



## CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO VI EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Pacheco, Alba; Marchesini, Giuseppina; Durán, David

Tutor: Rey, Luis

Departamento de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid  
alba.pacheco.moreno@alumnos.upm.es, g.marchesini@alumnos.upm.es, david.duran.wendt@upm.es

### RESUMEN

El análisis de los genomas de cepas de *Bradyrhizobium* sp. aisladas de *Lupinus mariae-josephae*, *L. angustifolius* y *Retama sphaerocarpa*, así como de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Mimosa affinis* y *Phaseolus vulgaris*, ha permitido identificar la presencia de sistemas de secreción tipo VI de proteínas (T6SS). Los T6SS están implicados en la interacción planta-bacteria mediante el transporte de proteínas efectoras al citoplasma de células vegetales a través de una estructura similar a una nanojeringa de bacteriófago. El análisis se centra en las cepas *Bradyrhizobium* sp. ISLU101, aislada de *L. angustifolius* y *Rhizobium etli* Mim1 aislada de *M. affinis*, capaz de nodular judías. Mim1 e ISLU101 contienen uno y dos T6SS, respectivamente. Una característica distintiva de los T6SS activos es que las proteínas Hcp y VgrG, que forman parte de la nanojeringa, pueden secretarse al medio extracelular; así para determinar cuando son activos los T6SS identificados, se están realizando inmunoensayos.

**Palabras clave:** Sistema de secreción tipo VI, nanojeringa, interacción rizobio-leguminosa, efector.

### INTRODUCCIÓN

La familia *Leguminosae* es la mayor familia de plantas reconocida. Cuenta con más de 20.000 especies agrupadas en unos 750 géneros, se encuentra dentro del orden Rosales y su fruto característico es la legumbre. Existen tres subfamilias: *Papilionoideae*, *Cesalpinoideae* y *Mimosoideae*. Las leguminosas poseen gran interés y son conocidas y utilizadas en alimentación humana y animal desde la Antigüedad. También tienen usos ornamentales, en regeneración de suelos o en la industria maderera. La importancia de esta familia radica en su capacidad para establecer simbiosis con unas bacterias del suelo denominadas rizobios.

Los rizobios habitan en el suelo alrededor de las raíces de las plantas o rizosfera. Estas bacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, haciéndolo asimilable para la planta, a cambio de una parte de los fotoasimilados (azúcares) elaborados por la leguminosa. El proceso de fijación de nitrógeno se lleva a cabo en unas estructuras especializadas de las raíces de la leguminosa denominadas nódulos.

La fijación biológica de nitrógeno supone un importante aporte a los suelos agrícolas de este elemento, indispensable para los cultivos, así como una disminución en la adición de fertilizantes nitrogenados los cuales acarrearán múltiples consecuencias medioambientales. Los sistemas de secreción de proteínas bacterianas que poseen los rizobios son uno de varios mecanismos que pueden afectar a la interacción con la leguminosa (Deakin y Broughton, 2009). Gracias a ellos, los rizobios son capaces de inyectar en la célula vegetal proteínas (efectores) que la planta puede reconocer.

Se ha descrito una respuesta variada a los efectores dependiendo de quienes son los actores en la simbiosis rizobio-leguminosa. En algunos casos los efectores facilitan la entrada de la bacteria al interior de las raíces de la leguminosa al ser suprimida la reacción de defensa de la planta, en otros impiden la simbiosis efectiva o no tienen efecto.

En este trabajo se presenta el análisis de sistemas de secreción tipo VI identificados en diferentes rizobios.



## MATERIAL Y MÉTODOS Cepas y plásmidos utilizados

- Cepas
  - *Escherichia coli* DH5 $\alpha$
  - *E. coli* BL21(DE3)
  - *Bradyrhizobium* sp. ISLU101
  - *Rhizobium etli* Mim1
- Plásmidos
  - pCR2.1 TOPO
  - pT7-7

### Crecimiento de plantas y microorganismos

Las semillas se desinfectaron con lejía al 25% tras incubarse un minuto en etanol. En el caso de *Lupinus mariae-josephae* y *Retama sphaerocarpa* a continuación se les realizó un corte en la cubierta para facilitar su germinación. Tras lavarse con abundante agua, posteriormente se crecieron en invernadero en hidroponía con solución Leonard y en condiciones bacteriológicamente controladas.

Los cultivos microbianos de rizobio se incubaron a 28°C en medio YMB (Yeast Mannitol Broth), TY (Tryptone Yeast) y medio mínimo. Los cultivos microbianos de las cepas de *E. coli* se incubaron en medio LB (Luria-Bertani) con el antibiótico apropiado a cada caso, si procedía.

