



FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL PAPEL DEL
DIGUANILATO CÍCLICO EN EL
SISTEMA DE SECRECIÓN DE
PROTEÍNAS TIPO III (T3SS) DE
DIVERSAS ESTIRPES DE RIZOBIOS**

Trabajo Fin de Grado

Ana María Cutiño Gobeá

Tutor: Carlos Medina Morillas

Junio 2023

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	1
2.1. El di-GMP-c como segundo mensajero	3
2.2. Biosíntesis y degradación del di-GMP-c	4
2.3. Transducción de señales por di-GMP-c	6
2.4. Antecedentes	6
3. Objetivos	8
4. Materiales y métodos	8
4.1. Estirpes bacterianas y condiciones de crecimiento	8
4.2. Tinción con rojo Congo y unión a calcoflúor	10
4.3. Procedimientos generales de biología molecular	10
4.3.1 Extracción de las proteínas de <i>S. fredii</i> USDA257 y HWG35	10
4.3.2 Cuantificación de proteínas	11
4.3.3 Electroforesis unidireccional de las proteínas	12
4.3.4 Tinción de las proteínas con plata	13
4.3.5 Cuantificación de la expresión de genes bacterianos mediante <i>qPCR</i>	13
5. Resultados	15
5.1. Fenotipo	16
5.1.1. Absorción de rojo Congo y calcoflúor	16
5.1.2. Crecimiento en TY	17
5.1.3. Crecimiento en YM	18
5.2. Efecto de la alteración de concentración de di-GMP-c sobre la secreción de proteínas	19
5.3. Análisis por <i>qPCR</i> de la expresión de genes en presencia de di-GMP-c	20
6. Discusión	21
7. Conclusiones	25
8. Agradecimientos	26
9. Bibliografía	26

1. Resumen

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha estudiado el efecto de la variación en la concentración del segundo mensajero diguanilato cíclico (di-GMP-c) en la secreción de proteínas en *Sinorhizobium fredii* USDA257 y *Sinorhizobium fredii* HWG35 en presencia o ausencia del flavonoide genisteína. Para ello se ha contado con dos estirpes que portan un plásmido donde la diguanilato ciclasa PleD esta expresada de forma constitutiva para así favorecer la sobreproducción de di-GMP-c (pJBpleD*). Para el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo técnicas de biología molecular para obtener un perfil de las proteínas extracelulares secretadas en cada condición, y se realizaron ensayos de qPCR para estudiar la expresión de los efectores en presencia o ausencia de genisteína y con combinaciones de altos niveles de di-GMP-c o niveles fisiológicos.

2. Introducción

Los rizobios son bacterias pertenecientes a diversos géneros de la familia *Rhizobiaceae* que viven en los suelos saprofiticamente y en determinadas circunstancias establecen relaciones simbióticas con plantas de la familia *Leguminosae*, llevando a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Este proceso consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio en unas estructuras vegetales especializadas llamadas nódulos que son inducidas por los rizobios (López-Baena *et al.*, 2016). El proceso de la nodulación se realiza gracias a un intercambio de señales moleculares entre ambos organismos. La planta exuda flavonoides a través de las raíces, entre los que se encuentra la isoflavona genisteína, que inducen la expresión de genes que se encargan de la síntesis y secreción de lipochitooligosacáridicos o factores de nodulación (factores Nod) en el rizobio, que permiten la infección de la bacteria y la posterior formación del nódulo (Ausmees *et al.*, 2004). En el establecimiento de la simbiosis la bacteria usa otras moléculas como los polisacáridos de superficie o las proteínas secretadas por los sistemas de secreción, moléculas que entre otras funciones determinan la especificidad del hospedador (Soto *et al.*, 2011).

Entre los sistemas de secreción utilizados por los rizobios, los de tipo III (T3SS), tipo IV (T4SS) y tipo VI (T6SS), tienen la particularidad de inyectar unas proteínas en el citoplasma de la célula vegetal, algunas de las cuales se denominan efectores. La principal

función de estos efectores en la célula vegetal es inhibir la respuesta de defensa (Acosta-Jurado *et al.*, 2016) y la respuesta innata de la planta que se desencadena por los MAMPs (del inglés, Microbial-Associated Molecular Patterns) a través de varios mecanismos, como puede ser la inhibición de quinasas que participan en la señalización de la respuesta de defensa de la planta (Soto *et al.*, 2011). Pero en ocasiones estos efectores serán reconocidos por los receptores específicos intracelulares de la planta dando lugar a una respuesta hipersensible (HR) y que desencadenará una respuesta sistémica adquirida (SAR) bloqueando así la infección (López-Baena *et al.*, 2016).

El T3SS es el aparato de inyección de proteínas bacteriano mejor caracterizado, y está presente tanto en patógenos como en simbioses, y su maquinaria secretora está muy conservada. La estructura del T3SS atraviesa tanto la membrana externa de la bacteria, como la pared celular y la membrana de la célula hospedadora y consta de dos partes, una base cilíndrica que atraviesa ambas membranas y una parte extracelular hueca y alargada denominada *pilus* (Jiménez Guerrero, 2015). Este sistema secreta las proteínas de nodulación extracelulares (Nops) que pueden actuar como proteínas efectoras, o como parte de la estructura del sistema de secreción bacteriano, como es el caso de NopA y NopB que forman parte del apéndice extracelular del T3SS en *Sinorhizobium fredii* NGR234 (López-Baena *et al.*, 2016). En muchos casos la secreción de estas proteínas depende de flavonoides, como ocurre con NopL, NopX y NopP en *Sinorhizobium fredii* USDA257 (en adelante USDA257) (Ausmees *et al.*, 2004), en este rizobio se secretan al menos cinco Nops en respuesta a los flavonoides (Lorio *et al.*, 2004). La secreción de estas proteínas a través de los T3SS no es fundamental para el proceso de nodulación en todos los casos, ya que muchos rizobios no poseen estos sistemas de secreción y aun así establecen simbiosis con sus hospedadores naturales (Marie *et al.*, 2003).

El T6SS se ha descrito recientemente en bacterias y actúa como un inyector de proteínas en eucariotas u otras bacterias. La estructura del T6SS se encuentra muy relacionada estructuralmente con la cola de un bacteriófago, lo que da indicios de su origen (Aksyuk *et al.*, 2009). Consta de una vaina contráctil situada en el citoplasma bacteriano que envuelve a un tubo que se extiende desde el interior celular al exterior y de una plataforma basal en la membrana bacteriana (Ho *et al.*, 2014). Al contraerse la vaina el tubo interior se impulsa a la célula diana y se lleva a cabo la liberación del efector (Zoued *et al.*, 2014). No es muy frecuente que los rizobios posean este sistema de secreción, aunque

recientemente se está comenzando su estudio en algunas especies en las que se han detectado genes que codifican su maquinaria.

Sinorhizobium fredii USDA257 es una bacteria gram negativa que se aisló de cultivares de soja silvestre, y es capaz de establecer simbiosis con 79 géneros de leguminosas. En esta estirpe, uno de los rizobios mejor caracterizados, la mayor parte de los genes relacionados con la fijación de nitrógeno y simbiosis se localizan en el único plásmido que tienen conocido como plásmido simbiótico o pSym. Al igual que *S. fredii* NGR234, tiene una segunda copia de un T3SS en su cromosoma (Schuldes *et al.*, 2012) y presenta un T6SS en proceso de caracterización, a diferencia de *S. fredii* NGR34 y *S. fredii* HH103 que carecen de este sistema (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2022). USDA257 no es capaz de nodular en cultivares americanos como McCall (Bec-Ferte *et al.*, 1994; Krishnan, 2002), ni variedades comerciales de soja (Vinardell *et al.*, 2015), excepto aquellos mutantes que no secretan Nops que sí son capaces (López-Baena *et al.*, 2016), teniendo por tanto un papel muy importante las proteínas efectoras que se secretan a través del T3SS (Krishnan *et al.*, 2003).

Sinorhizobium fredii HWG35 (en adelante HWG35) es una estirpe muy competitiva, que fue aislada de nódulos de cultivares de soja del condado de Wei Fang, provincia de Shang Dong en China. Aunque se encuentra muy emparentada con USDA257 tiene la capacidad de nodular soja americana (Rodríguez-Carvajal *et al.*, 2005), lo que la hace un interesante objetivo de estudio en cuanto a la secreción de proteínas implicadas en la nodulación.

