

# **JORNADAS DE SEMINARIOS INSTITUCIONALES 2018**



**Director: Dr. Antonio Lagares**

**Vicedirector: Dr. Víctor Romanowski**

Estimados,

Los que este año organizaron nuestro ya clásico encuentro académico de fin de año, me pidieron que escriba unas líneas a modo de “prólogo” para encabezar el libro que condensa el trabajo anual de los más jóvenes del Instituto. Mi padre siempre me dice que cuando se escribe un prólogo, el mismo debe necesariamente ser breve. Textos largos atentan contra la debida atención a las hojas que le siguen.

Estamos viviendo tiempos complejos con problemas que desde luego invaden nuestro trabajo. Trabajamos con ese peso, y bajo esa realidad. Entiendo que cualquier buen observador sienta preocupación, y en muchos casos también angustia. Aunque somos un conjunto con pensamientos muy diversos, los sentimientos anteriores nos incluyen a todos en una vivencia común. Vivencia que no deja de ser también un desafío tanto para los que tenemos las mayores responsabilidades de gestión, como para los más jóvenes que hacen el trabajo de base. En crisis como las que estamos pasando no es fácil tener la fortaleza para trabajar por salidas justas sin claudicar, disfrutando a la vez el trabajo de todos los días. Todas estas cosas no se me escapan, y sé que de alguna manera nos rozan a todos.

Para trabajar con expectativas en un contexto como el anterior no tengo recetas. Sin embargo, estoy convencido que la única salida es la de esforzarse para tratar de cambiar el contexto (hay múltiples formas), mientras al mismo tiempo –y a pesar de los problemas- se intenta preservar espacios diarios de trabajo que en muchos casos son mágicos. Está en todos nosotros la aparentemente extraña capacidad para convivir con la dificultad, y a la vez con el trabajo que elegimos por vocación. Luchar para cambiar la coyuntura y al mismo tiempo disfrutar no es una disociación, es mirar la realidad con más plenitud. Ya se ha dicho que “no es cierto que la felicidad signifique una vida sin problemas. La vida feliz significa superar los problemas, luchar con los problemas, resolver las dificultades” (Z. Bauman). Y agrego: cuando existe un sentido. Adhiero plenamente a esas ideas que, a mi edad, las descubro con un significado pleno. No me parece natural transitar siempre dificultades. Pero es cierto que en los escollos encontramos fuerza para el cambio, y también plenitud cuando los logros se hacen visibles.

No tengo a todos cerca de mí en la cotidianeidad, pero más allá del lugar que ocupen, en qué mesada trabajen, o quienes sean sus directores, aspiro a que cada uno pueda tener su propio espacio de pasión. Más aun cuando las cosas son difíciles. Aspiro a que cada uno, en la intimidad de su trabajo, pueda dar rienda suelta a esas cualidades ancestrales que nos hacen más humanos: la curiosidad, la capacidad de asombro (“hay más cosas en el cielo y en la tierra, Horacio, de las que has soñado en tu filosofía”, le decía Hamlet a su amigo Horacio al ver el fantasma de su padre en el cementerio). Que en estos tres días que nos esperan, sepamos ver que detrás de cada una de las presentaciones que vamos a escuchar hay siempre un proyecto,

expectativas, planes. Que podamos disfrutar de cómo cada uno de nuestros compañeros elaboró la trama de sus intereses y experimentos, cuyos resultados (a modo de historia sin final) aún no conocemos.

