes medidas por duplicado. Un asterisco indica diferencias significativas entre la galactosa y la glucosa o el ácido glucurónico en una concentración de 300 mM analizado mediante un ANOVA de un factor con un  $\alpha$  de 0.05 y el test de Tukey;  $p < 0.05$ .

Para investigar si RapA2 y RapD pueden ocupar sitios de unión en el EPS similares o reconocer estructuras equivalentes en el polisacárido, se llevaron a cabo ensayos de competencia, preincubando el EPS con concentraciones crecientes de RapA2 o incubando simultáneamente el polisacárido inmovilizado con ambas proteínas. En estas condiciones, no se observó inhibición en la unión de RapD-EPS sugiriendo que las estructuras presentes en el polisacárido reconocidas por estas proteínas serían, en principio, diferentes (figura 27).

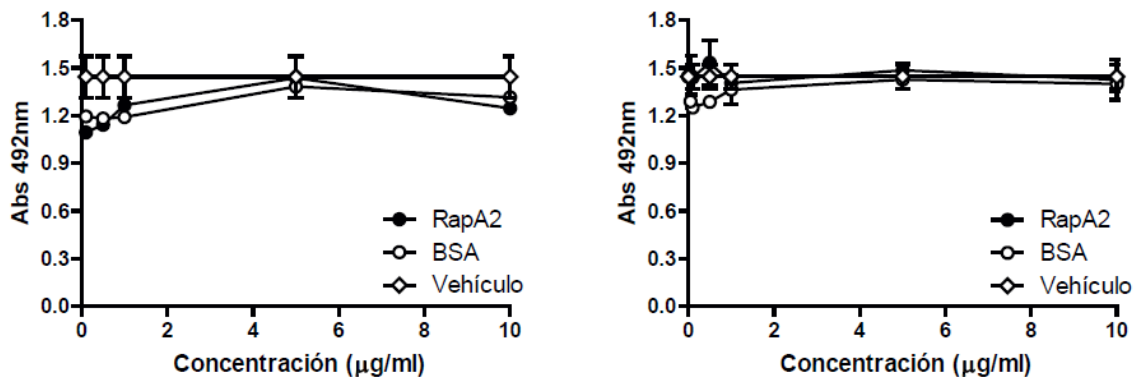


Figura 27: Competencia entre RapA2 y RapD por los sitios de unión al EPS. El EPS pretratado con proteinasa K fue preincubado con RapA2 o BSA (0 – 10 µg/ml) previo al agregado de RapD 5 µg/ml (izquierda); o incubando simultáneamente con RapA2 o BSA (0 – 10 µg/ml) (derecha).

### Estudio de la capacidad de formación de biofilm y fenotipos asociados.

Para evaluar si la ausencia y un exceso de RapD altera las propiedades de la bacteria relacionadas con la formación de biofilm, se analizaron diversos fenotipos asociados a su desarrollo en cepas mutante *rapD* y que sobreexpresa la proteína. No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas en la morfología de las macrocolonias, adhesión al poliestireno, motilidad tipo swimming y swarming ni en la producción de exopolisacárido en estas cepas en comparación con la cepa wt (Tabla 3, Tabla 4).

	TY		Y	
	Wt	<i>ΔrapD</i>	wt	<i>ΔrapD</i>
<b>Morfología de la macrocolonia</b>	Mucosa, brillante y con forma convexa	Mucosa, brillante y con forma convexa	Mucosa, brillante y con forma convexa	Mucosa, brillante y con forma convexa
<b>Adhesión al poliestireno (Relativa a la cepa wt)</b>	100	112.69 ± 12.1	100	105.9 ± 8.6
<b>Motilidad tipo swimming (diámetro en cm)</b>	2.97 ± 0.13	3.03 ± 0.23	1.85 ± 0.22	1.77 ± 0.25
<b>Motilidad tipo swarming (diámetro en cm)</b>	0.83 ± 0.06	0.82 ± 0.08	1.62 ± 0.03	1.54 ± 0.04
<b>Producción de EPS (mg de peso seco / 100 ml de cultivo)</b>	ND	ND	114.8	117

Tabla 3: Fenotipos relacionados con la formación de biofilm en *Rlv* 3841 y mutante derivada *rapD* en medio TY y Y – manitol. Los fenotipos evaluados incluyen morfología de macrocolonia, adhesión de biomasa bacteriana al poliestireno, motilidad tipo swimming y swarming y producción de EPS. Todas las mediciones fueron realizadas de acuerdo a la metodología descrita en trabajos anteriores (Russo et al. 2006; Vozza – Abdian et al. 2016; Sorroche et al. 2018).

Morfología de la macrocolonia	Adhesión al poliestireno (Relativa a la cepa wt)	Motilidad tipo swimming (diámetro en cm)	Motilidad tipo swarming (diámetro en cm)	Producción de EPS (mg de peso seco / 100 ml de cultivo)
<b>wt/pBBR</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	113.70 ± 23.3	1.83 ± 0.30	ND	ND
<b>wt/pBBRrapD</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	117.79 ± 24.2	1.76 ± 0.18	ND	ND
<b>ΔrapD/pBBR</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	ND	1.70 ± 0.10	0.93 ± 0.03	ND
<b>ΔrapD/pBBRrapD</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	ND	1.46 ± 0.32	0.95 ± 0.05	ND
<b>wt/pBBR</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	62.16 ± 8.40	1.50 ± 0.12	ND	110
<b>wt/pBBRrapD</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	71.34 ± 24	1.26 ± 0.14	ND	99.7
<b>ΔrapD/pBBR</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	125.04 ± 54.4	1.74 ± 0.12	1.57 ± 0.06	115.7
<b>ΔrapD/pBBRrapD</b> Mucosa, brillante y con forma convexa	108.4 ± 23.6	1.48 ± 0.14	1.56 ± 0.01	108.7

TY

Y

Tabla 4: Fenotipos relacionados a la formación de biofilm para *Rlv* 3841 y cepas derivadas conteniendo los plásmidos pBBR/pBBRrapD en medio TY y Y – manitol. Los fenotipos evaluados incluyen morfología de macrocolonia, adhesión de biomasa bacteriana al poliestireno, motilidad tipo swimming y swarming y producción de EPS. Todas las mediciones fueron realizadas de acuerdo a trabajos anteriores (Russo et al. 2006; Vozza – Abdian et al. 2016; Sorroche et al. 2018).

### Análisis del perfil de peso molecular del EPS: Interacción entre RapD y RapA2

Como fue mencionado anteriormente, estudios previos mostraron que diferencias en los niveles extracelulares de RapA modifican la distribución de los tamaños de las moléculas del EPS. Para evaluar si la ausencia de RapD o la ausencia conjunta de RapA2 y RapD modifican la distribución de peso molecular de las distintas especies de EPS, el polisacárido obtenido del medio extracelular de las cepas wt y derivadas fueron analizadas por cromatografías de exclusión molecular (SEC), utilizando una columna superosa 6 HR 10/30 tal cual fue descrito en Materiales y Métodos. Este análisis mostró una mayor proporción de especies de bajo peso molecular comparado con la wt en las mutantes simples *rapD* y *rapA2*, y el mismo comportamiento, de manera más evidente, en la doble mutante *rapA2 rapD* (figura 28). También se estudió el efecto de la sobreexpresión de RapD sobre el EPS en la cepa que mostró el efecto más notorio en el perfil de peso molecular del EPS (mutante doble *rapA2 rapD*). La sobreproducción de RapD restituyó, en esta mutante, el perfil de peso molecular del EPS hacia especies de mayor peso molecular (figura 28A – panel inferior). Las diferencias en los pesos moleculares de las especies del EPS en las mutantes *rap* puede deberse a una actividad incrementada de las glicanasas de EPS de la familia Rap, como PlyB. Debe ser tenido en cuenta que las glicanasas PlyA y PlyB son activas únicamente en la superficie celular (Zorreguieta et al. 2000). Otra posibilidad es que en ausencia de RapA2/RapD, las cadenas de polisacárido que emergen de la superficie bacteriana sean más susceptibles a la actividad glicanasa. Se evaluó la actividad glicanasa usando carboximetil celulosa (CMC) como sustrato para un ensayo en placa (Finnie et al. 1997). La actividad de glicanasa  $\beta$  1,4 extracelular fue similar en los contextos wt y *rapD* mutante, mostrando únicamente actividad de glicanasa incrementada y similar entre sí en los contextos *rapA2* y *rapA2 rapD* mutante (figura 28B – panel inferior). Estos resultados sugieren que las diferencias observadas en los perfiles de peso molecular del EPS de las cepas wt y  $\Delta$ *rapD*, o de las mutantes *rapA2* y doble mutante *rapA2 rapD* no pueden deberse únicamente a una actividad de glicanasa incrementada en el medio extracelular. En conjunto estas observaciones sugieren que las diferencias en los perfiles de peso molecular del EPS de las diversas mutantes *rap* en comparación con la cepa wt podrían deberse a la interacción de estas Rap(s) con las cadenas emergentes de polisacárido modulando la actividad de las glicanasas Ply.

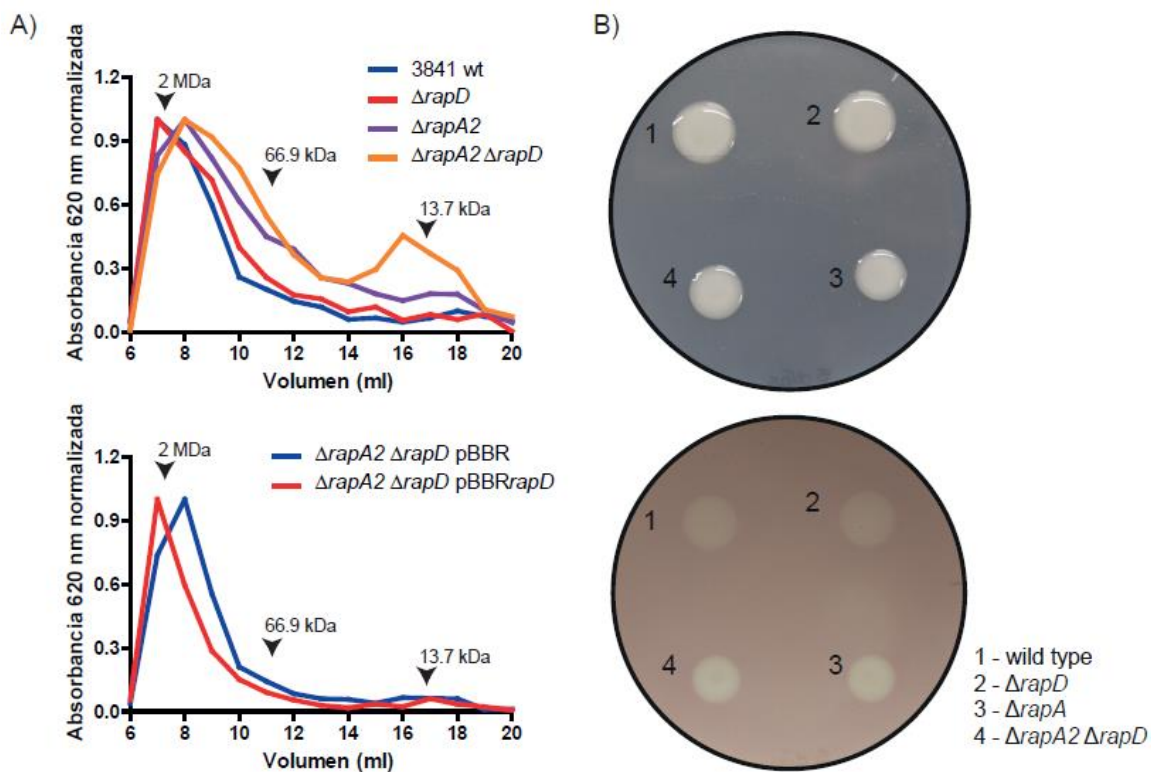


Figura 28: Análisis del tamaño del EPS producido en diferentes cepas derivadas de *Rlv* 3841 por cromatografía de exclusión molecular. A) Arriba: perfil de peso molecular del EPS producido por la cepa wt y sus derivadas mutantes *rapD*, *rapA2* y *rapA2rapD*. Abajo: Efecto de la sobreexpresión de *RapD* sobre el perfil del EPS. Las flechas indican los marcadores de peso molecular utilizados. B) Ensayo de la actividad glicanasa de *Rlv* 3841 y derivadas mutantes *rapD*, *rapA2*, *rapA2 rapD* luego de 5 días de cultivo en placas de agar de medio mínimo Y – manitol conteniendo carboximetilcelulosa (CMC). Arriba: Morfología de las macrocolonias previo al ensayo de actividad glicanasa. Abajo: Actividad glicanasa de las cepas. La actividad glicanasa de cada cepa se evidencia por la ausencia de tinción (halo) en la zona de degradación del sustrato.



## Capítulo II: Glicanasa PlyB

El SSTI PrsDE secreta un gran número de proteínas, dentro de los sustratos de este sistema se encuentran las proteínas RapA y RapD que cuentan con un dominio Ra/CHDL que les confiere la capacidad de unir carbohidratos, como se mencionó anteriormente (Abdian 2013 y esta tesis). Los primeros estudios que describieron el sistema PrsDE identificaron proteínas sustrato del sistema cuya ausencia generaba un fenotipo asociado al polisacárido bacteriano. Las bacterias mutantes producían un polisacárido muy poco procesado, de alto peso molecular, muy viscoso y de cadenas extremadamente largas denominado fenotipo “sticky” (Finnie et al. 1997, 1998; Zorreguieta et al. 2000). Estos cambios en el EPS fueron atribuidos a las glicanasas Ply que pertenecen a la familia de proteínas Rap y fueron denominadas PlyA, PlyB y PlyC (Finnie 1998, Zorreguieta 2000 y Krehenbrick 2008). Posteriormente se identificó que, además de los efectos asociados al polisacárido, la ausencia de las glicanasas, y principalmente de PlyB en el medio extracelular alteraba de manera significativa la arquitectura del biofilm formado por *Rhizobium leguminosarum*, lo que sugiere la importancia del EPS como componente principal de la matriz extracelular del biofilm de *Rlv* (Zorreguieta et al. 2000; Russo et al. 2006).