2.1. El di-GMP-c como segundo mensajero

Tanto la secreción de proteínas efectoras como la expresión de los genes relacionados con los sistemas de secreción bacterianos pueden depender de las concentraciones intracelulares de ciertos metabolitos, como es el caso del bis-(3'-5')-guanosina monofosfato cíclico o diguanilato cíclico (di-GMP-c), un segundo mensajero que fue descubierto como un factor que activaba alostéricamente a la celulosa sintasa de *Gluconacetobacter xylinus* (Hengge, 2009).

Se ha descrito que el diguanilato cíclico controla la transición entre el estilo de vida sésil y planctónico en algunas bacterias patógenas de eucariotas. Altas concentraciones de este metabolito favorecen la formación de biopelículas a través de la regulación de la síntesis de exopolisacáridos y adhesinas (McCarthy *et al.*, 2017; Pérez-Mendoza *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2011), lo cual está asociado a infecciones crónicas, mientras que las infecciones agudas se asocian con la movilidad bacteriana y la virulencia (Jenal & Malone, 2006). Además, altos niveles de di-GMP-c se asocian con la activación del T6SS y la inhibición del T3SS en *Pseudomonas aeruginosa* para así promover el estado de sesilidad reprimiendo la virulencia (Moscoso *et al.*, 2011).

2.2. Biosíntesis y degradación del di-GMP-c

El diguanilato cíclico se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP, en una reacción catalizada por las diguanilato ciclasas (DGC) y se descompone en 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) por la acción de las fosfodiesterasas (PDE), el cual posteriormente se hidroliza en dos moléculas de GMP (Hengge, 2009; Soto *et al.*, 2011). En general, cuando la diguanilato ciclasa está activa forma un homodímero de dos subunidades con dominios GGDEF, el sitio activo (sitio A) de la enzima se encuentra entre ambas subunidades, cada una de las cuales tiene una molécula de GTP. Además presenta un sitio secundario (sitio I) con un motivo RXXD donde se une el di-GMP-c cuando su concentración intracelular es elevada para que tenga lugar la inhibición alostérica por producto (Schäper *et al.*, 2016), de esta forma se evita un consumo excesivo de GTP. Las proteínas con actividad PDE pueden presentar un dominio EAL o un dominio HD-GYP, siendo las primeras más abundantes. Aquellas fosfodiesterasas que contienen dominios EAL degradan el di-GMP-c hasta su intermediario 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) el cual se degrada hasta dos moléculas de GMP por fosfodiesterasas inespecíficas. Por otro lado, las PDE que presentan dominios HD-GYP degradan el di-GMP-c directamente a dos moléculas de GMP (Figura 1). Este proceso es dependiente de Mg^{2+} o Mn^{2+} y es inhibido por Ca^{2+} y Zn^{2+} (Hengge, 2009).

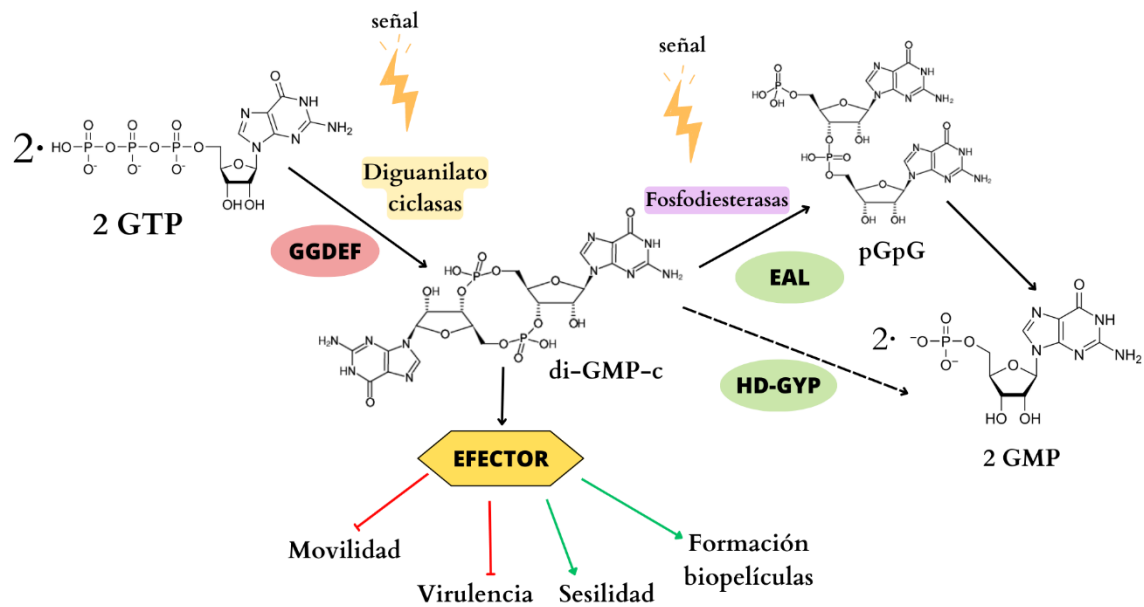


Figura 1. Representación de la síntesis y degradación de di-GMP-c y sus funciones fisiológicas. Los niveles de di-GMP-c son controlados por diguanilato ciclasas que contienen un dominio GGDEF (rojo) y fosfodiesterasas con dominios EAL o HD-GYP (verde) en función de señales. El di-GMP-c se unirá a un efector encargado de traducir estos niveles en una respuesta celular. Altas concentraciones de este segundo mensajero llevarán a la expresión de genes relacionados con la sesilidad y la formación de biopelículas e inhibirá a aquellos genes relacionados con la movilidad y la virulencia.

Los dominios de estas enzimas se asocian a dominios de entrada de señales como el dominio PAS que fue descubierto en varias diguanilato ciclasas de *Gluconacetobacter xylinus* (Tal *et al.*, 1998), por lo que en respuesta a estas señales ambientales como el oxígeno, luz azul, antibióticos, sales biliares o mucina (Jenal & Malone, 2006) sintetizarán o degradarán di-GMP-c, el cual se unirá a moléculas efectoras que alterará alostéricamente y que serán las encargadas de traducir los niveles de di-GMP-c en una respuesta celular específica (Hengge, 2009). El diguanilato cíclico ejerce su efecto regulador en la síntesis de proteínas a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traduccional (López-Baena *et al.*, 2019; Perez-Mendoza *et al.*, 2014).

Entre las diguanilato ciclasa se encuentra PleD, esta lleva a cabo eficazmente el paso de GTP a di-GMP-c y carece de actividad fosfodiesterasa. Esta enzima es un regulador de respuesta que participa en la formación de los polos en *Caulobacter crescentus* y su actividad diguanilato ciclasa requiere un dominio GGEDF intacto (Jenal & Malone, 2006). La expresión sintética de esta enzima se ha utilizado para alterar los niveles de di-GMP-c en distintas bacterias y analizar su papel en distintos procesos celulares (Perez-Mendoza *et al.*, 2014; Romero Jiménez, 2016).

2.3. Transducción de señales por di-GMP-c

La transducción de señales se lleva a cabo por una serie de moléculas llamadas efectoras. Estas serán las encargadas de traducir los niveles de di-GMP-c en una respuesta celular específica. Gracias a la diversidad de las mismas el di-GMP-c es capaz de regular numerosas funciones celulares (Hengge, 2009).

Entre estas moléculas efectoras se encuentran las proteínas con dominios PilZ. La unión de di-GMP-c a estos dominios provoca cambios conformacionales en la proteína, que en ocasiones puede facilitar la interacción de la misma con otras proteínas (Jenal & Malone, 2006). Son las más distribuidas entre las bacterias (Yuan *et al.*, 2015). También existen DGC y PDE con dominios GGDEF y EAL degenerados que son proteínas enzimáticamente inactivas que han perdido su actividad catalítica, actuando como proteínas efectoras que responden a niveles intracelulares de di-GMP-c (Schirmer & Jenal, 2009).

Algunos factores de transcripción también pueden actuar como moléculas efectoras, como es el caso de FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* que puede activarse por unión a di-GMP-c. Mediante esta unión se promueven la expresión de genes relacionados con la síntesis de flagelos e inhibe genes que participan en la formación de exopolisacáridos. Cuando se le une diguanilato cíclico su actividad es inhibida (Hengge, 2009). De la misma forma los riboswitches, dominios de ARN conservados ubicados en las regiones 5' no traducidas del ARNm, pueden regular la expresión de genes a nivel transcripcional o traduccional (Hengge, 2009; Schäper *et al.*, 2016; Shanahan & Strobel, 2012).