con afecto,

Tony

## Lunes 17 de diciembre

09:00	<i>Charla apertura de las Jornadas, a cargo del director del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Dr. Antonio Lagares</i>	
09:30	<i>Manipulación de la red de microtúbulos durante la infección por el virus del mosaico del tabaco. Agüero, Matías Emanuel</i>	p7
09:55	<i>Desarrollo de una plataforma de vectores de expresión derivados de baculovirus para la producción de inmunógenos en sistema de células de mamífero. Amorós Morales, Leslie C.</i>	p8
10:20	<i>Regulación de los ARFs mediada por tasiRNAs y su participación en el desarrollo de órganos laterales en plantas leguminosas. Kirolinko, Cristina</i>	p9
10:40	Intervalo (30')	
11:10	<i>Influencia de factores abióticos en la diversidad rizosférica de bacterias y hongos en vides. Oyuela, Mónica</i>	p10
11:35	<i>Rol de una diguanilato ciclasa de Bordetella en el proceso de infección y formación de biofilm in vivo. Belhart, Keila</i>	p11
12:00	<i>Virosis emergentes en el Cinturón Hortiflorícola Platense, resultados del STAN. Ferrand, Luciana</i>	p12
12:25	<i>Estudio del rol de los sistemas de dos componentes, presentes en el simbiote de alfalfa-Ensifer meliloti, que participan en la respuesta bacteriana al estrés térmico. Vera, Leda Mailén</i>	p13
12:45	Almuerzo (1h 30')	
14:15	<i>Una visión clásica aplicada al mejoramiento de una vacuna contra pertussis, una enfermedad resurgente. Carriquiriborde, Francisco</i>	p14
14:40	<i>Mejoramiento del baculovirus de Anticarsia gemmatilis como agente de control biológico mediante la incorporación de proteínas heterólogas en los cuerpos de oclusión. Fabre, María Laura</i>	-
15:05	<i>Desarrollo de estrategias moleculares para el control de la enfermedad HuangLongBing de los cítricos. Gardella, Victoria</i>	p15
15:30	<i>Nueva presentación de inoculante para soja. Iturralde, Esteban Tomás</i>	p16

## Martes 18 de diciembre

09:00	<i>Nuevos mecanismos moleculares que regulan la transferencia de plásmidos en Rizobios.</i> <b>Castellani, Lucas</b>	p17
09:25	<i>Análisis transcriptómico de un mutante en bvgR de Bordetella bronchiseptica.</i> <b>Gutierrez, María de la Paz</b>	p18
09:50	<i>Respuesta al estrés por Nitrógeno en Bradyrhizobium diazoefficiens.</i> <b>Lamelza, Florencia</b>	p19
10:10	Intervalo (30')	
10:40	<i>Bioinformática.</i> <b>Mancini, Ulises Maximiliano</b>	p20
11:05	<i>Adaptación de la técnica de TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) para la inmunopurificación de proteínas específicas de gránulos citoplasmáticos Processing Bodies (PBs) y Stress Granules (SGs) en etapas tempranas de la interacción simbiótica Medicago truncatula- Ensifer meliloti.</i> <b>Lancia, Marcos</b>	p21
11:30	<i>Composición proteica de los cuerpos de oclusión de Epinotia aporema granulovirus (EpagGV).</i> <b>Masson, Tomas</b>	p22
11:55	<i>Estudio de la proteína FliL en los dos sistemas flagelares de B. diazoefficiens USDA 110.</i> <b>Mengucci, Florencia</b>	p23
12:20	Almuerzo (1h 40')	
14:00	<i>Estrategias adaptativas de Bradyrhizobium diazoefficiens a la vida en el suelo: estudios de los estados natatorio y sésil.</i> <b>López Guerra, Adriana Gabriela</b>	p24
14:25	<i>Vacunación en neonatos, una estrategia posible contra pertussis.</i> <b>Martín Aispuro, Pablo</b>	p25
14:50	<i>Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de Sinorhizobium meliloti en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de Alfalfa.</i> <b>Mogro, Ezequiel G.</b>	p26
15:15	<i>Vectores de transmisión de citrus psorosis virus (CPsV).</i> <b>Simeone, Melina Ailin</b>	p27