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado la importancia de los biofilms en la colonización del huésped por parte de los rizobios y más aún la importancia del polisacárido como actor clave durante el proceso de nodulación, posiblemente durante la supresión de la respuesta inmune de la planta y movimiento a través del llamado hilo de infección (estructura mediante la cual los rizobios ingresan a través de las células de la planta al destino donde se va a desarrollar el nódulo fijador de nitrógeno) (Acosta-Jurado et al. 2021). No obstante, no hay estudios que hayan investigado las diversas formas en las que se procesa el EPS más allá de los genes involucrados en su síntesis y secreción. Por esa razón, se decidió utilizar como modelo a *Rhizobium leguminosarum*, el cual tiene un sistema de secreción cuyos sustratos se encuentran involucrados en el procesamiento del polisacárido luego de que este haya sido sintetizado y, presumiblemente, durante su secreción al medio extracelular.

### PlyB es una glicanasa extracelular

Como fue mencionado anteriormente, PlyB forma parte de la familia de proteínas Rap (figura 8) y los estudios genéticos indicaron que es responsable de una actividad de glicanasa  $\beta$  1,4 extracelular que es dependiente del SSTI PrsDE (Finnie et al. 1997, Russo et al. 2006). Con el objetivo de comprender la función que cumple sobre el EPS la actividad enzimática catalizada por PlyB, se construyó una cepa que sobreexpresa PlyB en el contexto genético de *Rlv* A34, portadora del vector pBBR1MCS5 $plyB$ . Por otro lado, se utilizó la cepa A603, una cepa mutante por inserción de un transposón Tn5 en un sistema de dos componentes que genera una mayor acumulación de PlyB en el medio extracelular (no publicado) y las cepas  $plyB::Tn5$  (Russo et al. 2006) y  $prsD::Tn5$  (Zorreguieta et al. 2000) las cuales cuentan con una inserción del transposón Tn5 en los genes de  $plyB$  y  $prsD$  respectivamente. Se corroboró la presencia de PlyB extracelular en estas cepas mediante un análisis de los secretomas de 48hs de cultivo en medio mínimo Y – manitol, revelados con un anticuerpo específico anti PlyB (Voza et al. 2016). Los resultados indican que las cepas pBBR5 $plyB$  y la A603 presentan mayor acumulación de PlyB extracelular que la cepa wt para la misma cantidad de proteínas totales. Además, se puede observar la ausencia de PlyB en el medio de cultivo tanto para las mutantes del sistema de secreción y la cepa con la inserción del transposón Tn5 en el gen  $plyB$  (Figura 29). Curiosamente, en un contexto de sobreexpresión de PlyB (pBBR5 $plyB$  y A603) se

observa la señal correspondiente a esta proteína como una triple banda, la observada en la cepa wt, una banda por encima y otra por debajo. Este triplete se encuentra ausente en cepas con niveles de expresión endógena (wt y pBBR5) y mutantes para esta proteína (mutantes *prsD* y *plyB*) indicando que la señal observada corresponde específicamente a PlyB y no se debe al cruzamiento de los anticuerpos con las glicanasas PlyA o PlyC. La razón por la cual se observa este comportamiento se desconoce.

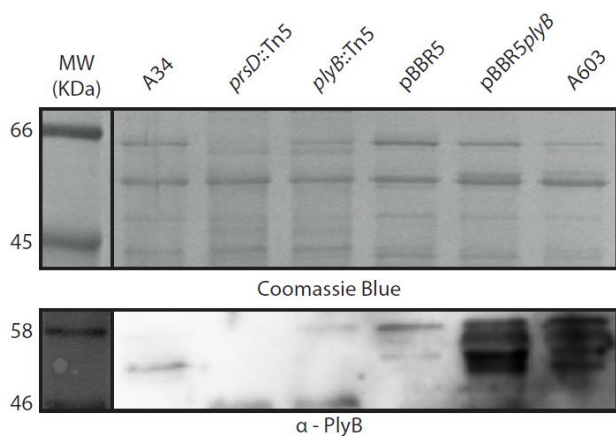


Figura 29: Preparaciones de proteínas extracelulares de cepas derivadas de *R/v* A34 analizadas por SDS-PAGE 10% y Western blot. La inmunodetección de PlyB fue realizada utilizando anticuerpos policlonales anti-PlyB de conejo revelados con anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados a Hrp (Vozza et al. 2016).

Habiendo caracterizado los niveles de PlyB extracelular, se analizaron los efectos de los niveles alterados de esta proteína sobre la morfología de la macrocolonia y los niveles de actividad de glicanasa mediante un ensayo en placa utilizando CMC como sustrato (Figura 30). Estudios previos indican que bacterias mutantes *plyB* tienen un fenotipo de colonia muy mucosas (*sticky colonies*), y producen polisacáridos afectados en el número de extremos reductores, que ocasiona un aumento de densidad de los cultivos con respecto a la cepa wt (Zorreguieta 2000, Russo 2006, Zorreguieta datos no publicados). Por el contrario, en aquellas cepas donde los niveles de PlyB extracelular aumentan como la mutante A603 o la cepa *pBBR5plyB*, la mucosidad de la macrocolonia disminuye dando lugar a colonias de aspecto seco, opacas y chatas, en comparación con las colonias convexas y brillantes como la de la cepa wt (figura 30). Los niveles de actividad glicanasa  $\beta$  1,4 se analizaron evaluando la degradación de CMC en ensayos de placa, mostrando que aquellas cepas con niveles altos de expresión de PlyB presentan mayores niveles de actividad glicanasa. De acuerdo a lo observado para los niveles de PlyB extracelular (Figura 29), la cepa *pBBR5plyB* presenta el mayor nivel de actividad glicanasa, seguida de la cepa A603 y luego la wt. Por el contrario, cepas deficientes de PlyB mostraron ausencia de un halo de degradación por debajo de la colonia (*prsD::Tn5*) o la presencia de un halo difuso (*plyB::Tn5*); este último caso debido a que además de *plyB*, hay otras dos glicanasas Rap presentes en el secretoma llamadas PlyA y PlyC las cuales son responsables de la actividad observada. En conjunto, estos resultados sugieren, además, que la glicanasa PlyB codificada en el vector de expresión pBBR es activa en el medio extracelular y es capaz de degradar CMC.

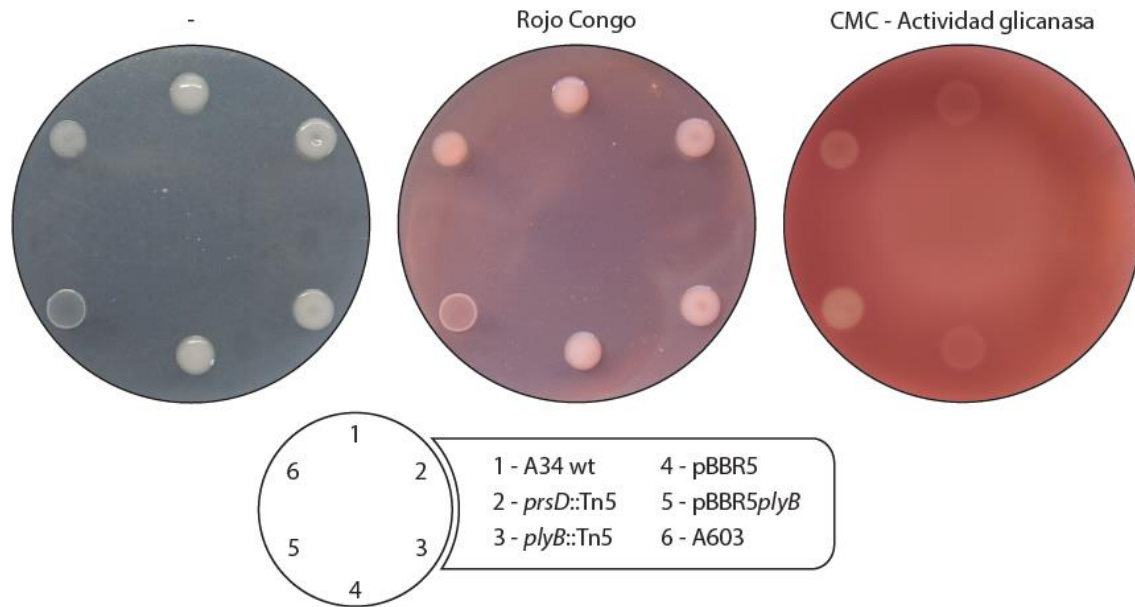


Figura 30: Aspecto macroscópico y análisis de la actividad glicanasa  $\beta$  1,4 en *Rlv* A34 y cepas derivadas. La presencia de actividad glicanasa sobre carboximetilcelulosa (CMC) fue analizada en placas conteniendo Rojo Congo al 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y CMC 0.1% y evidenciada como halos de degradación del sustrato CMC con pérdida de la coloración.

Estudios previos indicaron que la ausencia de PlyB extracelular en la mutante *plyB* genera una disminución en la adhesión de la biomasa al poliestireno y la alteración de la arquitectura del biofilm, afectando la formación de biofilms en *Rlv* A34 (Russo et al. 2006). Con el fin de profundizar el análisis, se estudió el efecto de la sobreexpresión de PlyB en la formación de biofilm, para esto se cuantificó mediante cristal violeta la capacidad de adhesión a placas de poliestireno en medio mínimo Y-manitol, condición en la cual *Rlv* forma biofilms estructurados y niveles incrementados de EPS (Russo et al. 2006) (Figura 31).

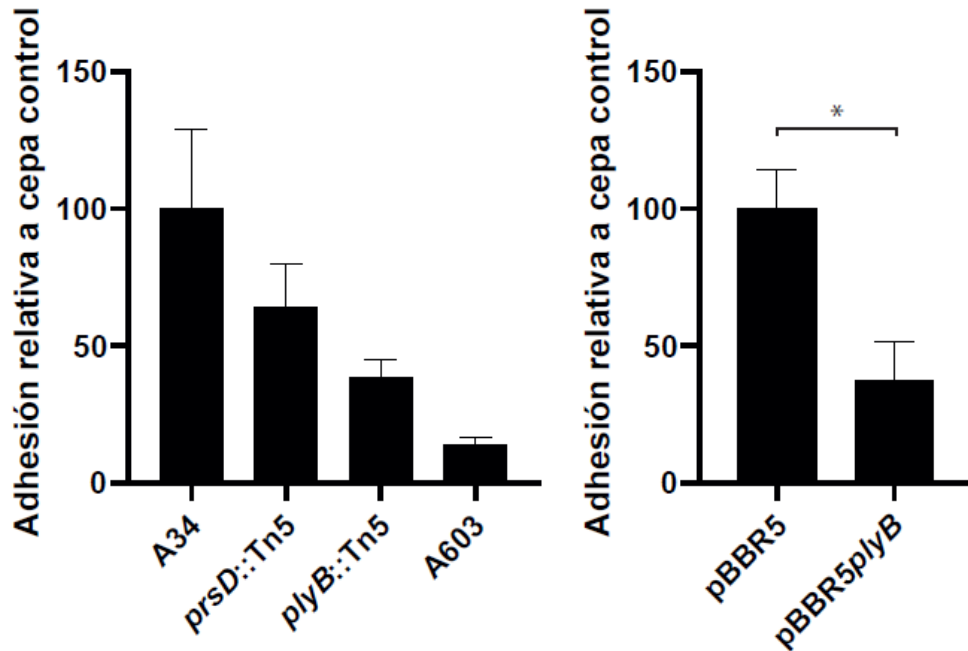


Figura 31: Adhesión al poliestireno en cepas derivadas de A34 en medio mínimo Y-manitol luego de 96 hs de cultivo a 28° C. En el eje Y se grafica la relación entre la absorbancia a 590 nm, indicativo de la cantidad de cristal violeta retenida por el biofilm, y la densidad óptica a 600 nm indicativo del crecimiento del cultivo normalizada con la cepa control. El asterisco indica diferencias significativas obtenidas mediante un test de T de Student con un nivel de significancia del 5%;  $p < 0.05$ .

Cuando se compara las cepas pBBR5 y pBBR5*plyB*, se observa que la formación de biofilm es menor en esta última con respecto a la cepa control. Sumado a esto, la cepa sobreproductora de PlyB por inserción de un transposón Tn5 (A603) también presenta menores niveles de formación de biofilm con respecto a la cepa wt. Al igual que esta última, las cepas deficientes de PlyB extracelular (mutantes *prsD* y *plyB*) presentan una menor capacidad de formación de biofilm cuando se la compara con la cepa wt. En conjunto, estos resultados indican que tanto los niveles incrementados como la ausencia de PlyB extracelular alteran la formación de biofilm de *R/v*. Es probable que este comportamiento se deba a los efectos que genera sobre el EPS la alteración de los niveles extracelulares de esta proteína.

### PlyB es una glicanasa $\beta$ 1,4 que cliva las unidades repetitivas del EPS

Con el fin de determinar cómo afectan los distintos niveles de PlyB el perfil de tamaños de las cadenas de EPS que se liberan al medio extracelular, los EPS producidos a partir de cultivos de 48 hs en medio mínimo Y por las s distintas cepas se analizaron por cromatografía de exclusión molecular (Figura 32). Los perfiles del EPS producido por la cepa wt y las mutantes *plyB* y *prsD* presentaron predominantemente especies de alto peso molecular que denominamos HMW (*High Molecular Weight*) y corresponden al pico que eluye alrededor de los 2 MDa. Aunque se predicen polímeros de mucho más alto peso molecular en ambas mutantes defectivas en PlyB, es posible que la columna de filtración de geles no muestre estas diferencias debido a que estas moléculas eluyen muy cerca del volumen de exclusión. Las cepas A603 y pBBR*plyB*, capaces de producir mayores niveles de PlyB extracelular, presentaron uno o dos picos bien definidos; uno de alto peso molecular compartido con la cepa wt (2MDa) (HMW) y otro de bajo peso molecular que eluye alrededor de los 14 kDa.

Este último se denominará LMW (*Low Molecular Weight*) y contendría el producto final acumulado por la acción de PlyB sobre el EPS.