2.4. Antecedentes

La elevada concentración de diguanilato cíclico intracelular interviene en el paso de una forma de vida móvil a una sésil, fomentando la síntesis de exopolisacáridos y adhesinas en numerosas especies bacterianas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Se ha comprobado que en *P. aeruginosa* el aumento intracelular de este segundo mensajero hace que se inhiba la expresión de los genes que codifican proteínas relacionadas con el T3SS y se activen aquellos relacionados con el T6SS, controlando estos sistemas inversamente. (Moscoso *et al.*, 2011). Para ejercer su función PleD se dimeriza al recibir un grupo fosfato (Paul *et al.*, 2004), de modo que para simplificar su uso en el laboratorio se ha utilizado la proteína PleD* que presenta una serie de cambios en su secuencia de aminoácidos y no

depende de fosforilación para su activación, teniendo una actividad diguanilato ciclasa constitutiva (Aldridge *et al.*, 2003).

En una colaboración del grupo de investigación donde se desarrolla este Trabajo Fin de Grado con el Dr. Daniel Pérez Mendoza, investigador de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), se han transformado numerosas estirpes de *S. fredii* con el plásmido pJBpleD* que confiere la capacidad de aumentar la concentración de di-GMP-c a las bacterias que lo portan, mostrando en estas un fenotipo mucoso debido a la alta producción de polisacáridos. Por otro lado, se parte de la hipótesis de que altas concentraciones de flavonoides inhiben la producción de polisacáridos superficiales (Cooper, 2004) e induce la secreción de determinadas proteínas (Ausmees *et al.*, 2004).

De entre todas las bacterias transformadas se han seleccionado las estirpes *S. fredii* USDA257 y *S. fredii* HWG35, dado que ambas presentan un fenotipo rugoso-rojo en placas de rojo Congo y brillantes en placas de calcoflúor, lo que indica una gran producción de exopolisacáridos (Figura 2).

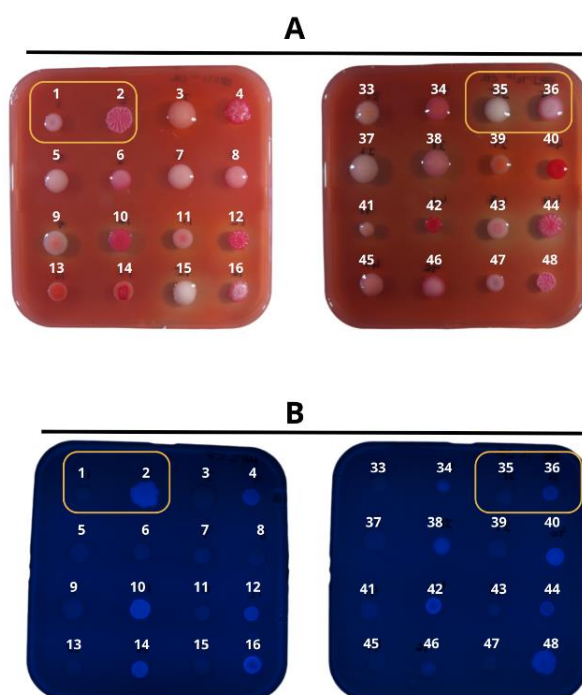


Figura 2. Estirpes de *Sinorhizobium fredii* crecidas en rojo Congo (A) y en MM Robertsen suplementado con calcoflúor (B). Se recuadran las estirpes usadas en este trabajo, *S. fredii* USDA257 (1) y (2), *S. fredii* HWG35 (35) y (36). Los números impares indican el plásmido pJB vacío y los pares indican la estirpe correspondiente con el plásmido pJBpleD*. Imágenes cedidas por el Dr. Daniel Pérez Mendoza, investigador de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

USDA257 es una de las estirpes de rizobios que presenta un T3SS bien caracterizado, y con un papel importante en el establecimiento de una simbiosis efectiva y en la determinación del rango de hospedador. Además, a diferencia de otros rizobios consta de un T6SS que se está caracterizando en nuestro laboratorio.

En el caso de HWG35 se ha seleccionado ya que es una estirpe muy competitiva lo que podría tener un gran interés agrobiológico para la formulación de inoculantes, y aunque se sabe que presenta un T3SS, su alta capacidad competitiva podría deberse a la presencia de un T6SS, aunque de momento se desconoce esta información.

3. Objetivos

1. Analizar el efecto de la variación de la concentración de di-GMP-c en la secreción de proteínas en *S. fredii* USDA257 y HWG35.
2. Analizar la expresión de T3SS y T6SS en presencia o ausencia del flavonoide genisteína y con combinaciones de altos niveles de di-GMP-c o niveles fisiológicos.

4. Materiales y métodos

4.1. Estirpes bacterianas y condiciones de crecimiento

Las estirpes de *S. fredii* y los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Estirpes bacterianas de *Sinorhizobium fredii* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
USDA257	Estirpe silvestre	(Keyser <i>et al.</i> , 1982)
USDA257 (pJB3Tc19)	USDA257 con el plásmido pJB vacío. Tc ^R .	(Pérez-Mendoza, D).
USDA257 (pJBpleD*)	USDA257 con el plásmido pJB portando el gen <i>pleD</i> * expresado constitutivamente que codifica la diguanilato ciclasa PleD*. Tc ^R .	(Pérez-Mendoza, D).
HWG35	Estirpe silvestre	(Yang <i>et al.</i> , 2001)
HWG35 (pJB3Tc19)	HWG35 con el plásmido pJB vacío. Tc ^R .	(Pérez-Mendoza, D).
HWG35 (pJBpleD*)	HWG35 con el plásmido pJB portando el gen <i>pleD</i> * expresado constitutivamente que codifica la diguanilato ciclasa PleD*. Tc ^R .	(Pérez-Mendoza, D).
HH103	Estirpe silvestre control	(Dowdle & Bohlool, 1985)

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pJB3Tc19	Ap ^R , Tc ^R , vector de clonación IncP derivado de RK2.	(Blatny <i>et al.</i> , 1997)
pJBpleD*	Ap ^R , Tc ^R , derivado de pJB3Tc19 con un fragmento XbaI/EcoRI de 1423 pb que contiene el gen <i>pleD</i> * de <i>Caulobacter crescentus</i> .	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2014)

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron TY (Beringer, 1974) e YM (Vincent, 1970). Todas las estirpes fueron crecidas en medio TY e incubadas a 28°C suplementado con 2% de agar en el caso de los cultivos sólidos. Los cultivos líquidos tanto de TY como de YM se incubaron a 28°C en agitación a 180 r.p.m. Además, todos los medios fueron suplementados con tetraciclina (Tc) 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Cuando fue necesaria la inducción con flavonoides de los cultivos se le añadió genisteína a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3,7 μM). Las cepas se conservaron a -80°C en una solución compuesta de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v).

4.2. Tinción con rojo Congo y unión a calcoflúor

Para la tinción de rojo Congo (RC) se suplementó una placa de 25 mL de TY con 25 mg/L del compuesto, posteriormente se dispusieron 4 gotas de 10 μL de los cultivos a analizar.

La unión a calcoflúor (CF) se analizó en una placa de 25 mL de TY suplementada con el compuesto al 0,025% (m/v). Para la preparación de 1 mL de solución se utilizó 25 mg de calcoflúor, 100 μL de NaOH 1mM y 900 μL de H₂O. Esto se mezcló con tampón Hepes 1M en proporción 2:1. Tras ello se dispusieron 4 gotas de 10 μL de los cultivos a analizar.

Las placas permanecieron a 28°C durante 72 horas. Finalmente, las placas con CF se observaron bajo luz UV.

4.3. Procedimientos generales de biología molecular

4.3.1 Extracción de las proteínas de *S. fredii* USDA257 y HWG35

Se cultivaron las bacterias en 50 mL de YM en presencia o ausencia de genisteína y/o de PleD* expresado constitutivamente. Cada bacteria fue por tanto crecida en cuatro condiciones:

- CONDICIÓN 1: - Genisteína – PleD*.
- CONDICIÓN 2: + Genisteína – PleD*.
- CONDICIÓN 3: - Genisteína + PleD*.
- CONDICIÓN 4: + Genisteína + PleD*.

Estos cultivos se incubaron en agitación a 28°C durante un mínimo de 48 horas. Los cultivos se centrifugaron a 9000 g durante 25 minutos a 4°C y se separaron el

sobrenadante del pellet para aislar las proteínas intra y extracelulares. Al sobrenadante se le añadieron 150 mL de acetona fría y esta mezcla se conservó a -20°C durante al menos 24 horas.

Para llevar a cabo la extracción de **proteínas intracelulares**, el pellet obtenido se resuspendió en 50 mL de NaCl al 0,9% y 100 mL de H₂O destilada, y se centrifugó a 11.000 g durante 1 hora. Este último paso se realizó dos veces. Tras esto se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400 µL de tampón de muestra Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8.