### Expresión en *E. coli* de la proteína Hcp de *R. etli* Mim1 y *B. sp.* ISLU101

Mediante PCR con oligonucleótidos especialmente diseñados se amplificó una variación del gen *hcp* capaz de codificar una extensión peptídica (Streptag) en el extremo C-t. Este gen se clonó en el vector comercial pCR2.1 TOPO y se realizó una transformación (Sambrook y Russell, 2001) en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez seleccionadas las cepas con el inserto adecuado, se extrajo el ADN plasmídico mediante Miniprep (Sambrook y Russell, 2001) para su posterior clonaje definitivo en el vector pT7-7. Dicho vector se transformó *E. coli* BL21 (DE3) donde se indujo la expresión de la proteína en presencia de IPTG.

### Análisis bioinformático

La identificación de varios sistemas de secreción en los genomas de las bacterias estudiadas se realizó mediante análisis BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) a partir de secuencias reconocidas como pertenecientes a T6SS de varios rizobios de bases de datos. El alineamiento de las proteínas Hcp de varios rizobios se obtuvo con el programa MULTALIN.

### Realización de inmunoensayos (Western Blot)

La proteína Hcp con la cola Strep expresada en *E. coli* se identificó con anticuerpos específicos antiStrep y con anticuerpos anti Hcp de *Agrobacterium tumefaciens* C58 cedidos por la Dra Erh Min Lai (Wu et al., 2008; Wu et al.2012). Para ello se realizaron geles de SDS-PAGE que se transfirieron a una membrana de Inmobilon-P. La membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes según protocolos estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de T6SS se identificaron tras un análisis de tipo BLAST que permitió alinear la parte del genoma de las cepas estudiadas con la agrupación génica que codifica para un T6SS en *B. japonicum* USDA110.

**Tabla 1. Rizobios que presentan sistemas de secreción tipo VI (T6SS).**

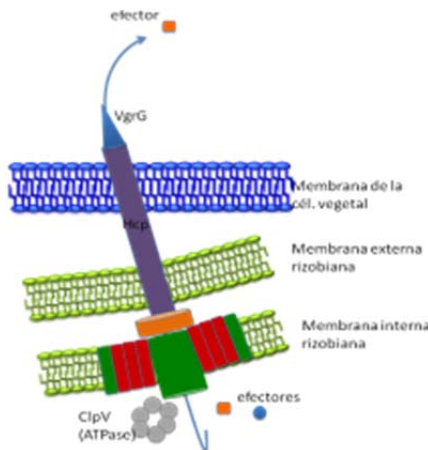
Rizobio	<i>B. sp.</i> LmjM3	<i>B. sp.</i> ISLU101	<i>B. sp.</i> Rst89 y RSB6	<i>R. etli</i> Mim1
Leguminosa hospedadora	<i>L. mariae-josephae</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>R. sphaerocarpa</i>	<i>Mimosa affinis</i> / <i>Phaseolus vulgaris</i>

En la Tabla 1 se muestran los rizobios que presentan T6SS y las plantas a las que nodulan.



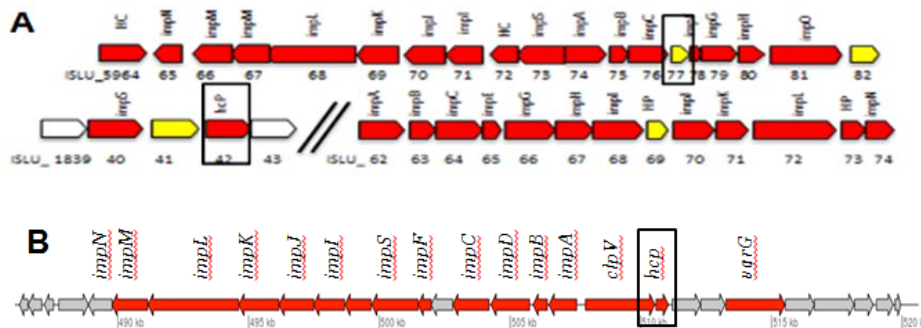
La estructura de un T6SS se muestra en la Figura 1. La organización de los genes que codifican para los dos T6SS identificados en la cepa ISLU101 y el de la cepa Mim1 se indican en la Figura 2. En todas las agrupaciones se encuentran el gen que codifica para la proteína Hcp, señalado en la Figura 2. Este gen codifica una proteína que es parte integrante de la estructura que forma la nanojeringa y que se encuentra extracelularmente cuando el T6SS es activo (Fig. 1) (Silverman et al., 2012; Ma et al., 2014).

**Figura 1. Posible estructura y funcionamiento de un T6SS en simbiosis.**



El análisis de la proteína Hcp de las diferentes bacterias ha mostrado que existen importantes diferencias respecto al grado de identidad de aminoácidos. Estos datos se recogen en la Tabla 2 e indican un alto grado de identidad entre Hcp de Mim1 y *Agrobacterium* (94%). Esto nos indujo a utilizar los anticuerpos desarrollados contra Hcp de *Agrobacterium* (ver Fig. 3). Tras demostrar que eran efectivos contra Hcp de la cepa Mim1 expresado en *E. coli*, se realizó un análisis de la expresión de Hcp en la cepa Mim1 crecida en un medio rico como YMB después de haber crecido durante tres días por lo que el cultivo estaba en fase estacionaria.