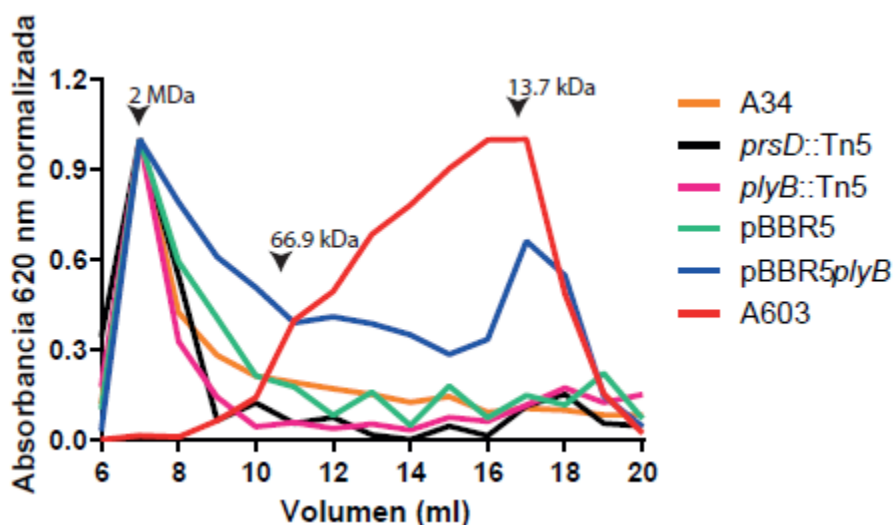


Figura 32: Análisis del EPS por cromatografía de exclusión molecular. Se muestra el perfil del EPS de la cepa A34 wt y derivadas observado como la cantidad de hexosas totales en cada fracción (Abs 620 nm según el método de Loewus) relativizada al valor máximo obtenido del perfil en función del volumen de elución. Las flechas indican los marcadores de peso molecular utilizados.

En base a estos resultados, los cuales muestran que el EPS de la cepa pBBR5*plyB* presenta acumulación de una fracción LMW, la cual correspondería al EPS producto del máximo clivaje, se buscó determinar la composición monomérica de las especies de EPS presentes en las fracciones HMW y LMW. Esto permitiría conocer si la fracción LMW se trata de una unidad repetitiva o es producto del clivaje del *backbone* del EPS. Para ello, se efectuó la hidrólisis ácida y derivatización de ambas fracciones y sus productos fueron analizados por cromatografía gaseosa. Los resultados muestran, en ambas fracciones, la presencia de 2 picos definidos que eluyen entre los 6 y 8 minutos, y un tercer pico que eluye entre los 17 y 18 minutos (Figura 33). La identificación de los tres picos indicó que, en orden de elución, los monómeros que componen la fracción LMW y HMW son galactosa, glucosa y ácido glucurónico respectivamente. Analizando la relación entre estos monómeros, se observa que la proporción entre glucosa y galactosa es 5:1 en ambas fracciones. Este resultado sugiere que la fracción LMW tendría una estructura compatible con la subunidad repetida en tándem que compone el EPS.

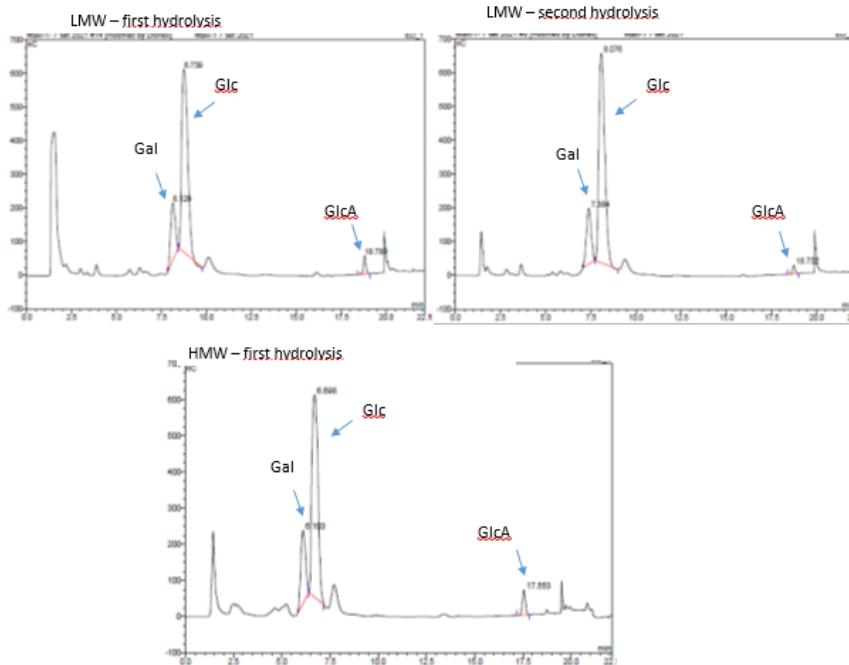


Figura 33: Identificación de la composición monomérica de las especies de EPS presentes en las fracciones purificadas por peso molecular del EPS de A34 *pBBR5plyB*. Arriba: Corridos de cromatografía gaseosa correspondiente al pico LMW. Las mismas corresponden a las 2 hidrólisis ácidas que se realizaron en tándem. Abajo: Cromatografía gaseosa del pico HMW correspondiente a la hidrólisis ácida de esta fracción.

La similitud en la composición de las fracciones LMW y HMW sugeriría que el pico LMW se trata de la unidad repetitiva del EPS y que la glicanasa PlyB cliva la unión  $\beta$  1,4 que las une. Para confirmar esta hipótesis, se analizó la fracción LMW del EPS de la cepa *pBBR5plyB* por espectrometría de masa. Resultados preliminares indican la presencia de galactosa piruvilada y estructuras que se corresponden con la cadena ramificada del EPS. En conjunto, estos resultados indican que la proteína PlyB es una glicanasa  $\beta$  - 1,4 que cliva el EPS únicamente en los sitios de unión de las distintas unidades repetidas en tándem que lo componen. No obstante, los ensayos de espectrometría de masa se realizarán nuevamente para poder confirmar, además, la presencia de otros residuos modificados como el ácido glucurónico presente en la cadena principal del EPS.

### PlyB es secretada de manera polar al medio extracelular y no es retenida en la superficie de la bacteria

Se ha propuesto que las hebras de polisacárido naciente emergen a través de un polo de la bacteria (Sherwood et al. 1989). Por otro lado, RapA2 y RapD son secretadas al medio extracelular a través de un polo de la bacteria (Vozza et al. 2016; Tarsitano et al. 2022) y las glicanasas Rap (PlyA y PlyB) presentan actividad únicamente cuando se encuentran en contacto con la superficie bacteriana en un contexto capaz de producir el EPS/CPS (Zorreguieta et al. 2000). Por lo tanto, se propone que la secreción de las proteínas Rap sucede en un polo de la bacteria para maximizar la efectividad de contacto con el EPS. Para corroborar esta hipótesis, se estudió la localización extracelular de la glicanasa PlyB. Utilizando un antisero anti PlyB generado previamente en conejo (Vozza et al. 2016), se analizó por inmunofluorescencia de las células provenientes de un cultivo planctónico el

destino extracelular de PlyB (Figura 34). De manera similar a lo observado para RapD (Tarsitano et al. 2022), PlyB no parece quedar mayormente retenida sobre la superficie celular por interacción con el CPS, sino que una porción considerable se liberaría al medio extracelular. Estos resultados se encuentran en línea con la observación de que la actividad glicanasa de PlyB es difusible al medio extracelular (Zorreguieta et al. 2000). Sin embargo, fue posible observar una señal correspondiente a PlyB sobre los polos de la bacteria, siendo significativamente más frecuente este tipo de señal en la cepa de sobreexpresión de PlyB (Figura 34 *derecha*), sugiriendo que PlyB presenta una localización polar transitoria obtenida durante la secreción de la proteína al medio extracelular a través del sistema de secreción PrsDE. Llamativamente, el número de eventos polares se encuentra en valores similares a los obtenidos para RapD (Tarsitano et al. 2022 – Esta tesis). No obstante, los mismos son ligeramente mayores para el caso de PlyB; lo cual puede deberse a que la abundancia de esta proteína con respecto a RapD en el medio extracelular es mayor. Como se sugirió para RapD (y para RapA previamente), es posible que la propia secreción de la proteína al medio extracelular a través del sistema de secreción PrsDE ocurra de manera polar.

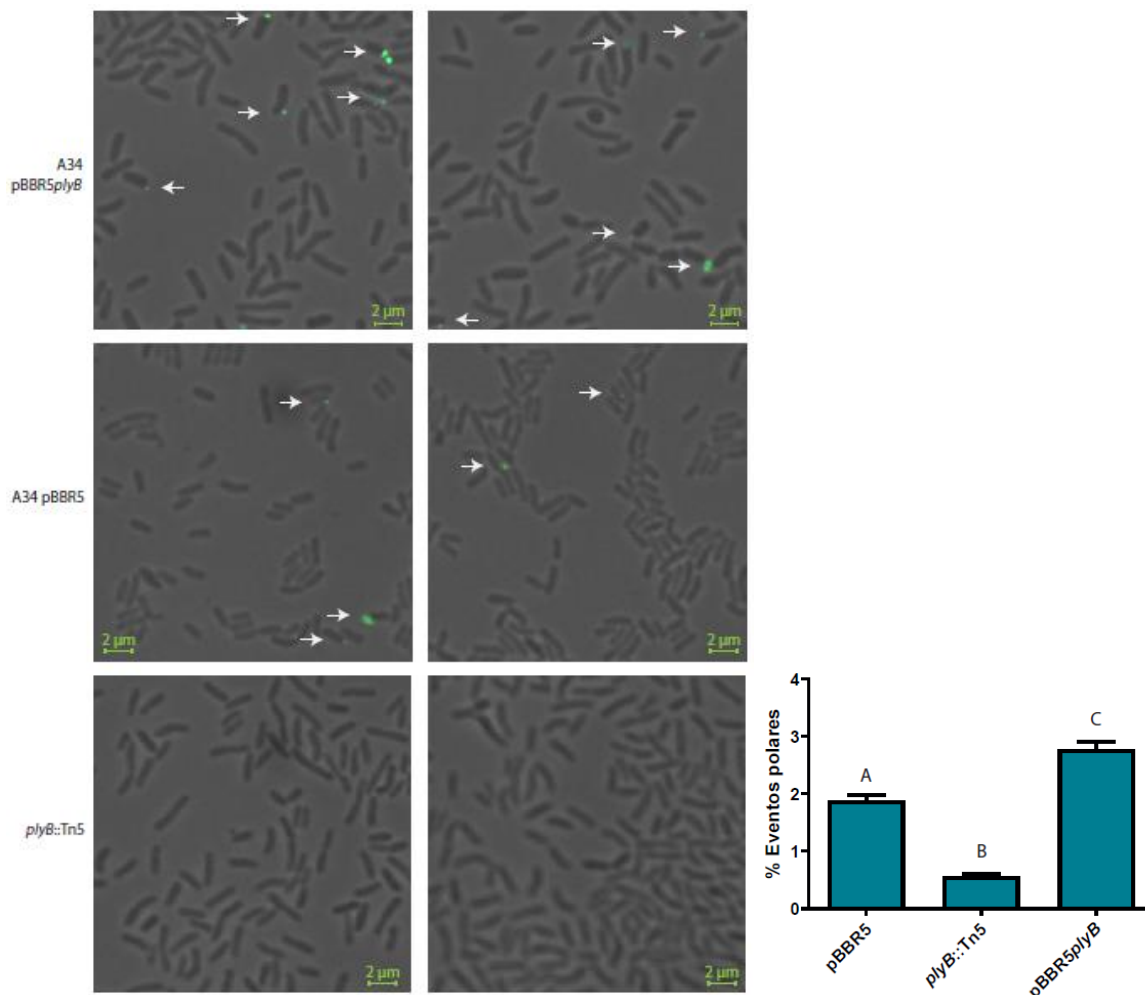


Figura 34: Detección de PlyB por inmunofluorescencia en células enteras observadas mediante un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss utilizando un objetivo 100X con aceite de inmersión (aumento 1000X)

revelado con un anticuerpo primario anti-PlyB de conejo y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a Alexa488. Izquierda: Se muestran campos representativos de las cepas utilizadas. Las barras de escala representan  $2\ \mu\text{m}$  y las flechas blancas señalan los eventos polares. Derecha: El gráfico de barras muestra el promedio de eventos polares obtenido para 6 campos representativos de dos réplicas biológicas ( $n = 7000$  bacterias por réplica). Los asteriscos indican diferencias significativas con un  $p < 0.001$  y un nivel de significación del 5% analizados por ANOVA de un factor. Las diferencias entre medias se analizaron con el test de Tukey.



## Discusión

Las primeras proteínas sustrato del sistema de secreción tipo I PrsDE de *Rhizobium leguminosarum* caracterizadas fueron la proteína formadora de canales de calcio NodO y las glicanasas PlyA y PlyB (Economou et al. 1990; Sutton et al. 1994; Finnie et al. 1997 y 1998). La definición de la familia de proteínas Rap y la incorporación de esta nomenclatura como tal fue a partir de los estudios efectuados por Ausmees y colaboradores en los que identifican el dominio Ra (*Rhizobium adhering*) presente en la proteína RapA1, RapB y RapC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Ausmees et al. 2001). Estudios posteriores permitieron establecer mediante técnicas *in silico* que este dominio Ra tiene similitud con el denominado CHDL (*cadherin-like*) que se encuentra ampliamente distribuido en proteínas de bacterias y arqueas, confiere la capacidad de unión a carbohidratos y presenta homología estructural con dominios presentes en cadherinas eucariotas (Cao et al. 2005; Abdian et al. 2013). El dominio Ra/CHDL se encuentra en proteínas de distintas especies y biovars de *Rhizobium* como *R. etli* y *R. phaseoli* entre otros, pero está ausente en rizobios emparentados como *Bradyrhizobium* o *Ensifer* (Cao et al. 2005; Abdian et al. 2013, Tarsitano et al. 2022).

Estudios posteriores permitieron identificar numerosas proteínas sustratos del sistema PrsDE, incluyendo a PlyA, PlyB, RapA1, RapA2, RapC y NodO, entre otras, y postular a las glicanasas PlyA y PlyB como responsables del mantenimiento de la arquitectura del biofilm de *Rlv* (Russo et al. 2006). Krehenbrink y colaboradores identificaron mediante técnicas *in silico* nuevas proteínas extracelulares de secreción PrsDE dependiente, aumentando el grupo posible de sustratos a catorce proteínas (2008). Esto permitió catalogar a PrsDE como un SSTI atípico que secreta un gran número de sustratos cuyas funciones estarían involucradas, al menos, en el procesamiento del polisacárido extracelular y por lo tanto afectando la capacidad de formación del biofilm y de nodulación en *Rhizobium leguminosarum* (Krehenbrink y Downie, 2008). La caracterización bioquímica de RapA2 (parálogo de RapA1) se llevó a cabo por Abdian y colaboradores donde demostraron que el dominio Ra es capaz de la unión a calcio y permite el plegamiento correcto de la proteína. Además, observaron que las lectinas RapA son específicas del EPS de *Rlv* y están involucradas en el procesamiento de la matriz del biofilm mediante su interacción con el polisacárido ácido secretado (CPS y EPS) (Abdian et al. 2013, Vozza et al. 2016).