## Miércoles 19 de diciembre

09:00	<i>Adaptación del uso de codones en genomas procariotas.</i> <b>López, José Luis</b>	p28
09:25	<i>Producción y manejo de plantas para Ensayos.</i> <b>Mazo, Claudio</b>	p29
09:50	<i>Caracterización funcional de genes involucrados en la interacción simbiótica entre Phaseolus vulgaris y Rhizobium etli.</i> <b>Roda, Carla</b>	p30
10:10	Intervalo (30')	
10:40	<i>Caracterización molecular de una cepa virulenta del virus Junín.</i> <b>Thomas, Pablo D.</b>	p31
11:05	<i>Línea celular de insecto transgénica capaz de procesar el precursor de glicoproteínas arenavirales.</i> <b>Arrias, Paula N.</b>	-
11:30	<i>Caracterización funcional de una diguanilato ciclase exclusiva de Bordetella pertussis.</i> <b>Zacca, Federico</b>	p32
11:55	<i>Caracterización genómica, simbiótica y taxonómica de rizobios noduladores de Desmanthus virgatus aislados de diferentes regiones edafoclimáticas de Argentina.</i> <b>Zuber, Nicolás Emilio</b>	p33
12:20	Ágape de fin de año	

## **Resúmenes**

## **Manipulación de la red de microtúbulos durante la infección por el virus del mosaico del tabaco**

Matías Emanuel Agüero

Los virus de plantas generalmente poseen genomas a RNA que codifican un mínimo set de proteínas dentro de las que se pueden destacar: una replicasa (REP), una proteína de cubierta (CP) y una o varias proteínas de movimiento (MP). Durante el ciclo infectivo, las proteínas virales deben interactuar con las proteínas del huésped para subordinar la maquinaria celular en su propio beneficio. La infección viral tendrá éxito en la medida que la célula provea de todos los factores necesarios y el virus pueda evadir los mecanismos de defensa de la planta para replicarse, moverse de una célula a otra y establecer una infección sistémica.

El *virus del mosaico del tabaco* (TMV) replica su genoma en asociación con el retículo endoplásmico (ER), formando pequeños cúmulos denominados complejos de replicación viral (VRCs). Es capaz de moverse célula a célula, independientemente de su proteína de cubierta, lo que lo convierte en un excelente modelo para el estudio y análisis de localización y transporte de complejos ribonucleoprotéicos en plantas. En células correspondientes al frente de infección, estos VRCs presentan un movimiento intermitente, están asociados al ER y pausan sus trayectorias en la cercanía de microtúbulos (MTs). La presencia y dinámica de estos VRCs tempranos está asociada a la capacidad de movimiento del virus y depende de las interacciones de MPTMV con los MTs. En células detrás del frente de infección, los VRCs se suelen estabilizar en MTs y en centros de organización de MTs, donde se fusionan unos con otros y crecen en tamaño. Está aceptado que la red de MTs cumple un rol en la localización y transporte de RNAs en plantas. Se ha visto que el movimiento de TMV es sensible y capaz de adaptarse a plantas con mutaciones que afectan la red de MTs. Está aceptado que la red de MTs cumple un rol en la localización y transporte de RNAs en plantas. Se ha visto que el movimiento de TMV es sensible y capaz de adaptarse a plantas con mutaciones que afectan la red de MTs.

Para comprender el rol de los MTs en la localización y transporte de RNAs en plantas, estudiamos las interacciones entre la MPTMV con elementos de la maquinaria regulatoria de la polimerización y estructura de la red. En el contexto de la infección de TMV se analizó la dinámica y organización de la red de MTs y encontramos que la presencia de la MPTMV sola o en el contexto de la infección viral altera la disposición de MTs respecto al control. Por otro lado, en experimentos de localización subcelular, hemos visto que las proteínas TOR1 y KAT (proteínas involucradas en la regulación y estructura de la red) fusionadas a genes reporteros co-localizan junto a MPTMV en sitios de entrecruzamientos y ramificaciones de MTs. Además, la MPTMV es capaz de interactuar con TOR1, proteína que en un escenario de sobreexpresión también afecta negativamente el movimiento célula a célula del virus. De acuerdo con nuestros resultados, presentaremos un modelo donde el virus podría interferir en la regulación de la red de MTs.