**Figura 2. Organización génica de T6SS. En rojo se colorean los genes conservados en todas las agrupaciones que codifican para los T6SS. Con un recuadro se destaca el gen *hcp*. A En la cepa *B. sp.* ISLU101. B En la cepa *R. etli* mim1.**

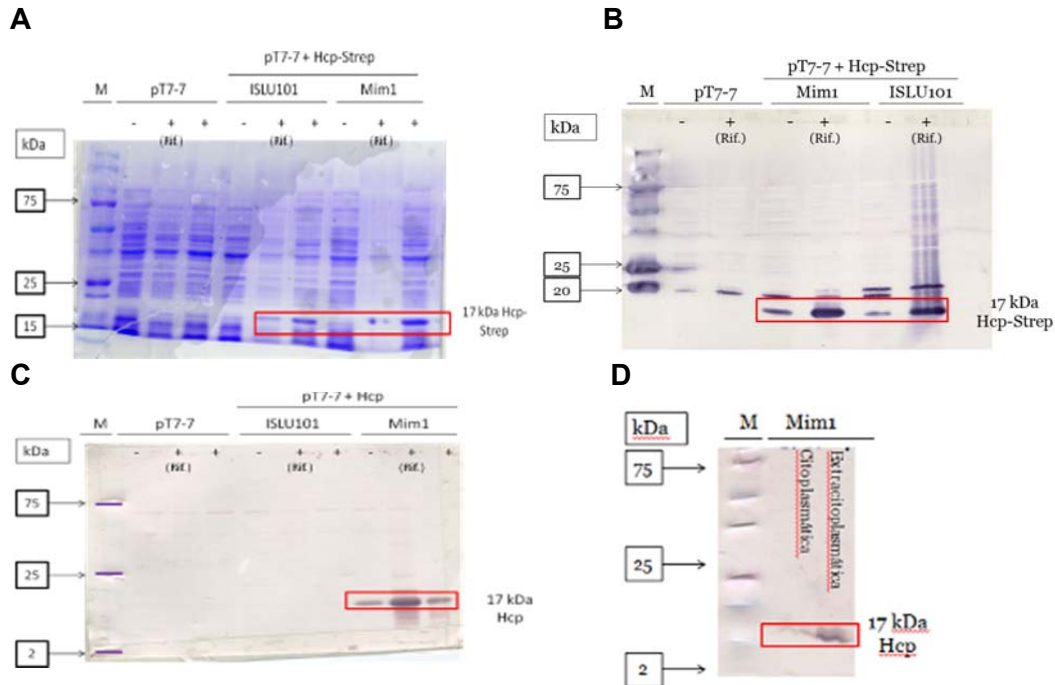


**Tabla 2. Porcentaje de identidad aminoacídica entre varias proteínas Hcp.**

% de identidad	Hcp101.1	Hcp101.2	HcpMim1	HcpAgrobac	HcpUSDA110
Hcp_ISLU101.1	100%	23%	22%	22%	99%
Hcp_ISLU101.2	23%	100%	24%	24%	23%
Hcp_Mim1	22%	24%	100%	94%	22%
Hcp_Agrobac.	22%	24%	94%	100%	22%
Hcp_USDA110	99%	23%	22%	22%	100%



**Figura 3. Identificación de la proteína Hcp de los genes correspondientes de las cepas ISLU 101 y Mim 1. A** Expresión de Hcp-Strep en *E. coli* mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. **B** Inmunoblot de un gel como A con anticuerpos anti colas Strep. **C** Idem a B pero con anticuerpos anti Hcp de *Agrobacterium*. **D** Inmunoblot con anticuerpos antiHcp y con muestras de la cepa Mim1.



## CONCLUSIONES

Los anticuerpos antiHcp de *Agrobacterium* reconocen Hcp de la cepa Mim1.  
El T6SS de la cepa Mim1 se expresa en vida libre en fase estacionaria y medio YMB.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Luis Rey por su apoyo y ayuda imprescindibles. A David Durán por su gran capacidad de resolución. A Ana Isabel Bautista por su excelente asistencia técnica. A la Dra. Erh Min Lai del Institute of plant and microbial biology (Taiwan) por cedernos anticuerpos de *Agrobacterium* anti-Hcp. Este trabajo ha sido financiado en parte por la UPM-Actividades con Latinoamérica-México-Perú AL15- PID-37.

## BIBLIOGRAFÍA

- Deakin WJ and Broughton WJ. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* 7, 312-320
- Ma LS, Hachani A, Lin JS, Filloux A and Lai EM. 2014. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*. 16: 94-104.
- Sambrook and Russell. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2001. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Vol. 1: 105 – 111.
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E and Mougous JD. 2012. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol*. 66: 453-72.
- Wu CF, Lin JS, Shaw GC and Lai EM. 2012. Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog*. 8: 1-18.
- Wu HY, Chung PC, Shih HW, Wen SR and Lai EM. 2008. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 190: 2841-50.