En esta tesis se demostró que la proteína RapD (Q1MFT2) es una lectina capaz de interactuar con el EPS y de unirse al calcio presente en el medio extracelular, una vez que es co-secretada con otras proteínas Rap mediante el SSTI PrsDE de la cepa 3841 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Se observó que la secreción de la proteína RapD es mayor en cultivos en medio mínimo Y adicionado con manitol con respecto a los realizados en medio rico TY. Esta observación es llamativa ya que grandes cantidades de EPS se producen en condiciones nutricionales mínimas como las de los cultivos en medio Y – manitol, que además es propicio para el desarrollo de biofilms estructurados en (Russo et al. 2006; Williams 2008, Vozza et al. 2016). En línea con esta observación, un análisis transcriptómico previo demostró que, en condiciones de crecimiento estáticas, el gen *rapD* (llamado *rapB2*) de *Rhizobium etli* CFN42 incrementa sus niveles de expresión cuando se los compara con los niveles de expresión de la fracción planctónica (Reyes-Perez et al. 2016). Respectivamente, se mostró que en *Rlv* 3841, RapD es secretada en biofilms desarrollados en medio Y – manitol. Además, los resultados presentados en esta tesis corroboran mediante inmunofluorescencia que RapD se libera completamente al medio extracelular, lo que sugiere que su función es diferente a la de las proteínas RapA1 y RapA2

Como se describió en la introducción, tras su secreción, una parte de RapA, la lectina de EPS/CPS, es retenida en la superficie bacteriana (Vozza et al. 2016). Los análisis por inmunofluorescencia mostraron que, en condiciones de expresión endógena, numerosas células de *Rlv* muestran una señal de RapA en un polo de la bacteria, pero varias de ellas muestran una señal reminiscente de la localización de la cápsula. Más aún, en condiciones de sobreexpresión de *rapA1*, la mayoría de las bacterias muestran este patrón (Vozza et al. 2016). Este comportamiento fue explicado por la actividad de lectina de las proteínas RapA para con el CPS (Vozza et al. 2016). Por otro lado, otras dos proteínas Rap, las glicanasas PlyA y PlyB, clivan el EPS y CMC únicamente cuando están en contacto con algún componente polisacárido de la superficie bacteriana (Zorreguieta et al. 2000). Cabe resaltar que, aunque la proteína PlyA pareciera ser retenida en la superficie celular, PlyB difunde libremente al medio extracelular, aunque solo se encuentre activa en la superficie bacteriana en un contexto de bacteria productora de EPS (Zorreguieta et al. 2000). Entonces, queda claro que algunas funciones de las Raps se encuentran asociadas a la interacción con la superficie celular, más posiblemente con el CPS, como se menciona con RapA2 (Vozza et al. 2016). Una posibilidad, es que el rol de la proteína RapD se relacione con la interacción con alguna conformación espacial o estructura adoptada por el EPS (más que la del CPS), modificando de alguna forma alguna característica de la matriz extracelular dado que la misma no es retenida sobre la superficie bacteriana. Otra hipótesis, es que las acciones de las proteínas Rap se lleven a cabo secuencialmente; es decir, inicialmente RapA permanecería asociada a la superficie bacteriana por interacción con las cadenas del EPS y el CPS y cumpliendo su rol de lectina calcio dependiente afectando la conformación espacial de los polisacáridos. Mientras tanto, o posteriormente, RapD actuaría como lectina calcio-dependiente sobre los polisacáridos, preferentemente sobre el EPS, y por lo tanto en un lugar más “alejado” de la superficie. Interesantemente, las inmunofluorescencias de bacterias provenientes de cultivos planctónicos utilizando anticuerpos anti-RapD mostraron un pequeño número de señales correspondientes a esta proteína en un polo de la bacteria, sugiriendo una localización polar transitoria de RapD de forma similar a lo observado en RapA2. Llamativamente, se observó lo mismo en inmunofluorescencias de PlyB. Aproximadamente un 2% de las células presentaron este patrón de localización polar transitoria en contraste con un 1% para la señal observada de RapD. Este comportamiento puede ser explicado por la abundancia relativa de estas proteínas en el medio extracelular (Tarsitano et al. 2022). En línea con resultados anteriores, no se encontraron evidencias que indiquen que PlyB quede retenido en la superficie celular. Esto es consistente con los ensayos de actividad glicanasa donde se observó que PlyB presenta actividad glicanasa difusible (Zorreguieta et al. 2000). Fue propuesto que las cadenas de EPS/CPS emergen inicialmente de un polo de la bacteria (Sherwood 1984). Es tentador hipotetizar que todas las proteínas Rap son secretadas a través del mismo polo bacteriano, como un “polo secretor”, a partir del cual el CPS/EPS es inicialmente sintetizado, permitiendo de esa forma una interacción más eficiente entre las proteínas de la familia Rap secretadas por el sistema PrsDE y el polisacárido ácido en sus formas CPS o EPS.

Los estudios realizados por dicroísmo circular (DC) y por espectroscopía de fluorescencia indicaron que RapD presenta una estructura  $\beta$  dependiente de calcio, que une específicamente el EPS de *Rlv*. Los modelos actuales de secreción de proteínas RTX mediante sistemas de secreción tipo I indican que estas proteínas se translocan a través del sistema de secreción tripartito en un estado desplegado, guiados por una señal de secreción no clivable en el extremo C-terminal (Bumba et al. 2016). Las estructuras de cilindro- $\beta$  paralelos unirían calcio conforme emergen de la superficie

celular y dirigirían la translocación y la adquisición de la conformación (Motlova et al. 2020). La consolidación de la estructura secundaria beta de RapD fue observada en el rango milimolar, consistente con la concentración de calcio en el medio extracelular. En RapA2, la adquisición de la estructura secundaria beta ocurre en rangos de concentración de calcio similares (Abdian et al. 2013). Conforme con el modelo propuesto de secreción de RapA2 (Abdian et al. 2013), en el citoplasma, donde la concentración de calcio es 0.1 – 2  $\mu$ M (Watkins et al. 1995), RapD presentaría una forma de glóbulo fundido que facilitaría su translocación directa desde el citoplasma al medio extracelular por el SSTI. Es de esperarse que RapD adquiriera la estructura  $\beta$  en el medio extracelular para poder tener una interacción con el EPS.

Estudios previos efectuados sobre RapA2 corroboraron que está compuesta por dos dominios Ra/CHDL y que es una proteína de estructura flexible dependiente de calcio, como se evidencio mediante la adquisición de estructura secundaria y posiblemente, terciaria en presencia de aproximadamente 0.2 mM de calcio (Abdian et al. 2013). De manera análoga, RapD, que presenta un dominio Ra/CHDL similar al de RapA2 localizado en el extremo amino terminal de la proteína, exhibió cambios conformacionales en presencia de calcio a concentraciones similares. No obstante, los espectros de UV lejano de DC de RapD no son estrictamente similares a los de RapA2, ya que mientras en RapA2 mostraron la consolidación de una banda negativa en  $\sim$ 217 nm, no mostraron un incremento de la elipticidad dependiente de calcio en la región de 210 – 220 nm como los espectros de RapD (Abdian et al. 2013). Esto puede deberse al comportamiento diferencial de las regiones C-terminal de RapA2 y RapD. Otra peculiaridad fue que en el espectro de fluorescencia del único triptófano presente en la región N-terminal de Apo-RapD, se detectó un pico de emisión en los  $\sim$ 345 – 350 nm, indicativo de una exposición marginal de este aminoácido al solvente. Más aún, luego de la adición de calcio, el centro del pico presentó un corrimiento al rojo hacia los  $\sim$ 355 – 360 nm indicando aún más exposición de este aminoácido al solvente. Sin embargo, el incremento en la elipticidad y el corrimiento al rojo del espectro de fluorescencia observados en RapD ocurren a las mismas concentraciones de calcio indicando que ambos cambios son simultáneos y que el incremento de interacción con el solvente puede ser un evento local producto de la conformación y del establecimiento de la estructura secundaria en respuesta a calcio en RapD.

Los análisis de la multimerización de RapD por cromatografía de exclusión molecular indican que 1.25 mM de calcio induce la formación de oligómeros en la proteína, presumiblemente estableciendo homodímeros y trímeros. Como fue mencionado anteriormente, RapA2 no es capaz de formar oligómeros en presencia de calcio, excluyendo de las funciones de esta proteína, la capacidad observada en las cadherinas eucariotas de interactuar entre proteínas (Abdian et al. 2013). Por el contrario, RapD forma oligómeros en presencia de calcio lo cual indica una característica distintiva con respecto a RapA2. La hipótesis que surge es que el dominio C-terminal de RapD es responsable de la multimerización y, en consecuencia, del comportamiento observado en los ensayos de DC y espectroscopía de fluorescencia. No obstante, futuros ensayos evaluando la multimerización de RapD utilizando los dominios N terminal o C terminal por separado son necesarios para esclarecer los mecanismos de multimerización de esta proteína. Se han reportado muchos casos de proteínas extracelulares que cumplen una función en el desarrollo de la matriz del biofilm y que cumplen diversas funciones. La mayoría de los casos documentados, corresponden con proteínas que forman estructuras de alto peso molecular (o fibras amiloides) que se encuentran en directo contacto con la superficie bacteriana (Conrady et al. 2008; Taglialegna et al. 2016). Ha

habido reportes de proteínas multiméricas compuestas por monómeros de menor peso molecular que cumplen diversos roles en la matriz extracelular como dirigir la localización del EPS hacia regiones específicas del biofilm o mediar el contacto tripartito entre dos cadenas de EPS y la célula (Tielker et al. 2005; Giglio et al. 2013; Maestre-Reyna et al. 2013). De acuerdo con este segundo grupo de proteínas multiméricas extracelulares, RapD constituye uno de los pocos ejemplos de proteínas de bajo peso molecular asociadas a la matriz del biofilm con un rol activo en el desarrollo de la matriz extracelular a través del mantenimiento de los pesos moleculares apropiados del EPS. No obstante, contrario a lo mencionado, no hay evidencia que sugiera que RapD permanece adherida a la superficie celular en base a los ensayos realizados de inmunofluorescencia e inmunodetección de esta proteína en preparaciones de proteínas de superficie. Es posible que la formación de multímeros en RapD le provea un carácter de lectina multivalente de EPS el cual favorecería interacciones intercatenarias, es decir entre distintas cadenas de EPS, y en consecuencia alcanzando el desarrollo de una matriz más robusta y compacta durante la formación del biofilm. En base a lo expuesto, son necesarios nuevos estudios para determinar el dominio de RapD responsable de la multimerización y el rol de la oligomerización en la función de RapD.

Se observó que, además del cambio conformacional hacia una estructura  $\beta$  inducida por calcio, RapD modificó su plegamiento en presencia de EPS. Esta observación sugiere que RapD, y posiblemente otras Raps, adquieran una conformación espacial adecuada y funcional en presencia del calcio y EPS/CPS. En el caso de PlyB, este cambio podría permitir a la glicanasa difundir al medio extracelular y activarse solo en contacto con la superficie bacteriana posiblemente por interacción con el EPS/CPS (Zorreguieta et al. 2000). De esta forma, PlyB extracelular (unida previamente al calcio) podría experimentar cambios conformacionales adicionales cuando interactúa con una estructura del EPS lo que le permitiría, una vez realizado esto, ejercer su actividad glicanasa sobre las cadenas de EPS. Futuros ensayos con PlyB recombinante son necesarios para poder esclarecer los mecanismos a través de los cuales esta proteína pasa a su forma activa y cliva el polisacárido. Los análisis de interacción con el EPS por dicroísmo circular permitirán discernir si el factor necesario para su activación es un cambio en la estructura secundaria o si es necesario el contacto con otra proteína que se encuentre en el polisacárido. Por lo tanto, en nuestro modelo, las proteínas Rap serían secretadas al medio extracelular en un estado desplegado debido a la baja concentración de calcio intracelular. Conforme entran en contacto con el medio extracelular, las proteínas de esta familia unirían iones de calcio, adquiriendo un plegamiento que les permitiría interactuar con EPS/CPS, activarse o formar estructuras multiméricas, permitiendo la interacción con cadenas emergentes de EPS/CPS y/o cumplir su actividad enzimática permitiendo que la proteína sea completamente funcional durante el desarrollo del biofilm (Figura 35).

Los mecanismos mediante los cuales los polisacáridos interactúan con otras moléculas o estructuras son de diversa naturaleza, ya sea mediante cargas electrostáticas o mediante sitios de unión definidos en el polisacárido (Tielen et al. 2013; Reichhardt et al. 2018; Passos da Silva et al. 2019). Dentro de una misma especie, ambos tipos de mecanismos pueden coexistir, tal es el caso de las lectinas LecB y CdrA de *Pseudomonas aeruginosa* las cuales interactúan con el polisacárido Psl dirigiéndolo a diversos sectores de las estructuras tipo hongo características del biofilm de esta bacteria (Tielen et al. 2013; Reichhardt et al. 2018; Passos da Silva et al. 2019). En esta tesis se ha demostrado una unión específica de RapD al EPS. Esta unión fue inhibida parcialmente por el agregado de galactosa en el rango del milimolar, sugiriendo que la galactosa sería parte de la

estructura del EPS o un oligosacárido derivado que es reconocida por RapD. Interesantemente, fue demostrado previamente que la interacción de RapA2 con el EPS es bloqueada por ácido glucurónico, también en el rango del milimolar (Abdian et al. 2013). Cabe destacar que, en un contexto biológico, la afinidad de una lectina Rap por el EPS muy probablemente dependa de una combinación de varios azúcares o enlaces glicosídicos. Además, pese a que RapA2 y RapD unen el EPS, la estructura particular que reconocen estas proteínas en el polisacárido puede ser distinta. Siguiendo esta línea de pensamiento, los experimentos de competencia entre RapA2 y RapD en la unión del EPS sugieren que estas proteínas no parecerían compartir los mismos sitios de unión en el polisacárido. Llamativamente, en un contexto *rapA2* mutante, se encontró una mayor cantidad de RapD retenida en el EPS. Esto podría sugerir cierta redundancia en las funciones de las Rap(s), o que la ausencia de una de ellas desregule el procesamiento del EPS provocando la unión inespecífica de otras. Futuros experimentos van a ser necesarios para determinar los epítopes del EPS/CPS reconocidos por las Rap y el rol de los dominios Ra/CHDL en esta familia de proteínas.