Posteriormente se añadieron a cada muestra 400 µL del resto del tampón, que contiene SDS 10% (m/v), glicerol 20% (v/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v).

Por último, las muestras se hirvieron en el termobloque a una temperatura de 100°C durante 10 minutos y se conservaron a -20°C.

Para la extracción de **proteínas extracelulares**, tras las 24 horas a -20°C, se retiró el exopolisacárido con la ayuda de una varilla. La mezcla se centrifugó a 11.500 g durante 40 minutos a 4°C. El sedimento se dejó secar por completo y se resuspendió en 180 µL de tampón de muestra sin SDS [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,05% (m/v)]. Esto se pasó a un eppendorf y se le añadieron 20 µL de SDS 10% (m/v).

Tras ello las muestras se hirvieron en el termobloque a 100°C durante 10 minutos y se conservaron a -20°C.

4.3.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se ha utilizado el aparato “*Qubit fluorometer*”, las muestras se prepararon usando el kit “*Qubit RNA Assay kit*”. Para determinar la concentración de proteínas de una muestra, se preparó previamente la “*Working Solution*” diluyendo “*Qubit protein Reagent*” 1:200 en “*Qubit protein Buffer*”, se deben preparar 200 µL por cada muestra que se vaya a cuantificar. Se mezclaron 190 µL de “*Working Solution*” con 10 µL de la muestra a cuantificar. Esto se agitó con el vórtex y permaneció a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo las muestras se introdujeron en el fluorímetro.

Posterior a la cuantificación a cada muestra se le añadieron 20 μL de azul de bromofenol 0,05% (m/v).

4.3.3 Electroforesis unidireccional de las proteínas

Para separar las proteínas según su masa molecular, se realizó una electroforesis unidireccional en condiciones desnaturalizantes. Se incubaron las muestras a 100°C durante 10 minutos y se mantuvieron en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 16.000 g durante 1 minuto, y se cargaron 15 μL del sobrenadante obtenido en el gel junto con el marcador de peso molecular “*GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder*”.

Los geles de separación se deben elaborar con distinta concentración de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas que se quieran separar, en este caso el gel se elaboró con una concentración de acrilamida del 12% para separar proteínas de mayor tamaño. Después, los geles inmersos en tampón de electroforesis 1X se corrieron a 190V en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad, EEUU) hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel.

GEL DE SEPARACIÓN (12%)

H ₂ O destilada	13,05 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	7,5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 40% 29:1	9 mL
SDS 10% (m/v)	300 μL
APS 10% (m/v)	125 μL
TEMED	15 μL

GEL DE EMPAQUETAMIENTO (4%)

H ₂ O destilada	4,7 mL
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	1,89 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 40% 29:1	750 μL
SDS 10% (m/v)	75 μL
APS 10% (m/v)	37,5 μL
TEMED	7,5 μL

Nota: Los volúmenes indicados son los adecuados para geles de 17 x 17 cm.

Solución empleada

Tampón de electroforesis 1X Tris 25 mM, glicina 192 M, SDS 0,1% (m/v) pH 8,3

4.3.4 Tinción de las proteínas con plata

La tinción de las proteínas con plata es un método más sensible que la tinción con azul de Coomassie. Finalizada la electroforesis, el gel se introdujo en fijador durante 30 minutos en agitación suave, posteriormente se colocó en la solución oxidante otros 30 minutos, tras ello se realizaron 3 lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno. Tras ello el gel se sumergió en la solución que contiene nitrato de plata (2,5% m/v) durante 20 minutos en oscuridad total para evitar la tinción de fondo. Una vez teñido se realizaron dos lavados de 1 minuto cada uno con agua destilada y el gel quedó inmerso en el revelador. La reacción se detuvo añadiendo una solución de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,65g en 250 mL de agua destilada).

Soluciones empleadas (para un volumen de 250 mL)

Fijador	100 mL de etanol 40% (v/v), 25 mL de ácido acético glacial 10% (v/v), 125 mL de H_2O_d
Oxidante	75 mL de etanol 40% (v/v), 17g de acetato de sodio 0,8M, 10 mL de tiosulfato de sodio (5% [m/v]) 0,04% (v/v)
Reactivo de plata	25 mL de nitrato de plata 2,5% (m/v) en 225 mL de H_2O_d
Revelador	6,25 g de Na_2CO_3 0,22 M, 0,05 mL de formaldehído (37% m/v)
Detención	EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,65g en 250 mL de agua destilada)

4.3.5 Cuantificación de la expresión de genes bacterianos mediante *q*PCR

Para cuantificar la expresión de genes bacterianos se realizaron experimentos de *q*PCR a partir de los ARNm de dichos genes, los cuales se retrotranscribieron previamente a ADNc, siguiendo los siguientes pasos:

1. Extracción del ARN total en las diferentes condiciones a estudiar.
2. Retrotranscripción del ARN a ADNc.
3. Realización de la PCR cuantitativa (*q*PCR).

Se incubaron los cultivos de las estirpes de *S. fredii* en 5 mL de YM (suplementado con flavonoide en caso de que fuese necesario), a 28°C a 180 r.p.m durante 48 horas. Las condiciones fueron las similares al apartado 4.3.1.

Para la extracción del ARN bacteriano se utilizó el kit *High pure RNA isolation* (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Además, para comprobar la integridad del ARN se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV. Se añadió 1 µL de la solución con ARN a 1 µL de tampón de carga con bromuro de etidio y 4 µL de H₂O_d. Esto se cargó en un gel de agarosa al 1,4% (m/v), tampón MOPS 4X, formaldehído (como agente desnaturalizante) y agua destilada. Se dejó correr durante 20 minutos a 120V en tampón MOPS 1X.

Cantidades para realizar el gel de agarosa.

	Pequeño (40 mL)	Grande (60 mL)
Agua destilada	28 mL	42 mL
Agarosa 1,4% (m/v)	0,56 g	0,84 g
MOPS 4X	10 mL	15 mL
Formaldehído	2 mL	3 mL

Para la retrotranscripción se utilizó el kit *PrimeScript RT reagent* (Takara, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo las reacciones de PCR utilizando los cebadores específicos adecuados (Tabla 3) y se usó un programa que sigue el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos.
2. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
3. Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (IDT) durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72°C durante 20 segundos.
5. Lectura de la fluorescencia.
6. Repetición del paso 2 al 5, durante 40 ciclos.
7. *Melting curve* o curva de fusión desde 60 a 95°C.

El volumen de la mezcla fue de 10 μ L. Las mezclas de reacción contenían los cebadores necesarios para cada reacción a una concentración de 0,3 μ M y 5 μ L de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EEUU).

Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo para ensayos de qPCR de genes de *S. fredii*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
16S_F	TAAACCACATGCTCCACC	18	52
16S_R	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51
nodA_F	CGTCATGTATCCGGTGCTGCA	21	60
nodA_R	CGTTGGCGGCAGGTTGAGA	19	61
tssAq_R	CAGCATCGACTTGACGAA	18	51,3
tssAq_F	TGCTGAATTCCTCGGAAG	18	51,3
ttsIq_F	CGGTTGGAAGATCAACTCTA	20	51
tssIq_R	GTCAATTCAAGAACGTAGCC	20	51
nopMq_F	GCAGTTCGTCGCCAAGCTCA	20	55,6
nopMq_R	ATCGCTGACCGTGAAGGCTGA	21	50,8
nopLq_F	GAGCTGGATCATGGCAA	17	52,3
nopLq_R	ATGCTGCCAATCAAGCA	17	52,5
nopIq_F	ACGTGGGTGGAAACGA	16	53,9
nopIq_R	GACGAATCTGTCTCGACA	18	51,3

Solución empleada:

MOPS 4X MOPS 80 mM, AcNa 20 mM, EDTA 4 mM

5. Resultados

El presente trabajo se ha llevado a cabo con las estirpes USDA257 y HWG35 con el plásmido pJBpleD* (o el correspondiente vector vacío) cedidas por el grupo del Dr. Daniel Pérez Mendoza de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Además, se ha llevado a cabo la inducción con flavonoides de los cultivos añadiéndoles genisteína a 1 μ g/mL (3,7 μ M), para corroborar el efecto que tienen los flavonoides en la producción de polisacáridos y en la secreción de proteínas. Se comenzó con la comprobación del fenotipo que presentaban estas bacterias con nuestras condiciones del cultivo.

5.1. Fenotipo

Para el análisis del fenotipo de las bacterias expresando el gen *pleD** en presencia o ausencia de genisteína, se crecieron tanto en medio sólido como líquido en TY, y en medio líquido YM. Además, se analizó la capacidad de absorción de estas estirpes de diversos colorantes que unen exopolisacáridos.