## Desarrollo de una plataforma de vectores de expresión derivados de baculovirus para la producción de inmunógenos en sistema de células de mamífero

Leslie C. Amorós Morales

Los baculovirus infectan diferentes especies de insectos, principalmente del orden *Lepidoptera* (polillas y mariposas), y se caracterizan por su estrecho espectro de hospedadores. Su genoma varía entre los 80 y 180 kpb y se encuentra en forma de DNA circular doble cadena, empaquetado en una nucleocápside en forma de bastón envuelta en una membrana lipoproteica. A lo largo de la evolución, los baculovirus han desarrollado la capacidad de ocluir sus viriones en cristales proteicos, conformando cuerpos de oclusión (OB: *occlusion bodies*). Estos OB se encuentran formados mayoritariamente por la proteína poliedrina, cuya expresión ocurre en etapas tardías de la infección a niveles muy altos. Los baculovirus son ampliamente utilizados como vectores de expresión. El sistema de expresión más difundido se desarrolló sobre la base del genoma del baculovirus AcMNPV (*Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus*), aprovechando los altos niveles de expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor fuerte de la poliedrina. Más recientemente, se desarrollaron baculovirus recombinantes como vehículos de transducción de DNA, capaces de introducir eficientemente genes foráneos en células de mamíferos y de conducir a su expresión.

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), cuyo agente etiológico es el virus Junín, es una enfermedad endémica caracterizada por alteraciones cardiovasculares, hematológicas, renales, inmunológicas y neurológicas. La FHA es una enfermedad emergente, resultado de la actividad productiva del ser humano que favorece el contacto con roedores silvestres que actúan como reservorio. Hace más de dos décadas, se introdujo la vacuna Candid #1 que, si bien resultó ser muy efectiva, presenta ciertas desventajas al no poder administrarse a personas inmunocomprometidas, embarazadas, menores de edad, etc., por tratarse de una vacuna a virus atenuado que además conlleva el riesgo latente de reversión de la virulencia. La proteína RIP1 (*receptor interaction protein 1*) forma parte de la familia RIP quinasas e interviene en la respuesta inmune proinflamatoria y en procesos de muerte celular. Diferentes estudios han demostrado que el silenciamiento de dicha proteína produce un aumento de la expresión de genes heterólogos mediada por vectores virales y específicamente mediada por baculovirus, lo que permitiría aumentar la eficiencia de los mismos como vectores de transducción génica.

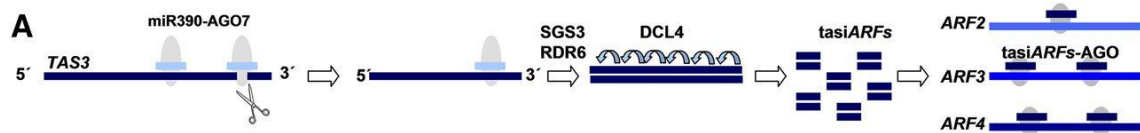
El objetivo general del proyecto de tesis doctoral consiste en desarrollar una alternativa a la vacuna C#1, basada en la estrategia de transducción de genes mediada por baculovirus. De este modo se propone generar una vacuna a DNA que combine la expresión de inmunógenos recombinantes en mamíferos con la modulación de la respuesta inmune innata.

En esta oportunidad, será presentado el plan de trabajo propuesto haciendo hincapié en el diseño de los vectores de transferencia necesarios para la producción de baculovirus recombinantes capaces de expresar distintas proteínas estructurales del virus Junín en células de mamífero, utilizando como estrategia de clonado el ensamblado de fragmentos por *Golden Gate*. El diseño de los vectores incluirá, además, un shRNA (*short hairpin RNA*) con la capacidad de regular negativamente la expresión de la proteína RIP1 con el fin de aumentar la expresión de los transgenes. Al término del proyecto, la plataforma montada se podrá utilizar como base para generar herramientas que permitan enfrentar otros problemas sanitarios en el futuro.