Contrario a la mutante *rapA2*, la mutante *rapD* no presentó fenotipos evidentes relacionados a la adhesión a superficies o interacciones entre células bacterianas. La posibilidad existe que las cantidades profusas de EPS producidas por *R/v* enmascaren alteraciones estructurales o del tipo célula-célula dentro del biofilm de la mutante (Reichhardt et al. 2019). No obstante, la ausencia de RapD extracelular produjo cambios en el perfil de peso molecular de especies del EPS obtenidos por cromatografía de exclusión molecular mientras que la ausencia de RapA2 resultó en un efecto mucho más notorio, específicamente en la abundancia de especies de menor peso molecular. Estos cambios en el tamaño del EPS pueden deberse, en parte, a una actividad glicanasa incrementada en estos contextos genéticos sugiriendo una interacción en la regulación de la expresión/secreción de las proteínas Rap y el ensamblado de la matriz. Interesantemente, la ausencia de ambas RapA2 y RapD resultó en una distribución de las moléculas de EPS de menores tamaños comparados con las simples mutantes al tiempo que mostró los mismos niveles de actividad glicanasa. Una hipótesis es que el desarrollo de la matriz de *R/v* es un proceso de múltiples pasos llevado a cabo y coordinado por varios factores extracelulares incluidos RapA2, RapD y las glicanasas Ply, en el cual la ausencia de los dos primeros resulta en la desregulación del proceso dando como resultado una mayor proporción de moléculas de EPS de menor tamaño.

Los ensayos de espectrometría de masa del EPS filtrado por peso molecular han podido demostrar que la glicanasa PlyB, glicanasa de mayor actividad y abundancia en el medio extracelular (Tarsitano et al. 2022), es una hidrolasa del tipo  $\beta$  1,4 que clivaría las uniones repetidas en tándem del polisacárido limitando la longitud de las cadenas. Por otro lado, mutantes en la secreción de esta proteína presentan actividad glicanasa sobre CMC (Zorreguieta et al. 2000; esta tesis) indicando que las 2 glicanasas remanentes (PlyA y PlyC) serían capaces de clivar polisacáridos en uniones  $\beta$  1-4 también. Cabe destacar que el EPS de *R/v* presenta varias uniones de este tipo. Sumado a esto, los análisis realizados con los sitios que reconocen RapA2 y RapD en el polisacárido podrían indicar que, de manera análoga, las glicanasas PlyA, PlyB y PlyC reconocen estructuras diferentes en el EPS. No obstante, ensayos futuros con los polisacáridos en distintos contextos mutantes y sobreexpresantes, así como trabajos con proteínas recombinantes son necesarios para esclarecer el destino extracelular y función de las diversas Raps.

A nuestro entender, la secreción de varias proteínas relacionadas estructural y funcionalmente con actividad lectina para con el polisacárido producido por la misma bacteria no ha sido documentado.

Hay escasos reportes de proteínas extracelulares interactuando, alterando o dirigiendo el desarrollo de la matriz en otras bacterias (Reichhardt et al. 2019; Domenech et al. 2020). En *Vibrio cholerae*, las proteínas de la matriz siguen una distribución espacial estricta que le permite, a su vez, interactuar con el polisacárido (VPS) (Berk et al. 2012). De acuerdo con hallazgos previos (Abdian et al. 2013; Vozza et al. 2016), se demostró que a pesar de presentar fuertes similitudes entre los dominios Ra de las lectinas, las proteínas Rap reconocen distintas estructuras en el EPS y cumplen diferentes roles durante la formación del biofilm en *R/v*. Se propone, en esta tesis, que el desarrollo de la matriz en *R/v* es un proceso de múltiples pasos regulados no solo temporal sino espacialmente tal cual fue observado por los diversos nichos que ocupan las distintas proteínas Rap (Figura 35).

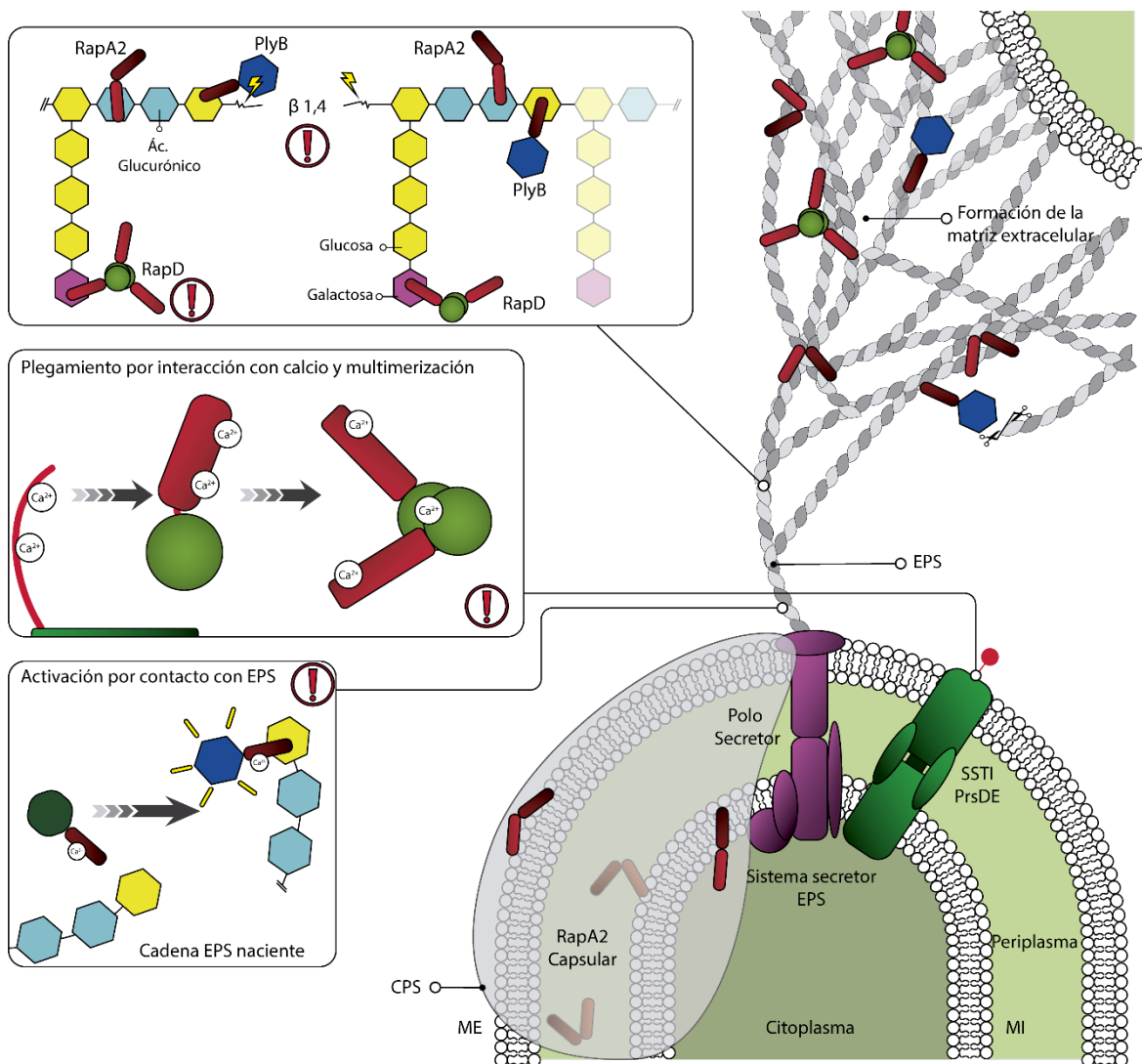


Figura 35: Modelo de secreción y acción de las proteínas Rap(s) en biofilm. Se muestran esquematizadas las diversas estructuras involucradas en la síntesis de las proteínas Rap y el aspecto de dos rizobios cuando crecen en un biofilm unidos por el polisacárido formando la estructura de malla característica. Los signos de exclamación rojos indican los eventos descritos por primera vez en esta tesis. Abajo izquierda: Se detallan las vías mediante las cuales las proteínas Rap, habiendo unido calcio, son capaces de interactuar con las

cadena nacientes de EPS localizadas en el polo secretor de la bacteria. Una vez interactuado con el EPS, la proteína adquiere su conformación final la cual le permite activar su función enzimática (PlyB) o ayudar en la formación de multímeros (RapD). Medio: Se esquematiza el modelo de secreción a través del SSTI PrsDE. La interacción con el calcio extracelular sucedería conforme la proteína es translocada. Esto le permitiría a la proteína adquirir su conformación nativa y, para el caso particular de RapD, formar multímeros previo a la interacción con el EPS. Arriba izquierda: Se muestra la estructura del EPS tras su secreción. En el mismo se detallan los sitios de unión de las proteínas RapD, la cual une galactosa, RapA2, que interactúa con el EPS a través del ácido glucurónico y PlyB, que presumiblemente interactúa con los residuos de glucosa que forman los enlaces glicosídicos  $\beta$  1,4 que unen la unidad repetida en tándem. Se detalla también, los sitios donde la proteína PlyB ejerce su actividad catalítica en contacto con el EPS dando lugar a cadenas de EPS más cortas.

# Información Suplementaria

**Información Suplementaria 1:** Secretoma completo *Rlv* 3841 según los análisis por LC-MS/MS. Las proteínas se encuentran ordenadas en orden decreciente en cuanto al score obtenido en el software ProteomeDiscoverer utilizando *Rlv* 3841 como la base de datos (indicativo de la abundancia de la proteína en el secretoma y de la cantidad de péptidos tripticos encontrados).

Código Uniprot	Descripción
Q1MEW2	Polysaccharidase secreted via PrsDE Type I exporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=plyB PE=4 SV=1 - [Q1MEW2_RHIL3]
Q1ML69	Putative calcium binding RTX Zn-metalloprotease OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0790 PE=4 SV=1 - [Q1ML69_RHIL3]
Q1M8U8	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90140 PE=4 SV=1 - [Q1M8U8_RHIL3]
Q1MF23	Putative calcium-binding cadherin-like RTX protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2961 PE=4 SV=1 - [Q1MF23_RHIL3]
Q1M7X8	NodO protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=nodO PE=4 SV=1 - [Q1M7X8_RHIL3]
Q1M7J7	Putative calcium-binding cadherin-like RTX protein Exported via PrsDE Type I secretion OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL100309 PE=4 SV=1 - [Q1M7J7_RHIL3]
Q1M755	Calcium-binding lectin RapA2 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rapA2 PE=1 SV=1 - [RAPA2_RHIL3]
Q1MD30	Acidic exopolysaccharide polysaccharidase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=plyA PE=4 SV=1 - [Q1MD30_RHIL3]
Q1MGL7	Putative calcium binding RTX protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2412 PE=4 SV=1 - [Q1MGL7_RHIL3]
Q1MFT2	Putative rhizobium adhering-like protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2702 PE=4 SV=1 - [Q1MFT2_RHIL3]
Q1MEW3	Putative polysaccharidase PlyA-like OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3023 PE=4 SV=1 - [Q1MEW3_RHIL3]
Q1MHK9	Trigger factor OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=tig PE=3 SV=1 - [TIG_RHIL3]
Q1MAZ2	ATP synthase subunit beta OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=atpD PE=3 SV=1 - [ATPB_RHIL3]
Q1MAW3	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=sucD PE=3 SV=1 - [Q1MAW3_RHIL3]
Q1MNG2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pckA PE=3 SV=1 - [PCKA_RHIL3]
Q1MID8	50S ribosomal protein L2 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplB PE=3 SV=1 - [RL2_RHIL3]
Q1MG11	30S ribosomal protein S4 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsD PE=3 SV=1 - [RS4_RHIL3]
O33525	Malate dehydrogenase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=mdh PE=3 SV=1 - [MDH_RHIL3]
Q1MAK2	50S ribosomal protein L19 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplS PE=3 SV=1 - [RL19_RHIL3]
Q1MIF0	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplL PE=3 SV=1 - [RL7_RHIL3]
Q1MCY4	Putative glutamate synthase like small subunit protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3707 PE=4 SV=1 - [Q1MCY4_RHIL3]
Q1MMC2	Putative S-adenosylmethionine synthetase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=metK PE=3 SV=1 - [Q1MMC2_RHIL3]
Q1M4Y0	Putative short-chain dehydrogenase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120125 PE=4 SV=1 - [Q1M4Y0_RHIL3]
Q1MH33	Putative pyruvate dehydrogenase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pdhB PE=4 SV=1 - [Q1MH33_RHIL3]
Q1MMM6	Putative aminopeptidase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0286 PE=4 SV=1 - [Q1MMM6_RHIL3]
Q1MIE9	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpoB PE=3 SV=1 - [RPOB_RHIL3]