5.1.1. Absorción de rojo Congo y calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que se une a polisacáridos con enlaces β lo que se traduce en una fluorescencia azul cuando se crece en un medio en presencia del compuesto y expuesto a la luz UV. Muchos de los polisacáridos superficiales producidos por los rizobios son capaces de unir calcoflúor (Leigh *et al.*, 1985). Para estudiar la capacidad de unión de esta molécula de las distintas estirpes se crecieron en placas de medio TY suplementadas con el compuesto.

Se observó que aquellas estirpes que presentaban el gen *pleD** expresado constitutivamente (pJB*pleD**) eran capaces de adsorber el compuesto, al mostrar fluorescencia intensa bajo luz ultravioleta, presentando así un fenotipo CF+. En cambio, en aquellas estirpes donde se encontraba el plásmido vacío (pJB3Tc19) se observaba un fenotipo CF- (Figura 3).



Figura 3. Aspecto de las bacterias de estudio en medio sólido suplementado con calcoflúor. Las bacterias con los plásmidos pJB*pleD** o pJB3Tc19 fueron incubadas durante 72h a 28°C.

Para estudiar la producción de polisacáridos de superficie en nuestras condiciones, también se utilizó el colorante rojo Congo, que presenta una gran capacidad para unirse a diferentes tipos de polisacáridos bacterianos y proteínas de tipo amiloide (Thomas-Oates *et al.*, 2003). La capacidad de adsorción de las estirpes a este colorante se estudió en placas de medio TY suplementadas con el colorante.

Se comprobó tanto en USDA257 como en HWG35 que cuando el gen *pleD** se encuentra expresado constitutivamente se observa un fenotipo mucho más mucoso y rugoso, tipo *wrinkly*, lo que denota una gran producción de exopolisacáridos, además las colonias presentan un color rojo mucho más intenso, presentando así un fenotipo CR+. En contraposición, en aquellas estirpes donde el plásmido se encuentra vacío se observa una disminución en la capacidad de adsorción del colorante respecto a las otras condiciones, presentando un fenotipo CR-. Además, en presencia de genisteína se observa un fenotipo mucho menos mucoso en todos los casos, aunque se aprecien indicios de producción de exopolisacáridos en aquellas estirpes con el plásmido pJBpleD* (Figura 4).

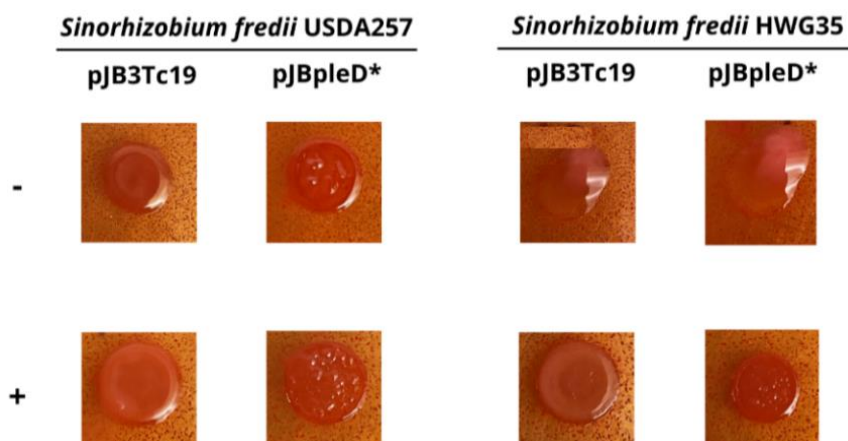


Figura 4. Aspecto de las bacterias de estudio en medio sólido adicionado con rojo Congo. Las bacterias con los plásmidos pJBpleD* o pJB3Tc19 en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína fueron incubadas durante 72h a 28°C.

5.1.2. Crecimiento en TY

En aquellas estirpes que portan el plásmido pJBpleD* se pudo observar la presencia de flóculos en suspensión, que indican la gran producción de polisacáridos induciendo la formación de biofilm, siendo esta diferencia mucho más clara en el caso de USDA257 (Figura 5). El crecimiento óptimo en todos los casos fue entre 48-72 horas a 28°C en agitación a 180 r.p.m.

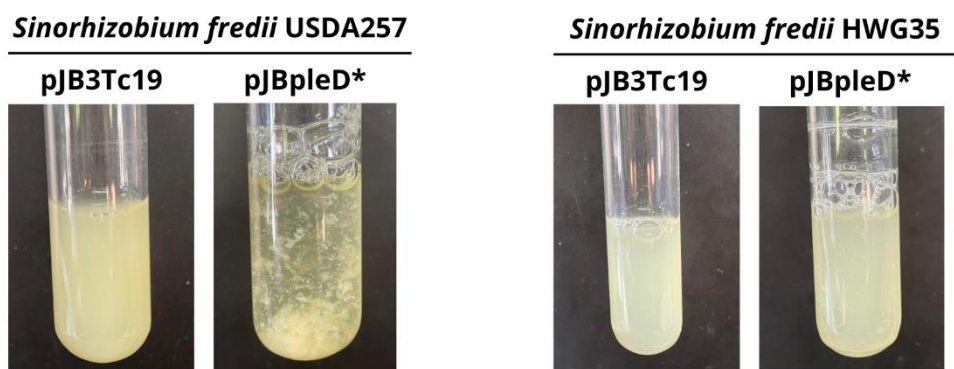


Figura 5. Crecimiento en 5 mL de medio líquido TY de bacterias portadoras del plásmido pJBpleD*o el vector vacío pJB3Tc19. Las imágenes se tomaron tras 72h de crecimiento a 28°C en agitación a 180 r.p.m.

5.1.3. Crecimiento en YM

Se estudió el fenotipo en presencia o ausencia del flavonoide genisteína. Se observó un fenotipo agregativo cuando *pleD** se encontraba sobreexpresado tanto en HWG35 como en USDA257, además en este último se puede distinguir con mayor claridad la formación de flóculos tanto en ausencia como en presencia del flavonoide, siendo menor en este último caso (Figura 6), ya que los flavonoides disminuyen la formación de polisacáridos. Este fenotipo agregativo en ambos casos se debe a la gran producción de diguanilato cíclico, que induce la síntesis de exopolisacáridos, opacando el posible efecto que pueda tener la genisteína sobre la síntesis de estos.

En este medio la presencia de flóculos en suspensión es más clara ya que es un medio rico en manitol.

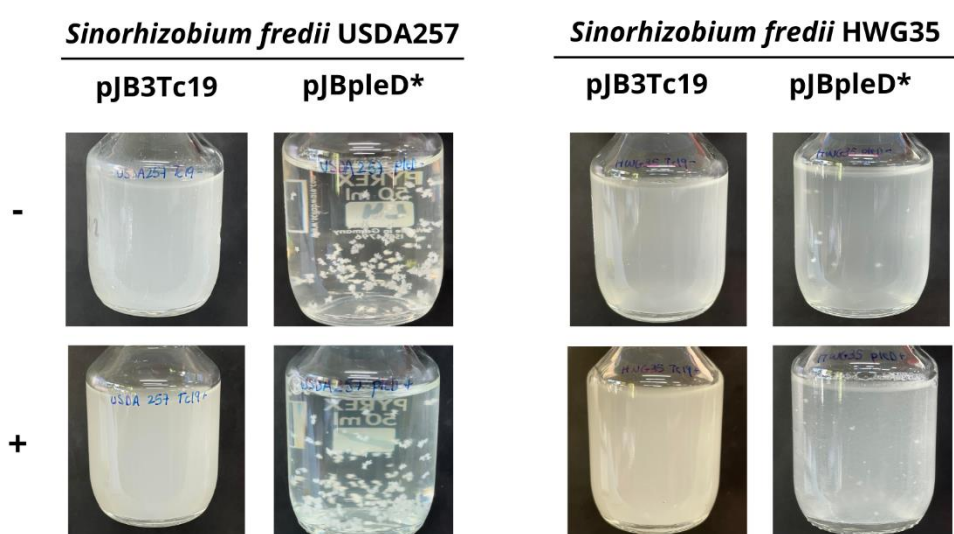


Figura 6. Crecimiento de las estirpes en 50 mL de YM de bacterias portadoras del plásmido pJBpleD*o el vector vacío pJB3Tc19 crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína. Las imágenes se tomaron tras 72h de crecimiento a 28°C en agitación a 180 r.p.m.