Q1MIE1	50S ribosomal protein L3 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplC PE=3 SV=1 - [RL3_RHIL3]
Q1MG04	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=icd PE=3 SV=1 - [Q1MG04_RHIL3]
Q1MBY2	Pyruvate kinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ttuE PE=3 SV=1 - [Q1MBY2_RHIL3]
Q1MIE0	50S ribosomal protein L4 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplD PE=3 SV=1 - [RL4_RHIL3]
Q1MER4	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3073 PE=4 SV=1 - [Q1MER4_RHIL3]
Q1MCD0	Putative Rhizobium adhering protein (Fragment) OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rapB PE=4 SV=1 - [Q1MCD0_RHIL3]
Q1MJF1	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1413 PE=4 SV=1 - [Q1MJF1_RHIL3]
Q1MKB9	Putative transmembrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1090 PE=4 SV=1 - [Q1MKB9_RHIL3]
Q1M6E3	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110243 PE=4 SV=1 - [Q1M6E3_RHIL3]
Q1MJ08	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=fabD PE=3 SV=1 - [Q1MJ08_RHIL3]
Q1MN44	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pnp PE=3 SV=1 - [PNP_RHIL3]
Q1MIY5	Nucleoside diphosphate kinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ndk PE=3 SV=1 - [NDK_RHIL3]
Q1MH51	Ribosome-recycling factor OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=frr PE=3 SV=1 - [RRF_RHIL3]
Q1MMI3	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0329 PE=4 SV=1 - [Q1MMI3_RHIL3]
Q1MIB9	30S ribosomal protein S13 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsM PE=3 SV=1 - [RS13_RHIL3]
Q1MDI8	Putative transmembrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3501 PE=4 SV=1 - [Q1MDI8_RHIL3]
Q1MGI5	UPF0317 protein RL2444 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2444 PE=3 SV=1 - [Y2444_RHIL3]
Q1MID0	50S ribosomal protein L24 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplX PE=3 SV=1 - [RL24_RHIL3]
Q1MIE8	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpoC PE=3 SV=1 - [RPOC_RHIL3]
Q1MIC8	30S ribosomal protein S14 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsN PE=3 SV=1 - [RS14_RHIL3]
Q1MF88	Putative transmembrane transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2896 PE=3 SV=1 - [Q1MF88_RHIL3]
Q1MBJ1	Transaldolase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=talB PE=3 SV=1 - [Q1MBJ1_RHIL3]
Q1M399	Histidine kinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120718 PE=4 SV=1 - [Q1M399_RHIL3]
Q1MC39	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4003 PE=4 SV=1 - [Q1MC39_RHIL3]
Q1MN58	30S ribosomal protein S1 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsA PE=3 SV=1 - [Q1MN58_RHIL3]
Q1MKW6	tRNA-specific adenosine deaminase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=tadA PE=3 SV=1 - [Q1MKW6_RHIL3]
Q1MI53	Putative 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1863 PE=3 SV=1 - [Q1MI53_RHIL3]
Q1MH54	30S ribosomal protein S2 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsB PE=3 SV=1 - [RS2_RHIL3]
Q1MIU5	Serine hydroxymethyltransferase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=glyA PE=3 SV=1 - [GLYA_RHIL3]
Q1MID5	30S ribosomal protein S3 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsC PE=3 SV=1 - [RS3_RHIL3]
Q1MIZ8	LPS-assembly protein LptD OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=lptD PE=3 SV=1 - [Q1MIZ8_RHIL3]
Q1MDL8	50S ribosomal protein L25 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplY PE=3 SV=1 - [Q1MDL8_RHIL3]

Q1MJ55	Signal peptidase I OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=sipS PE=3 SV=1 - [Q1MJ55_RHIL3]
Q1MLN0	Putative component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0629 PE=4 SV=1 - [Q1MLN0_RHIL3]
Q1M459	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=braC2 PE=4 SV=1 - [Q1M459_RHIL3]
Q1MDP6	Aminotransferase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=aatA PE=3 SV=1 - [Q1MDP6_RHIL3]
Q1M5B6	Putative pantothenate biosynthesis protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110619 PE=4 SV=1 - [Q1M5B6_RHIL3]
Q1MDX7	Putative mannose-6-phosphate isomerase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3363 PE=4 SV=1 - [Q1MDX7_RHIL3]
Q1MNC6	Adenosylhomocysteinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ahcY PE=3 SV=1 - [SAHH_RHIL3]
Q1M9M2	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL70171 PE=4 SV=1 - [Q1M9M2_RHIL3]
Q1M498	Catalase-peroxidase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=katG PE=3 SV=1 - [KATG_RHIL3]
Q1M495	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120365 PE=4 SV=1 - [Q1M495_RHIL3]
Q1MN55	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0109 PE=4 SV=1 - [Q1MN55_RHIL3]
Q1MID9	50S ribosomal protein L23 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpIW PE=3 SV=1 - [RL23_RHIL3]
Q1MM45	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0464 PE=4 SV=1 - [Q1MM45_RHIL3]
Q1MIC7	30S ribosomal protein S8 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsH PE=3 SV=1 - [RS8_RHIL3]
Q1MDP0	Putative cold shock protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=cspA4 PE=4 SV=1 - [Q1MDP0_RHIL3]
Q1MIP2	50S ribosomal protein L13 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpIM PE=3 SV=1 - [RL13_RHIL3]
Q1MID2	30S ribosomal protein S17 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpsQ PE=3 SV=1 - [RS17_RHIL3]
Q1MC30	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4012 PE=3 SV=1 - [Q1MC30_RHIL3]
Q1MIB6	50S ribosomal protein L17 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpIQ PE=3 SV=1 - [RL17_RHIL3]
Q1MIF5	Transcription termination/antitermination protein NusG OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=nusG PE=3 SV=1 - [Q1MIF5_RHIL3]
Q1M7T9	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL100213 PE=4 SV=1 - [Q1M7T9_RHIL3]
Q1MAP8	Inorganic pyrophosphatase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ppa PE=3 SV=1 - [Q1MAP8_RHIL3]
Q1M9B5	Putative methylase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL80104 PE=4 SV=1 - [Q1M9B5_RHIL3]
Q1MIC3	50S ribosomal protein L30 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpmD PE=3 SV=1 - [RL30_RHIL3]
Q1MAW6	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=citM PE=3 SV=1 - [Q1MAW6_RHIL3]
Q1MMC9	Protein GrpE OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=grpE PE=3 SV=1 - [GRPE_RHIL3]
Q1MLJ3	Putative exported lipase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0666 PE=4 SV=1 - [Q1MLJ3_RHIL3]
Q1MDL0	Ribosome-binding ATPase YchF OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ychF PE=3 SV=1 - [Q1MDL0_RHIL3]
Q1MAL8	Aconitate hydratase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=acnA PE=3 SV=1 - [Q1MAL8_RHIL3]
Q1MDV7	Putative outer membrane protein related to bp26 antigen of Brucella OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3382 PE=4 SV=1 - [Q1MDV7_RHIL3]

**Información Suplementaria 2:** Secretoma completo de *Rlv 3841 prsD::Tn5* según los análisis por LC-MS/MS. Las proteínas se encuentran ordenadas en orden decreciente en cuanto al score obtenido en el software ProteomeDiscoverer utilizando *Rlv 3841* como la base de datos (indicativo de la abundancia de la proteína en el secretoma y de la cantidad de péptidos trípticos encontrados).

Código Uniprot	Descripción
Q1MG94	Putative penicillin-binding protein/D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2541 PE=3 SV=1 - [Q1MG94_RHIL3]
Q1MGU0	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2338 PE=4 SV=1 - [Q1MGU0_RHIL3]
Q1MMV0	Putative pilus assembly protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=cpaB PE=4 SV=1 - [Q1MMV0_RHIL3]
Q1M8I2	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90249 PE=4 SV=1 - [Q1M8I2_RHIL3]
Q1MHP2	Hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2028 PE=4 SV=1 - [Q1MHP2_RHIL3]
Q1MA65	Putative carboxy-terminal processing protease OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ctpA PE=3 SV=1 - [Q1MA65_RHIL3]
Q1MC73	Putative OmpA family peptidoglycan-associated lipoprotein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3968 PE=3 SV=1 - [Q1MC73_RHIL3]
Q1MCV7	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3733 PE=4 SV=1 - [Q1MCV7_RHIL3]
Q1MGP0	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2389 PE=4 SV=1 - [Q1MGP0_RHIL3]
Q1M4C7	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120333 PE=4 SV=1 - [Q1M4C7_RHIL3]
Q1M8H2	Putative periplasmic substrate binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90270 PE=4 SV=1 - [Q1M8H2_RHIL3]
Q1M3L3	Putative L-lactate dehydrogenase family protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120601 PE=3 SV=1 - [Q1M3L3_RHIL3]
Q1M8J9	60 kDa chaperonin OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=groL PE=3 SV=1 - [Q1M8J9_RHIL3]
Q1MBZ6	Conserved hypothetical exported TPR repeat protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4046 PE=4 SV=1 - [Q1MBZ6_RHIL3]
Q1MA72	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4685 PE=4 SV=1 - [Q1MA72_RHIL3]
Q1MEM6	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3113 PE=4 SV=1 - [Q1MEM6_RHIL3]
Q1M9I2	Putative branched-chain amino acid ABC transporter binding component OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=livJ PE=4 SV=1 - [Q1M9I2_RHIL3]
Q1MAW7	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4432 PE=4 SV=1 - [Q1MAW7_RHIL3]
Q1MN56	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=aroA PE=3 SV=1 - [ARO_A_RHIL3]
Q1M5R0	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110476 PE=4 SV=1 - [Q1M5R0_RHIL3]
Q1M4K6	Putative substrate binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120253 PE=4 SV=1 - [Q1M4K6_RHIL3]
Q1M724	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110013 PE=4 SV=1 - [Q1M724_RHIL3]
Q1MFE0	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2844 PE=4 SV=1 - [Q1MFE0_RHIL3]
Q1MFU8	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=aroG PE=3 SV=1 - [Q1MFU8_RHIL3]
Q1M3D1	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120685 PE=4 SV=1 - [Q1M3D1_RHIL3]
Q1MAB2	Putative transmembrane beta (1-->2) glucan biosynthesis protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ndvB PE=4 SV=1 - [Q1MAB2_RHIL3]
Q1MN33	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0131 PE=4 SV=1 - [Q1MN33_RHIL3]
Q1MBB8	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4276 PE=4 SV=1 - [Q1MBB8_RHIL3]

Q1MAI0	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4575 PE=4 SV=1 - [Q1MAI0_RHIL3]
Q1MEZ5	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2991 PE=4 SV=1 - [Q1MEZ5_RHIL3]
Q1MKW7	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0890 PE=4 SV=1 - [Q1MKW7_RHIL3]
Q1MBK4	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4190 PE=4 SV=1 - [Q1MBK4_RHIL3]
Q1MJR8	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1296 PE=4 SV=1 - [Q1MJR8_RHIL3]
Q1M723	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=msrA PE=3 SV=1 - [Q1M723_RHIL3]
Q1MKE5	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1063 PE=4 SV=1 - [Q1MKE5_RHIL3]
Q1M6C1	Putative succinoglycan biosynthesis protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110266 PE=4 SV=1 - [Q1M6C1_RHIL3]
Q1M4I2	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120278 PE=4 SV=1 - [Q1M4I2_RHIL3]
Q1M536	Putative flagella associated protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120067 PE=4 SV=1 - [Q1M536_RHIL3]
Q1MFP5	Putative epoxide hydrolase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2740 PE=4 SV=1 - [Q1MFP5_RHIL3]
Q1M8Y3	Putative substrate-binding ABC transporter protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90258 PE=4 SV=1 - [Q1M8Y3_RHIL3]
Q1MAX2	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4427 PE=4 SV=1 - [Q1MAX2_RHIL3]
Q1MHH6	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2095 PE=4 SV=1 - [Q1MHH6_RHIL3]
Q1MND2	Thioredoxin OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0025 PE=3 SV=1 - [Q1MND2_RHIL3]
Q1MK58	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1154 PE=4 SV=1 - [Q1MK58_RHIL3]
Q1MLJ6	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0663 PE=4 SV=1 - [Q1MLJ6_RHIL3]
Q1M7B0	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL100396 PE=4 SV=1 - [Q1M7B0_RHIL3]
Q1MKY9	Putative exported ErfK/YbiS/YhnG protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0869 PE=4 SV=1 - [Q1MKY9_RHIL3]
Q1M8P0	Probable 2nd ATP binding component of glycerol ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90076 PE=3 SV=1 - [Q1M8P0_RHIL3]
Q1MN19	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0144 PE=4 SV=1 - [Q1MN19_RHIL3]
Q1MGV3	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2325 PE=4 SV=1 - [Q1MGV3_RHIL3]
Q1M478	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120385 PE=4 SV=1 - [Q1M478_RHIL3]
Q1MIS0	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1645 PE=4 SV=1 - [Q1MIS0_RHIL3]
Q1M6Z1	Putative transcriptional regulator OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110046 PE=4 SV=1 - [Q1M6Z1_RHIL3]
Q1M538	Putative symbiosis-related calymin OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120065 PE=4 SV=1 - [Q1M538_RHIL3]
Q1MH75	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2200 PE=4 SV=1 - [Q1MH75_RHIL3]
Q1MNB5	ATP-dependent protease subunit HslV OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=hslV PE=3 SV=1 - [HSLV_RHIL3]
Q1ML02	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0856 PE=3 SV=1 - [Q1ML02_RHIL3]
Q1MJU8	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1266 PE=4 SV=1 - [Q1MJU8_RHIL3]
Q1MJ44	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=sodC PE=3 SV=1 - [Q1MJ44_RHIL3]
Q1MJG2	Putative N-terminal transmembrane anchored protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1401 PE=4 SV=1 - [Q1MJG2_RHIL3]

Q1MHZ6	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1921 PE=4 SV=1 - [Q1MHZ6_RHIL3]
Q1MHL2	Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=trmFO PE=3 SV=1 - [TRMFO_RHIL3]
Q1MGF6	Putative outer membrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2478 PE=3 SV=1 - [Q1MGF6_RHIL3]
Q1ML12	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0846 PE=4 SV=1 - [Q1ML12_RHIL3]
Q1MC40	Putative oxidoreductase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4002 PE=4 SV=1 - [Q1MC40_RHIL3]
Q1M3B0	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120707 PE=4 SV=1 - [Q1M3B0_RHIL3]
Q1MKY6	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0872 PE=4 SV=1 - [Q1MKY6_RHIL3]
Q1MCS3	Putative transmembrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3767 PE=4 SV=1 - [Q1MCS3_RHIL3]
Q1M4U3	Putative component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120164 PE=4 SV=1 - [Q1M4U3_RHIL3]
Q1MA19	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=mnmg PE=3 SV=1 - [MNMG_RHIL3]
Q1M6N2	Putative short-chain dehydrogenase/reductase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110155 PE=4 SV=1 - [Q1M6N2_RHIL3]
Q1MEM9	Putative solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3111 PE=4 SV=1 - [Q1MEM9_RHIL3]
Q1MKJ2	Putative D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Penicillin-binding protein) OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1016 PE=3 SV=1 - [Q1MKJ2_RHIL3]
Q1MDD8	Putative exported lipase/esterase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3551 PE=4 SV=1 - [Q1MDD8_RHIL3]
Q1M6G3	Putative two-component response regulator transcriptional regulator OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110223 PE=4 SV=1 - [Q1M6G3_RHIL3]
Q1MCZ3	Hemin-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=hmuT PE=4 SV=1 - [Q1MCZ3_RHIL3]
Q1MGN0	Single-stranded DNA-binding protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ssb PE=3 SV=1 - [Q1MGN0_RHIL3]
Q1MJDO	Putative outer membrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=lipA PE=4 SV=1 - [Q1MJDO_RHIL3]
Q1MIC2	50S ribosomal protein L15 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rplO PE=3 SV=1 - [RL15_RHIL3]
Q1M797	Putative component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL100409 PE=4 SV=1 - [Q1M797_RHIL3]
Q1M470	Putative substrate-binding periplasmic protein component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120393 PE=4 SV=1 - [Q1M470_RHIL3]
Q1MAF2	Putative aminotransferase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4603 PE=4 SV=1 - [Q1MAF2_RHIL3]
Q1MKU4	Putative PRC family protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0913 PE=4 SV=1 - [Q1MKU4_RHIL3]
Q1MKA1	Putative transmembrane AMP-binding acyltransferase family protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1108 PE=4 SV=1 - [Q1MKA1_RHIL3]
Q1MJV4	Sulfate adenylyltransferase subunit 1 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=cysN PE=3 SV=1 - [Q1MJV4_RHIL3]
Q1MLE5	Flagellar L-ring protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=flgH PE=3 SV=1 - [Q1MLE5_RHIL3]
Q1MGF9	Putative DNA polymerase III, delta' subunit OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=holB PE=4 SV=1 - [Q1MGF9_RHIL3]
Q1M4S9	Putative pyruvate ferredoxin oxidoreductase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120179 PE=4 SV=1 - [Q1M4S9_RHIL3]
Q1M616	Putative hydrolase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110370 PE=4 SV=1 - [Q1M616_RHIL3]
Q1M9F7	Putative exported solute-binding protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL80060 PE=4 SV=1 - [Q1M9F7_RHIL3]
Q1MD61	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3627 PE=4 SV=1 - [Q1MD61_RHIL3]
Q1M781	Putative ABC transporter component OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL100425 PE=4 SV=1 - [Q1M781_RHIL3]

Q1M971	Putative periplasmic solute-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90237 PE=4 SV=1 - [Q1M971_RHIL3]
Q1M4M7	Putative exported substrate binding protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120232 PE=4 SV=1 - [Q1M4M7_RHIL3]
Q1MGE3	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=ppiD PE=4 SV=1 - [Q1MGE3_RHIL3]
Q1MKL9	Putative GntR family transcriptional regulator OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0988 PE=4 SV=1 - [Q1MKL9_RHIL3]
Q1MDC2	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3567 PE=4 SV=1 - [Q1MDC2_RHIL3]
Q1MGP3	Transcription-repair-coupling factor OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=mfd PE=3 SV=1 - [Q1MGP3_RHIL3]
Q1MHG5	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2105 PE=4 SV=1 - [Q1MHG5_RHIL3]
Q1MDP3	Putative quinoprotein glucose dehydrogenase-B OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3446 PE=4 SV=1 - [Q1MDP3_RHIL3]
Q1MNA9	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0055 PE=4 SV=1 - [Q1MNA9_RHIL3]
Q1MK34	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1179 PE=4 SV=1 - [Q1MK34_RHIL3]
Q1M4L9	Putative glyoxylate reductase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120240 PE=3 SV=1 - [Q1M4L9_RHIL3]
Q1M6L8	Putative substrate-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110169 PE=4 SV=1 - [Q1M6L8_RHIL3]
Q1MF72	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2912 PE=4 SV=1 - [Q1MF72_RHIL3]
Q1MC71	Putative TolA outer membrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=tolA PE=4 SV=1 - [Q1MC71_RHIL3]
Q1M4H6	Putative ABC transporter component OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120284 PE=4 SV=1 - [Q1M4H6_RHIL3]
Q1MHM9	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2042 PE=4 SV=1 - [Q1MHM9_RHIL3]
Q1MIF1	50S ribosomal protein L10 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=rpIj PE=3 SV=1 - [RL10_RHIL3]
Q1MJD3	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1432 PE=4 SV=1 - [Q1MJD3_RHIL3]
Q1MH65	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2210 PE=4 SV=1 - [Q1MH65_RHIL3]
Q1MIR7	Putative endoglucanase/cellulase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=celC PE=4 SV=1 - [Q1MIR7_RHIL3]
Q1MC79	Putative heat resistant agglutinin 1 OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3962 PE=4 SV=1 - [Q1MC79_RHIL3]
Q1MHV1	Alanine dehydrogenase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=aldA PE=3 SV=1 - [Q1MHV1_RHIL3]
Q1MNF1	Protein-export protein SecB OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=secB PE=3 SV=1 - [SECB_RHIL3]
Q1MCX7	Putative phytochrome/sensor histidine kinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3714 PE=4 SV=1 - [Q1MCX7_RHIL3]
Q1MGW7	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2308 PE=4 SV=1 - [Q1MGW7_RHIL3]
Q1MDV5	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3384 PE=4 SV=1 - [Q1MDV5_RHIL3]
Q1M5P4	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110492 PE=4 SV=1 - [Q1M5P4_RHIL3]
Q1MCZ6	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3695 PE=4 SV=1 - [Q1MCZ6_RHIL3]
Q1M8X8	Putative pseudoazurin protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=azuP PE=4 SV=1 - [Q1M8X8_RHIL3]
Q1MM39	Hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0470 PE=4 SV=1 - [Q1MM39_RHIL3]
Q1MEF8	Uncharacterized protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL3181 PE=4 SV=1 - [Q1MEF8_RHIL3]
Q1MBW9	Putative 5'-nucleotidase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4075 PE=3 SV=1 - [Q1MBW9_RHIL3]

Q1MF21	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2963 PE=4 SV=1 - [Q1MF21_RHIL3]
Q1M549	Putative creatinase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120054 PE=4 SV=1 - [Q1M549_RHIL3]
Q1MFT4	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL2700 PE=4 SV=1 - [Q1MFT4_RHIL3]
Q1M3W5	Putative substrate-binding component of transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL120500 PE=3 SV=1 - [Q1M3W5_RHIL3]
Q1MN84	Conserved hypothetical exported protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL0080 PE=4 SV=1 - [Q1MN84_RHIL3]
Q1MAQ9	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=gpsA PE=3 SV=1 - [GPDA_RHIL3]
Q1MJE3	Putative GntR family transcriptional regulator OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1422 PE=4 SV=1 - [Q1MJE3_RHIL3]
Q1MA60	Error-prone DNA polymerase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=dnaE1 PE=3 SV=1 - [Q1MA60_RHIL3]
Q1M8V8	Putative ATP-binding component of ABC transporter OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL90252 PE=4 SV=1 - [Q1M8V8_RHIL3]
Q1MJE4	Putative short-chain dehydrogenase/reductase OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL1421 PE=4 SV=1 - [Q1MJE4_RHIL3]
Q1MBU3	Putative transmembrane protein OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=RL4101 PE=4 SV=1 - [Q1MBU3_RHIL3]
Q1M5H6	Putative sarcosine oxidase subunit OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=soxB2 PE=4 SV=1 - [Q1M5H6_RHIL3]
Q1M5N1	Putative transcriptional regulator OS=Rhizobium leguminosarum bv. viciae (strain 3841) GN=pRL110505 PE=4 SV=1 - [Q1M5N1_RHIL3]

# Bibliografía

- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1997). Microbial ecology fundamentals and principles.
- Heukelekian, H., & Heller, A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology*, 40(4), 547.
- Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, 46(1), 39.
- Jones, H. C., Roth, I. L., & Sanders, W. M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of bacteriology*, 99(1), 316-325.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J., & Costerton, J. W. (1981). Observations of fouling biofilm formation. *Canadian journal of microbiology*, 27(9), 910-917.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., ... & Høiby, N. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, 21(9), 466-474.
- Secor, P. R., Michaels, L. A., Ratjen, A., Jennings, L. K., & Singh, P. K. (2018). Entropically driven aggregation of bacteria by host polymers promotes antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10780-10785.
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 401-422.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm development. *Microbial Biofilms*, 51-66.
- O'Connor, J. R., Kuwada, N. J., Huangyutitham, V., Wiggins, P. A., & Harwood, C. S. (2012). Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Molecular microbiology*, 86(3), 720-729.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Gross, R. H., & O'Toole, G. A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular microbiology*, 63(3), 656-679.
- Semmler, A. B., Whitchurch, C. B., & Mattick, J. S. (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 145(10), 2863-2873.



Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology*, 48(6), 1511-1524.

Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* spp. biofilms. *Journal of bacteriology*, 182(22), 6482-6489.

Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular microbiology*, 50(1), 61-68.

Gilbert, P., Evans, D. J., & Brown, M. R. W. (1993). Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 67S-78S.

Boyd, A., & Chakrabarty, A. Á. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 60(7), 2355-2359.

Brading MG, Jass J, Lappin-Scott HM. Dynamics of bacterial biofilm formation. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW, editors. *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 46–63.

Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology*, 7(6), 894-904.

Balzer, M., Witt, N., Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Science and Technology*, 61(5), 1105-1111.

Morgan-Sagastume, F., Larsen, P., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2008). Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water research*, 42(4-5), 843-854.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.

Haeckel, E. *Beiträge zur Plastidentheorie*; Gustav Fischer: Jena, Germany, 1870.

Beckwith, T.D. The bacteriology of pulp slime. *J. Bacteriol.* 1931, 22, 15–22.

Flemming, H. C., Meier, M., & Schild, T. (2013). Mini-review: microbial problems in paper production. *Biofouling*, 29(6), 683-696.

Geesey, G. G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *Am Soc Microbiol News*, 48, 9-14.

Lawrence, J. R., Swerhone, G. D., Kuhlicke, U., & Neu, T. R. (2007). In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian journal of microbiology*, 53(3), 450-458.

- Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Kuhlicke, U., & Neu, T. R. (2016). In situ evidence for metabolic and chemical microdomains in the structured polymer matrix of bacterial microcolonies. *FEMS microbiology ecology*, *92*(11).
- Neu, T. R., Swerhone, G. D., & Lawrence, J. R. (2001). Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology*, *147*(2), 299-313.
- Flemming, H. C. (2016). EPS—then and now. *Microorganisms*, *4*(4), 41.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563.
- Saville, R. M., Rakshe, S., Haagenen, J. A., Shukla, S., & Spormann, A. M. (2011). Energy-dependent stability of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Journal of bacteriology*, *193*(13), 3257-3264.
- Price, J. E., & Chapman, M. R. (2018). Phaged and confused by biofilm matrix. *Nature Microbiology*, *3*(1), 2-3.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS microbiology reviews*, *39*(5), 649-669.
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of bacteriology*, *195*(24), 5540-5554.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Sibony-Nevo, O., Bloom-Ackermann, Z., Suissa, R., Steinberg, N., Kartvelishvili, E., ... & Kolodkin-Gal, I. (2016). Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *NPJ biofilms and microbiomes*, *2*(1), 1-10.
- Catlin, B. W. (1956). Extracellular deoxyribonucleic acid of bacteria and a deoxyribonuclease inhibitor. *Science*, *124*(3219), 441-442.
- Catlin, B. W., & Cunningham, L. S. (1958). Studies of extracellular and intracellular bacterial deoxyribonucleic acids. *Microbiology*, *19*(3), 522-539.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, *295*(5559), 1487-1487.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, *74*(2), 470-476.
- Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., & Burgess, J. G. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in applied microbiology*, *57*(6), 467-475.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E., & Newman, D. K. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature chemical biology*, *2*(2), 71-78.

Ibáñez de Aldecoa, A. L., Zafra, O., & González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1390.

Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental microbiology reports*, *5*(6), 778-786.

Okshevsky, M., & Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical reviews in microbiology*, *41*(3), 341-352.

Stickler, D., Morris, N., Moreno, M. C., & Sabbuba, N. (1998). Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *17*(9), 649-652.

Li, X., Chopp, D. L., Russin, W. A., Brannon, P. T., Parsek, M. R., & Packman, A. I. (2015). Spatial patterns of carbonate biomineralization in biofilms. *Applied and environmental microbiology*, *81*(21), 7403-7410.

Li, X., Lu, N., Brady, H. R., & Packman, A. I. (2016). Ureolytic biomineralization reduces *Proteus mirabilis* biofilm susceptibility to ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(5), 2993-3000.

Dorrell, S. (1999). Nanobacteria linked to kidney disease. *Molecular medicine today*, *5*(9), 373.

Kajander, E. O., & Çiftçioglu, N. (1998). Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra-and extracellular calcification and stone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(14), 8274-8279.

Keren-Paz, A., & Kolodkin-Gal, I. (2020). A brick in the wall: Discovering a novel mineral component of the biofilm extracellular matrix. *New biotechnology*, *56*, 9-15.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water research*, *30*(8), 1749-1758.

Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., & Flemming, H. C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Growth in Biofilms*, Pt A.

Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1284-1291.

Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., ... & Wozniak, D. J. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(36), 11353-11358.

- Köseoğlu, V. K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z. T., Lehmann, T. E., ... & Gomelsky, M. (2015). Listeria monocytogenes exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Molecular microbiology*, 96(4), 728-743.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., & Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories*, 5(1), 7.
- Ostapska, H., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2018). Deacetylated microbial biofilm exopolysaccharides: It pays to be positive. *PLoS pathogens*, 14(12), e1007411.
- Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M. M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L., & Block, J. C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, 38(10), 1093-1105.
- Fong, J. N., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbial Biofilms*, 201-222.
- Wingender, J., Jaeger, K. E., & Flemming, H. C. (1999). In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*./eds Wingender J. Neu T., Flemming, HC–Springer, Heidelberg, 231-251.
- Wingender, J., & Jaeger, K. E. (2002). *Encyclopedia of environmental microbiology*.
- Skillman, L. C., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of applied microbiology*, 85(S1), 13S-18S.
- Van Schaik, E. J., Giltner, C. L., Audette, G. F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M., ... & Irvin, R. T. (2005). DNA binding: a novel function of Pseudomonas aeruginosa type IV pili. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1455-1464.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39(6), 1452-1463.
- Taglialegna, A., Lasa, I., & Valle, J. (2016). Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *Journal of bacteriology*, 198(19), 2579-2588.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., & Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and immunity*, 71(7), 4151-4158.
- Dueholm, M. S., Albertsen, M., Otzen, D., & Nielsen, P. H. (2012). Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure. *PLoS one*, 7(12), e51274.
- Dueholm, M. S., Søndergaard, M. T., Nilsson, M., Christiansen, G., Stensballe, A., Overgaard, M. T., ... & Nielsen, P. H. (2013). Expression of Fap amyloids in Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, and P. putida results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiologyopen*, 2(3), 365-382.