5.2. Efecto de la alteración de concentración de di-GMP-c sobre la secreción de proteínas

Se estudiaron y compararon los perfiles de proteínas extracelulares de USDA257 y HWG35 tanto de aquellas estirpes que presentan *pleD** sobreexpresado (pJB*pleD**) como las que no (pJB3Tc19), tras la inducción con el flavonoide genisteína. En la figura 7 se observa el perfil de proteínas extracelulares de HWG35 (A) y USDA257 (B) obtenido tras la tinción con plata de un gel de poliacrilamida. Se realizaron varias réplicas, mostrándose aquellas más representativas.

Además, se usó *S. fredii* HH103 como control para estudiar qué proteínas son las secretadas en cada caso. Se sabe que este rizobio secreta al menos 8 Nops a través del T3SS en respuesta a genisteína: NopA (~7 kDa), NopB (~21 kDa), NopC (~11 kDa), NopD (~180 kDa), NopL (~37 kDa), NopM (~60 kDa), NopP (~32 kDa), and NopX (~60 kDa) (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017).

En USDA257 se puede observar la presencia de un mayor número de bandas en condiciones de alta concentración de di-GMP-c y presencia de genisteína (Figura 7). Estas coinciden con bandas que también aparecen en el control (*S. fredii* HH103) por lo que se podría deducir por similitud qué proteínas son las secretadas bajo estas condiciones.

En HWG35 también se aprecian diferencias si se compara la secreción de proteínas cuando la diguanilato ciclasa está expresada constitutivamente o existen concentraciones fisiológicas de di-GMP-c (Figura 7). En muchos de los casos lo que se observa es una disminución en la intensidad de la banda a altas concentraciones de di-GMP-c, como la que se encuentra en ~48 kDa.

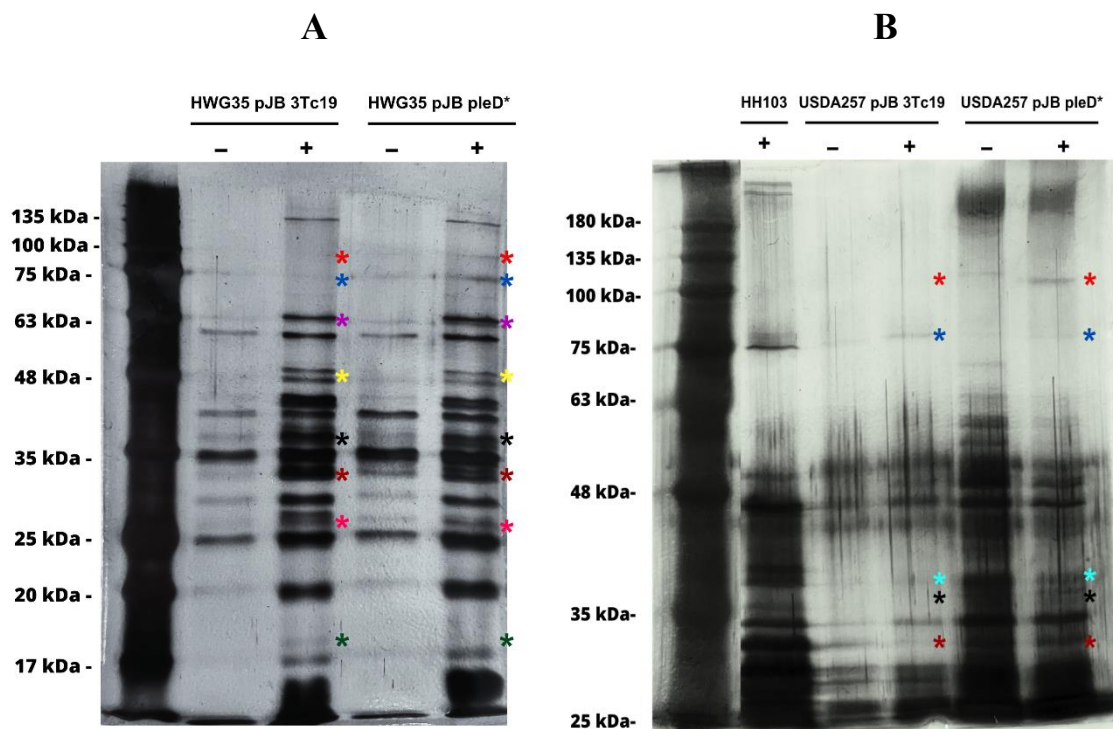


Figura 7. Perfil de las proteínas extracelulares procedentes de cultivos de las estirpes HWG35 (pJB3Tc19 y pJBpleD*) (A) y USDA257 (pJB3Tc19 y pJBpleD*) (B) crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Las masas moleculares (kDa) del marcador (Bio-Rad, EEUU) indicadas a la izquierda se usaron para inferir las masas moleculares de las proteínas cuya secreción depende de la concentración de di-GMP-c, marcadas con un asterisco.

5.3. Análisis por *q*PCR de la expresión de genes en presencia de di-GMP-c

Se realizaron ensayos de *q*PCR para determinar la expresión relativa de distintos genes en respuesta a altos niveles de di-GMP-c, así como para analizar la expresión de los mismos en presencia del flavonoide genisteína. Los genes que se han usado son los siguientes: *nodA* como control de la nodulación ya que se conoce que su expresión es mayor en presencia de genisteína, *tssA* para estudiar la actividad del T6SS, *tssI* para estudiar la actividad del T3SS y por último genes que codifican para algunos efectores secretados a través del T3SS (*nopM*, *nopL* y *nopI*). Además, se utilizó el gen *16S* como control. Para USDA257 únicamente se hizo una réplica y para HWG35 se realizaron dos réplicas, mostrando solo una de ellas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Expresión relativa de diferentes genes en condiciones de privacidad (pJB3Tc19) o abundancia (pJBpleD*) de di-GMP-c y en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína obtenidos mediante qPCR. El gen *16S* se usó como control.

	<i>S. fredii</i> USDA257				<i>S. fredii</i> HWG35			
	pJB3Tc19		pJBpleD*		pJB3Tc19		pJBpleD*	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>nodA</i>	1 ± 0,02	661,68 ± 85,32	1,42 ± 0,23	391,62 ± 20,92	1 ± 0,48	0,43 ± 0,03	0,46 ± 0,10	452,98 ± 108,90
<i>tssA</i>	1 ± 0,17	7,37 ± 0,56	4,89 ± 0,89	2,96 ± 0,32	1 ± 0,35	84,74 ± 0,01	549,39 ± 313,27	1076,15 ± 304,14
<i>ttsI</i>	1 ± 0,23	108,63 ± 14,14	12,04 ± 2,57	291,36 ± 15,32	1 ± 0,56	0,09 ± 0,03	0,26 ± 0,06	133,2 ± 32,49
<i>nopM</i>	1 ± 0,05	11,47 ± 1,05	3,34 ± 1,40	2,00 ± 1,13	1 ± 0,71	0,15 ± 0,02	3,97 ± 0,91	125,65 ± 82,12
<i>nopL</i>	1 ± 0,02	34,45 ± 3,74	31,77 ± 2,63	343,30 ± 23,92	1 ± 0,35	0,37 ± 0,06	0,8 ± 0,18	73,09 ± 25,15
<i>nopI</i>	1 ± 0,24	100,42 ± 7,48	158,68 ± 20,63	1509,65 ± 91,23	1 ± 0,35	0,06 ± 0,009	0,77 ± 0,25	73,43 ± 15,36

En **USDA257** los resultados obtenidos mostraron que tanto el gen *ttsI*, como *nopL* y *nopI* presentan una expresión relativa mayor a altas concentraciones de di-GMP-c, y que esta expresión es mucho mayor en presencia además de genisteína (Tabla 4). Por el contrario, el gen *tssA*, *nodA* y *nopM* tiene una menor expresión relativa a altas concentraciones de di-GMP-c y presencia de genisteína. En el caso del gen *ttsI*, en presencia de genisteína, la expresión en abundancia de di-GMP-c es el doble que en condiciones fisiológicas. Para *nopL* y *nopI* esta expresión es 10 veces mayor.

En **HWG35** se observó que todos los genes estudiados presentaban una expresión relativa mayor a altas concentraciones de di-GMP-c y en presencia del flavonoide genisteína. Siendo el gen *tssA* el que mayor expresión relativa tiene respecto al resto (Tabla 4).

6. Discusión

El di-GMP-c es un segundo mensajero con un papel importante en la transición entre un estilo de vida móvil y sésil en bacterias patógenas (Hengge, 2009), al favorecer la formación de biopelículas regulando la síntesis de exopolisacáridos (McCarthy *et al.*, 2017). El papel de este segundo mensajero en la activación de genes relacionados con los sistemas de secreción bacterianos ha sido estudiado en *Pseudomonas aeruginosa*, donde altas concentraciones de di-GMP-c activan genes relacionados con T6SS e inhiben genes

relacionados con el T3SS (Moscoso *et al.*, 2011), pero su papel no ha sido estudiado en rizobios, donde también podría existir esa relación.

Para estudiar cómo afecta el di-GMP-c en la secreción de proteínas se ha llevado a cabo un incremento de los niveles intracelulares de este segundo mensajero a través de la sobreexpresión de la diguanilato ciclasa PleD* mediante el plásmido pJBpleD* en *S. fredii* USDA257 y *S. fredii* HWG35.

La sobreexpresión de PleD* produjo un incremento en la producción de exopolisacáridos, un cambio en la **morfología de las bacterias** (Figura 4) y un aumento en la presencia de flóculos (Figura 5). Las estirpes analizadas mostraron un fenotipo CR+ y CF+ al sobreexpresar PleD*. Aunque la genisteína disminuya la producción de polisacáridos, el di-GMP-c tiene un mayor efecto sobre la síntesis de estos. Estos fenotipos han sido similares a los que se han observado en otras bacterias cuando se sobreexpresa una diguanilato ciclasa (Barnhart *et al.*, 2013; Simm *et al.*, 2004).

Al estudiar el efecto de la alteración de la concentración de di-GMP-c sobre **la secreción de proteínas** se comprueba que existen diferencias entre la estirpe que presenta el vector vacío (pJB3Tc19) y la que se encuentra con el plásmido con el gen *pleD** (pJBpleD*) (Figura 7). Se utilizó a *S. fredii* HH103 como control, ya que se conoce que este secreta al menos 8 Nops a través del T3SS en respuesta a genisteína: NopA (~7 kDa), NopB (~21 kDa), NopC (~11 kDa), NopD (~180 kDa), NopL (~37 kDa), NopM (~60 kDa), NopP (~32 kDa), and NopX (~60 kDa) (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017).

De manera general se puede observar que en condiciones de alta concentración de di-GMP-c la secreción de proteínas es mayor tanto en ausencia como en presencia del flavonoide.

En **USDA257** (Figura 7B) en presencia de genisteína y alta concentración de di-GMP-c (pJBpleD* +) se distingue en torno a 32 kDa una proteína, que podría tratarse de NopP, esta también se encuentra presente en *S. fredii* HH103 inducido con genisteína. NopP ha sido identificada en USDA257 y *S. fredii* HH103 como efector. La secreción de esta proteína en USDA257 al interior de las raíces de *Vigna unguiculata* se ha confirmado, lo que indica que este Nop puede ser considerado como un efector real (López-Baena *et al.*, 2016).

También se puede distinguir otra proteína en torno a 37 kDa, que de igual manera su secreción es mayor cuando existen altos niveles de di-GMP-c y en presencia de genisteína, pudiéndose tratar de NopL. NopL junto a NopP, NopC y NopI son proteínas específicas de rizobios a diferencia de otras Nops que presentan cierta homología a efectores encontrados en diferentes patógenos de plantas y animales (Deakin & Broughton, 2009; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017).

Además, en estas mismas condiciones se han podido diferenciar otras proteínas que en condiciones fisiológicas de diguanilato cíclico no estaban presentes, una de en torno a ~40 kDa y otra de ~110 kDa, pero que no han podido ser comparadas con ningún efector putativo presente en *S. fredii* HH103.

Por el contrario, en torno a 75 kDa nos encontramos una proteína que cuando existen condiciones fisiológicas de di-GMP-c está presente pero que cuando la concentración de este aumenta deja de ser secretada, la cual tampoco ha podido ser identificada.

En cuanto a **HWG35** (Figura 7A) en condiciones fisiológicas de di-GMP-c aparece una banda mucho más intensa de ~27 kDa que podría tratarse de NopI, este se trata de un efector en *S. fredii* HH103 (López-Baena *et al.*, 2016), por lo que lo podría ser también en HWG35. Se comprobó que la mutación del gen *nopI* no afectaba a la secreción de Nops por el T3SS lo que sugiere que no es un componente esencial en la maquinaria del T3SS (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017).

De igual manera, en torno a 32 kDa se observa una banda más intensa a concentraciones fisiológicas de di-GMP-c que se puede relacionar con NopP, que como se ha mencionado con anterioridad, se considera un efector real en *S. fredii* USDA257 y *S. fredii* HH103 y que en este caso su secreción se ve afectada negativamente en presencia de altas concentraciones de diguanilato cíclico. También se ha observado una banda de ~18 kDa y otra de ~48 kDa que no han podido ser identificadas.

Además, se puede distinguir una banda presente en ambas condiciones (pJB3Tc19 + y pJBpleD* +) de ~37 kDa, coincidiendo con NopL, este es un efector putativo tanto en *S. fredii* HH103 como *S. fredii* USDA257 (López-Baena *et al.*, 2016), pudiendo ser también de *S. fredii* HWG35.

Por último, en torno a 65 kDa se observa una banda cuando nos encontramos la diguanilato ciclasa PleD* expresada constitutivamente que podría tratarse de NopM, esta

se considera un efector putativo de *S. fredii* HH103 (Rodrigues *et al.*, 2007). Además, se observa una banda de ~75 kDa y otra de ~100 kDa que no se han logrado identificar.

Por otra parte, se estudió la **expresión de distintos genes** que codifican para componentes del T6SS (*tssA*), del T3SS (*tssI*) o para efectores secretados a través del T3SS (*nopM*, *nopL*, *nopI*) en presencia o ausencia del flavonoide genisteína y con combinaciones de altos niveles de di-GMP-c o niveles fisiológicos a través de ensayos de *qPCR*.

En **USDA257** se observó que la expresión del gen *tssI* es mucho mayor cuando la DGC PleD* se encuentra expresada constitutivamente y en presencia de genisteína (Tabla 4). La síntesis y secreción de Nops está controlada por el regulador transcripcional TtsI cuya expresión está inducida por NodD y flavonoides (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2020) y esto aquí se puede corroborar.

Además, se observó que la expresión del gen *nopL* es mucho mayor a altas concentraciones de di-GMP-c (Tabla 4), lo que puede corroborar la secreción de la proteína NopL que se observa en el perfil de proteínas extracelulares. Esta expresión es 10 veces mayor cuando nos encontramos la DGC PleD* expresada constitutivamente. En cuanto a *nopI* su expresión relativa también es mucho mayor a altas concentraciones de di-GMP-c y en presencia de genisteína (Tabla 4), siendo esta expresión 15 veces mayor en comparación con condiciones fisiológicas de di-GMP-c y en presencia de genisteína. Por último, *nopM* presenta una expresión relativa menor en presencia del flavonoide y a altas concentraciones de di-GMP-c, además, la proteína NopM no ha sido identificada en el perfil de proteínas extracelulares.

En cuanto al gen *tssA* este presenta una expresión relativa menor en abundancia de di-GMP-c (Tabla 4), lo que podría indicar que la actividad del T6SS se está viendo reducida; a diferencia de el gen *tssI* que tiene una mayor expresión lo que indicaría una mayor actividad del T3SS. En este caso se puede comprobar que existe una regulación inversa en cuanto a la actividad de los sistemas de secreción y la concentración de di-GMP-c, pero de manera contraria a lo que ocurría en *P. aeruginosa*, donde altas concentraciones de este segundo mensajero activaban genes relacionados con el T6SS e inhibían aquellos relacionados con el T3SS (Moscoso *et al.*, 2011). Pero esto no se puede confirmar con seguridad, para ello se necesitaría un estudio más profundo.

En **HWG35** la expresión relativa de *nopM* es mayor a altas concentraciones de diguanilato cíclico (Tabla 4), lo que apoya la secreción del efector putativo NopM observado en el perfil de proteínas extracelulares.

Según el análisis por *qPCR* la expresión relativa del gen *nopI* es mayor en presencia de genisteína y a altas concentraciones de di-GMP-c. Si se compara la expresión de este gen a altas concentraciones de di-GMP-c y en presencia o ausencia de genisteína se observa una expresión casi 100 veces mayor en presencia del flavonoide, esto se debe a que la activación del gen *nopI* en HWG35 depende de flavonoides, al igual que ocurre en *S. fredii* HH103 (Jiménez Guerrero, 2015).

Por otro lado, la expresión relativa del gen *nopL* también es mayor a altas concentraciones de di-GMP-c y en presencia de genisteína. La proteína NopL se puede distinguir en el perfil de proteínas extracelulares tanto en condiciones fisiológicas del segundo mensajero como a altas concentraciones de este.