- Neu, T. R., Dengler, T., Jann, B., & Poralla, K. (1992). Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Microbiology*, *138*(12), 2531-2537.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. *Environmental microbiology*, *3*(4), 229-236.
- Leck, C., & Bigg, E. K. (2005). Biogenic particles in the surface microlayer and overlaying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, *57*(4), 305-316.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1778*(9), 1735-1756.
- Papanikou, E., Karamanou, S., & Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(11), 839-851.
- Randall, L. L., & Hardy, S. J. S. (2002). SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *59*(10), 1617-1623.
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., & Wickner, W. (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecYE mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell*, *63*(2), 269-279.
- Mogensen, J. E., & Otzen, D. E. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Molecular microbiology*, *57*(2), 326-346.
- Robinson, C., & Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1694*(1-3), 135-147.
- Berks, B. C., Palmer, T., & Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current opinion in microbiology*, *8*(2), 174-181.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., & Palmer, T. (1999). Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli* A distinct and pivotal role for the TatB protein. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(51), 36073-36082.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C., & Müller, J. P. (2002). The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(5), 3268-3273.
- Müller, M. (2005). Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in microbiology*, *156*(2), 131-136.
- Christie, P. J. (2019). The rich tapestry of bacterial protein translocation systems. *The protein journal*, *38*(4), 389-408.

Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 343-359.

Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1592), 1088-1101.

Christie, P. J. (2019). The rich tapestry of bacterial protein translocation systems. *The protein journal*, *38*(4), 389-408.

Kang'ethe, W., & Bernstein, H. D. (2013). Charge-dependent secretion of an intrinsically disordered protein via the autotransporter pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(45), E4246-E4255.

Bernstein, H. D. (2019). Type V secretion in gram-negative bacteria. *Protein Secretion in Bacteria*, 307-318.

van Ulsen, P., ur Rahman, S., Jong, W. S., Daleke-Schermerhorn, M. H., & Luirink, J. (2014). Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1592-1611.

Hospenthal, M. K., & Waksman, G. (2019). The Remarkable Biomechanical Properties of the Type 1 Chaperone-Usher Pilus: A Structural and Molecular Perspective. *Protein Secretion in Bacteria*, 137-148.

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, *13*(5), 269-284.

Hung, C. S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., ... & Hultgren, S. J. (2002). Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular microbiology*, *44*(4), 903-915.

Jacob-Dubuisson, F., Striker, R., & Hultgren, S. J. (1994). Chaperone-assisted self-assembly of pili independent of cellular energy. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(17), 12447-12455.

Sauer, F. G., Fütterer, K., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Hultgren, S. J., & Waksman, G. (1999). Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science*, *285*(5430), 1058-1061.

Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., ... & Glockshuber, R. (2005). Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *The EMBO journal*, *24*(12), 2075-2086.

Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J., ... & Li, H. (2008). Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell*, *133*(4), 640-652.

- Bhoite, S., Gerven, N. V., Chapman, M. R., & Remaut, H. (2019). Curli biogenesis: bacterial amyloid assembly by the type VIII secretion pathway. *Protein Secretion in Bacteria*, 163-171.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., ... & Hultgren, S. J. (2013). Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio*, 4(5).
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 343-359.
- Korotkov, K. V., & Sandkvist, M. (2019). Architecture, function, and substrates of the type II secretion system. *Protein Secretion in Bacteria*, 227-244.
- Mccallum, M., Burrows, L. L., & Howell, P. L. (2019). The dynamic structures of the type IV pilus. *Protein secretion in bacteria*, 113-128.
- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature reviews microbiology*, 17(7), 429-440.
- Ellison, C. K., Dalia, T. N., Ceballos, A. V., Wang, J. C. Y., Biais, N., Brun, Y. V., & Dalia, A. B. (2018). Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nature microbiology*, 3(7), 773-780.
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M. J., ... & Nakayama, K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 276-281.
- Mcbride, M. J. (2019). Bacteroidetes gliding motility and the type IX secretion system. *Protein Secretion in Bacteria*, 363-374.
- Seers, C. A., Slakeski, N., Veith, P. D., Nikolof, T., Chen, Y. Y., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2006). The RgpB C-terminal domain has a role in attachment of RgpB to the outer membrane and belongs to a novel C-terminal-domain family found in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6376-6386.
- Glew, M. D., Veith, P. D., Chen, D., Gorasia, D. G., Peng, B., & Reynolds, E. C. (2017). PorV is an outer membrane shuttle protein for the type IX secretion system. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., ... & Hermodson, M. A. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323(6087), 448-450.
- Létoffé, S. Y. L. V. I. E., & Wandersman, C. E. C. I. L. E. (1992). Secretion of CyaA-PrtB and HlyA-PrtB fusion proteins in *Escherichia coli*: involvement of the glycine-rich repeat domain of *Erwinia chrysanthemi* protease B. *Journal of bacteriology*, 174(15), 4920-4927.

Lecher, J., Schwarz, C. K., Stoldt, M., Smits, S. H., Willbold, D., & Schmitt, L. (2012). An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure*, *20*(10), 1778-1787.

Sánchez-Magraner, L., Viguera, A. R., García-Pacios, M., Garcillán, M. P., Arrondo, J. L. R., de la Cruz, F., ... & Ostolaza, H. (2007). The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(16), 11827-11835.

Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., ... & Svergun, D. I. (2016). Calcium-driven folding of RTX domain  $\beta$ -rolls ratchets translocation of RTX proteins through type I secretion ducts. *Molecular cell*, *62*(1), 47-62.

Holland, I. B., Peherstorfer, S., Kanonenberg, K., Lenders, M., Reimann, S., & Schmitt, L. (2016). Type I protein secretion—deceptively simple yet with a wide range of mechanistic variability across the family. *EcoSal Plus*, *7*(1).

Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1629-1641.

Letoffe, S., Delepelaire, P., & Wandersman, C. (1996). Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *The EMBO journal*, *15*(21), 5804-5811.

Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 213-239.

Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1694*(1-3), 149-161.

Balakrishnan, L., Hughes, C., & Koronakis, V. (2001). Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, *313*(3), 501-510.

Kanonenberg, K., Schwarz, C. K., & Schmitt, L. (2013). Type I secretion systems—a story of appendices. *Research in microbiology*, *164*(6), 596-604.

McDermott, J. E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E. D., ... & Heffron, F. (2011). Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infection and immunity*, *79*(1), 23-32.

Anderson, D. M., & Schneewind, O. (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, *278*(5340), 1140-1143.

Niemann, G. S., Brown, R. N., Mushamiri, I. T., Nguyen, N. T., Taiwo, R., Stufkens, A., ... & Heffron, F. (2013). RNA type III secretion signals that require Hfq. *Journal of bacteriology*, *195*(10), 2119-2125.



Diepold, A., & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 20150020.

Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2019). The injectisome, a complex nanomachine for protein injection into mammalian cells. *Protein Secretion in Bacteria*, 245-259.

Lang, S., & Zechner, E. L. (2012). General requirements for protein secretion by the F-like conjugation system R1. *Plasmid*, 67(2), 128-138.

Redzej, A., Ilangovan, A., Lang, S., Gruber, C. J., Topf, M., Zangger, K., ... & Waksman, G. (2013). Structure of a translocation signal domain mediating conjugative transfer by type IV secretion systems. *Molecular microbiology*, 89(2), 324-333.

De La Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J., & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(1), 18-40.

Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M. S., Logger, L., Douzi, B., ... & Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1664-1673.

Taylor, N. M., van Raaij, M. J., & Leiman, P. G. (2018). Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Molecular Microbiology*, 108(1), 6-15.

Alcoforado Diniz, J., Liu, Y. C., & Coulthurst, S. J. (2015). Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cellular microbiology*, 17(12), 1742-1751.

Coyne, M. J., & Comstock, L. E. (2019). Type VI secretion systems and the gut microbiota. *Protein Secretion in Bacteria*, 343-350.

Frank, B. (1889). Über den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffs durch erdbodenbewohnende Algen. *Berlin Dt. botanik Ges*, 7, 34-42.

Hassen, A. I., Lamprecht, S. C., & Bopape, F. L. (2020). Emergence of  $\beta$ -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume–rhizobium host specificity dogma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 1-13.

Ormeno-Orrillo, E., Servín-Garciduenas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., ... & Martínez-Romero, E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 287-291.

Frayse, N., Couderc, F., & Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1365-1380.

Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W., & Kijne, J. W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular microbiology*, 59(6), 1704-1713.

Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., & Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories*, 5(1), 7.

Becker, A., Fraysse, N., & Sharypova, L. (2005). Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 899-905.

Breedveld, M. W., & Miller, K. J. (1994). Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiological reviews*, 58(2), 145-161.

Crespo-Rivas, J. C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendia-Claveria, A. M., Ollero, F. J., Lopez-Baena, F. J., ... & Lloret, J. (2009). Sinorhizobium fredii HH103 cgs Mutants Are Unable to Nodulate Determinate- and Indeterminate Nodule-Forming Legumes and Overproduce an Altered EPS. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(5), 575-588.

Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International journal of molecular sciences*, 12(11), 7898-7933.

Cremers, H. C. C., Stevens, K., Lugtenberg, B. J., Wijffelman, C. A., Batley, M., Redmond, J. W., ... & Zevenhuizen, L. P. (1991). Unusual structure of the exopolysaccharide of Rhizobium leguminosarum bv. viciae strain 248. *Carbohydrate research*, 218, 185-200.

Whitfield, C., & Paiment, A. (2003). Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydrate research*, 338(23), 2491-2502.

Liu, D., Cole, R. A., & Reeves, P. R. (1996). An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *Journal of bacteriology*, 178(7), 2102-2107.

Paulsen, I. T., Beness, A. M., & Saier Jr, M. H. (1997). Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology*, 143(8), 2685-2699.

Król, J. E., Mazur, A., Marczak, M., & Skorupska, A. (2007). Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in Rhizobium leguminosarum. *Genomics*, 89(2), 237-247.

Krehenbrink, M., & Downie, J. A. (2008). Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in Rhizobium leguminosarum bv. viciae. *BMC genomics*, 9(1), 55.

Finnie, C., Hartley, N. M., Findlay, K. C., & Downie, J. A. (1997). The Rhizobium leguminosarum prsDE genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Molecular microbiology*, 25(1), 135-146.

Finnie, C., Zorreguieta, A., Hartley, N. M., & Downie, J. A. (1998). Characterization of Rhizobium leguminosarum exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *Journal of bacteriology*, 180(7), 1691-1699.

Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., ... & Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology*, *188*(12), 4474-4486.

Ausmees, N., Jacobsson, K., & Lindberg, M. (2001). A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF265222, AF265223, AF315809 and AF315810. *Microbiology*, *147*(3), 549-559.

Abdian, P. L., Caramelo, J. J., Ausmees, N., & Zorreguieta, A. (2013). RapA2 is a calcium-binding lectin composed of two highly conserved cadherin-like domains that specifically recognize *Rhizobium leguminosarum* acidic exopolysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(4), 2893-2904.

Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., ... & Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology*, *188*(12), 4474-4486.

Voza, N. F., Abdian, P. L., Russo, D. M., Mongiardini, E. J., Lodeiro, A. R., Molin, S., & Zorreguieta, A. (2016). A *Rhizobium leguminosarum* CHDL-(cadherin-like-) lectin participates in assembly and remodeling of the biofilm matrix. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1608.

Zorreguieta, A., Finnie, C., & Downie, J. A. (2000). Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. *Journal of bacteriology*, *182*(5), 1304-1312.

Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., & ENGEL, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European journal of biochemistry*, *223*(3), 1019-1026.

Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., & Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, *380*(6572), 360-364.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., & Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *The EMBO journal*, *18*(7), 1738-1747.

García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*, *18*(7), 549-579.

Robertsen, B. K., Åman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1981). Host-symbiont interactions: V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant physiology*, *67*(3), 389-400.

Laus, M. C., Logman, T. J., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W., Azadi, P., Gao, M. Y., & Kijne, J. W. (2004). Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Journal of bacteriology*, *186*(19), 6617-6625.

Merritt, P. M., Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation.

Tambalo, D. D., Yost, C. K., & Hynes, M. F. (2010). Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS microbiology letters*, *307*(2), 165-174.

Jefferson, K. K., & Cerca, N. (2006). *Methods in Molecular Biology. Cell-Cell Interactions: Methods and Protocols*.

Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., & ENGEL, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European journal of biochemistry*, *223*(3), 1019-1026.

Acosta-Jurado, S., Fuentes-Romero, F., Ruiz-Sainz, J. E., Janczarek, M., & Vinardell, J. M. (2021). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes. *International journal of molecular sciences*, *22*(12), 6233.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., ... & Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, *325*(6101), 279-281.

Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology*, *53*(4), 1123-1134.

Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews*, *73*(2), 310-347.

Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., & Dazzo, F. B. (1989). Host-range related structural features of the acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(3), 1461-1466.

O'Neill, M. A., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1991). The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(15), 9549-9555.

Acosta-Jurado, S., Fuentes-Romero, F., Ruiz-Sainz, J. E., Janczarek, M., & Vinardell, J. M. (2021). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes. *International journal of molecular sciences*, *22*(12), 6233.

López-Baena, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Vinardell, J. M. (2016). Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *International journal of molecular sciences*, *17*(5), 755.

Frayse, N., Couderc, F., & Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, *270*(7), 1365-1380.

Spaink, H. P., Kondorosi, A., & Hooykaas, P. J. (Eds.). (2012). *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Springer Science & Business Media.

Król, J., & Skorupska, A. (1997). Identification of genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* whose products are homologues to a family of ATP-binding proteins. *Microbiology*, *143*(4), 1389-1394.

Motlova, L., Klimova, N., Fiser, R., Sebo, P., & Bumba, L. (2020). Continuous assembly of  $\beta$ -roll structures is implicated in the Type I-dependent secretion of large Repeat-in-Toxins (RTX) proteins. *Journal of molecular biology*, *432*(20), 5696-5710.

Cao, L., Yan, X., Borysenko, C. W., Blair, H. C., Wu, C., & Yu, L. (2005). CHDL: a cadherin-like domain in Proteobacteria and Cyanobacteria. *FEMS microbiology letters*, *251*(2), 203-209.

Economou, A., Hamilton, W. D., Johnston, A. W., & Downie, J. A. (1990). The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *The EMBO journal*, *9*(2), 349-354.

Sutton, J. M., Lea, E. J., & Downie, J. A. (1994). The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(21), 9990-9994.