En este caso tanto la expresión de *tssA* como de *tssI* es mayor cuando la DGC PleD* está expresada constitutivamente, aunque en el caso de *tssA* es mucho mayor. La expresión de *tssA* nos hace indicar que *S. fredii* HWG35 además de poseer T3SS presenta un T6SS funcional.

7. Conclusiones

1. La alta concentración de di-GMP-c influye positivamente en la producción de polisacáridos en las dos estirpes de estudio, presentando fenotipo agregativo en ambos casos.
2. La concentración de di-GMP-c afecta a la secreción de proteínas en las cepas de estudio tanto positiva como negativamente.
3. La expresión de algunos efectores es mayor en presencia del flavonoide genisteína en combinación de altos niveles de di-GMP-c.
4. *Sinorhizobium fredii* HWG35 presenta al menos un T3SS y un T6SS funcional que están regulados por di-GMP-c.

8. Agradecimientos

Para comenzar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a todo el personal del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla por acogerme con los brazos abiertos y brindarme todos los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo, haciendo una mención especial a mi tutor Carlos Medina Morillas el que me ha guiado a través de este camino tan bonito llamado ciencia. Además, darle las gracias a Francisco Fuentes Romero y Diego García Rodríguez por sus consejos y su ayuda a lo largo de mi estancia en el departamento. Por último, agradecer al Dr. Daniel Pérez Mendoza, investigador de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), de la Universidad de Granada por proporcionarme las estirpes utilizadas en este trabajo.

9. Bibliografía

- Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.-C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.-E., Rodríguez-Carvajal, M.-A., & Vinardell, J.-M. (2016). Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One*, *11*(8), e0160499.
- Aksyuk, A. A., Leiman, P. G., Kurochkina, L. P., Shneider, M. M., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., & Rossmann, M. G. (2009). The tail sheath structure of bacteriophage T4: A molecular machine for infecting bacteria. *The EMBO Journal*, *28*(7), 821-829.
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P., & Jenal, U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*, *47*(6), 1695-1708.
- Ausmees, N., Kobayashi, H., Deakin, W. J., Marie, C., Krishnan, H. B., Broughton, W. J., & Perret, X. (2004). Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, *186*(14), 4774-4780.
- Barnhart, D. M., Su, S., Baccaro, B. E., Banta, L. M., & Farrand, S. K. (2013). CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *Caulobacter*, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and environmental microbiology*, *79*(23), 7188-7202.
- Bec-Ferte, M.-P., Krishnan, H. B., Prome, D., Savagnac, A., Pueppke, S. G., & Prome, J.-C. (1994). Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. *Biochemistry*, *33*(39), 11782-11788.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, *84*(1), 188-198.

- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., & Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 370-379.
- Cooper, J. E. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in botanical research* (Vol. 41, pp. 1-62). Elsevier.
- Deakin, W. J., & Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: Rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 312-320.
- Dowdle, S. F., & Bohlool, B. B. (1985). Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(5), 1171-1176.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 263-273.
- Ho, B. T., Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*, 15(1), 9-21.
- Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics*, 40, 385-407.
- Jiménez Guerrero, I. (2015). *Implicación del sistema de secreción de tipo 3 de Sinorhizobium (Ensifer) fredii HH103 en la modulación de la respuesta de defensa de Glycine max cv. Williams y estudio de los efectores específicos secretados a través de este sistema* [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla].
- Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Medina, C., Ollero, F. J., Alias-Villegas, C., Vinardell, J. M., Pérez-Montaña, F., & López-Baena, F. J. (2020). The *Sinorhizobium fredii* HH103 type III secretion system effector NopC blocks nodulation with *Lotus japonicus* Gifu. *Journal of Experimental Botany*, 71(19), 6043-6056.
- Jiménez-Guerrero, I., Medina, C., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., & López-Baena, F. J. (2022). The Rhizobial Type 3 Secretion System: The Dr. Jekyll and Mr. Hyde in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11089.
- Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaña, F., Medina, C., Ollero, F. J., & López-Baena, F. J. (2017). The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 nodulation outer protein NopI is a determinant for efficient nodulation of soybean and cowpea plants. *Applied and environmental microbiology*, 83(5), e02770-16.
- Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Hu, T. S., & Weber, D. F. (1982). Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, 215(4540), 1631-1632.

- Krishnan, H. B. (2002). NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. *Journal of bacteriology*, 184(3), 831-839.
- Krishnan, H. B., Lorio, J., Kim, W. S., Jiang, G., Kim, K. Y., DeBoer, M., & Pueppke, S. G. (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(7), 617-625.
- Leigh, J. A., Signer, E. R., & Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(18), 6231-6235.
- 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.
- López-Baena, F. J., Vinardell, J. M., & Medina, C. (2019). Regulation of protein secretion systems mediated by cyclic diguanylate in plant-interacting bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1289.
- Lorio, J. C., Kim, W. S., & Krishnan, H. B. (2004). NopB, a soybean cultivar-specificity protein from *Sinorhizobium fredii* USDA257, is a type III secreted protein. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(11), 1259-1268.
- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcińska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., Perret, X., & Broughton, W. J. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 743-751.
- McCarthy, R. R., Valentini, M., & Filloux, A. (2017). Contribution of Cyclic di-GMP in the Control of Type III and Type VI Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols*, 213-224.
- Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling: Protein secretion and c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3128-3138.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes & development*, 18(6), 715-727.
- Perez-Mendoza, D., Aragon, I. M., Prada-Ramirez, H. A., Romero-Jimenez, L., Ramos, C., Gallegos, M.-T., & Sanjuan, J. (2014). Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PloS one*, 9(3), e91645.

- Pérez-Mendoza, D., Rodríguez-Carvajal, M. Á., Romero-Jiménez, L., Farias, G. de A., Lloret, J., Gallegos, M. T., & Sanjuán, J. (2015). Novel mixed-linkage β -glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(7), E757-E765.
- Rodríguez, J. A., Lopez-Baena, F. J., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Espuny, M. del R., Bellogín, R. A., Ruiz-Sainz, J. E., Thomas, J. R., Sumpton, D., & Ault, J. (2007). NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: Identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *Journal of proteome research*, *6*(3), 1029-1037.
- Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez, J. A., Soria-Díaz, M. E., Tejero-Mateo, P., Buendía-Clavería, A., Gutiérrez, R., Ruiz-Sainz, J. E., Thomas-Oates, J., & Gil-Serrano, A. M. (2005). Structural analysis of the capsular polysaccharide from *Sinorhizobium fredii* HWG35. *Biomacromolecules*, *6*(3), 1448-1456.
- Romero Jiménez, L. (2016). *Importancia del segundo mensajero c-di-GMP en la simbiosis rizobio-leguminosa* [Tesis de doctorado, Estación Experimental del Zaidín].
- Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaefer, V., Hilker, R., Søgaard-Andersen, L., & Becker, A. (2016). Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, *198*(3), 521-535.
- Schirmer, T., & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(10), 724-735.
- Schuldes, J., Rodríguez Orbegoso, M., Schmeisser, C., Krishnan, H. B., Daniel, R., & Streit, W. R. (2012). Complete genome sequence of the broad-host-range strain *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Journal of Bacteriology*, *194*(14), 4483-4483.
- Shanahan, C. A., & Strobel, S. A. (2012). The bacterial second messenger c-di-GMP: Probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. *Organic & biomolecular chemistry*, *10*(46), 9113-9129.
- 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.
- Soto, M., Nogales, J., Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.-T., Olivares, J., & Sanjuán, J. (2011). Pathogenic and mutualistic plant-bacteria interactions: Ever increasing similarities. *Open Life Sciences*, *6*(6), 911-917.
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoun, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., & Weinhouse, H. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of bacteriology*, *180*(17), 4416-4425.

- Thomas-Oates, J., Bereszcak, J., Edwards, E., Gill, A., Noreen, S., Zhou, J. C., Chen, M. Z., Miao, L. H., Xie, F. L., & Yang, J. K. (2003). A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. *Systematic and applied microbiology*, 26(3), 453-465.
- Vinardell, J.-M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Goettfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., & Jaenicke, S. (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: A comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(7), 811-824.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.
- Yang, S. S., Bellogín, R. A., Buendía, A., Camacho, M., Chen, M., Cubo, T., Daza, A., Diaz, C. L., Espuny, M. R., & Gutiérrez, R. (2001). Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), 243-255.
- Yuan, X., Khokhani, D., Wu, X., Yang, F., Biener, G., Koestler, B. J., Raicu, V., He, C., Waters, C. M., & Sundin, G. W. (2015). Cross-talk between a regulatory small RNA, cyclic-di-GMP signalling and flagellar regulator FlhDC for virulence and bacterial behaviours. *Environmental microbiology*, 17(11), 4745-4763.
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., & Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1664-1673.