## Regulación de los ARFs mediada por tasiRNAs y su participación en el desarrollo de órganos laterales en plantas leguminosas

Cristina Kirolinko

Los factores de transcripción ARF2, ARF3 y ARF4 (Auxin Response Factors 2, 3 y 4) son regulados a nivel post-transcripcional por la acción de pequeños RNAs de interferencia que actúan en trans (tasiRNAs), los cuales son producidos por medio de la vía del microRNA390 (miR390) y el transcripto trans-acting RNA3 (TAS3).



Hobecker et al., 2017. Plant Physiology 174: 2469–2486

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la sobreproducción de tasiRNAs derivados de TAS3 regula positivamente el crecimiento de las raíces laterales y negativamente la nodulación en *Medicago truncatula* (Hobecker et al., 2017. Plant Physiology 174: 2469–2486). Para evaluar si los tasiRNAs derivados de TAS3 actuaban a través de los factores ARF2, ARF3 y ARF4 hemos silenciado estos transcritos mediante la expresión de una RNA de interferencia (RNAi ARF 2/3/4) que silencia simultáneamente a los tres mRNAs. La evaluación del fenotipo asociado a la nodulación y a la infección bacteriana en las raíces transgénicas reveló que el silenciamiento post-transcripcional de ARF 2/3/4 produce una disminución significativa en la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno y la infección bacteriana, sugiriendo que estos factores de transcripción cumplen una función crucial en el establecimiento de la asociación simbiótica. A fin de correlacionar su expresión con el desarrollo de las raíces laterales y nódulos, también estamos analizado el patrón espacio temporal de los genes de la vía ARF2, ARF3 y ARF4 haciendo uso de fusiones de promotor a los genes reporteros GUS y GFP.

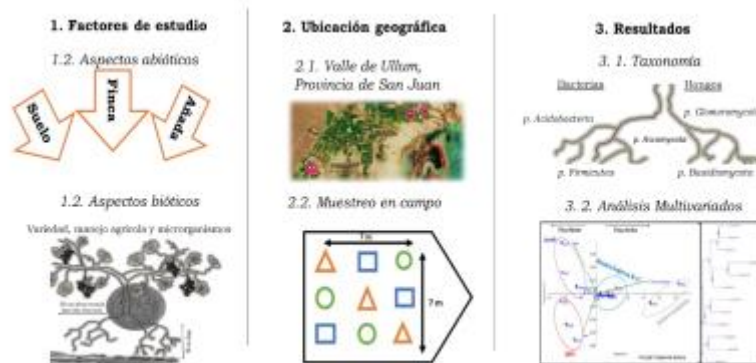
## Influencia de factores abióticos en la diversidad rizosférica de bacterias y hongos en vides

Mónica Oyuela

Para la microbiología molecular, el uso de las tecnologías de Nueva Generación (Next Generation Sequencing o NGS) han permitido la caracterización de las poblaciones microbianas previamente inaccesibles. En el campo de la agricultura las mismas han generado una cantidad exuberante de información, la cual ha sido orientada a implementar el desarrollo de mejores prácticas agrícolas en varios tipos de cultivo.

El uso de estas herramientas permite obtener un perfil representativo de las especies, de bacterias y hongos en una determinada muestra. Esta información sobre la microbiota de la vid es necesaria para comprender de modo más acabado la ecología de los suelos de cultivo ya que los microorganismos desempeñan roles centrales en el mantenimiento de la productividad y el reciclado de componentes claves de la nutrición vegetal. Por ello, nos propusimos como objetivo principal, la caracterización de las comunidades rizosféricas de bacterias y hongos en cultivos de *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* ubicados en cuatro parcelas del valle de Ullum en la Provincia de San Juan, previo a las cosechas del 2015, 2016 y 2017. Los principales grupos taxonómicos encontrados de bacterias fueron las *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Y entre los hongos, los *Ascomycetos*, *Basidiomycetos* y en menor porcentaje, el grupo de *micorrizas arbusculares* (AM), los *Glomeromycetos*. Su diversidad resultó ser variable entre añadas y sitios. Por lo que, adicionalmente, se correlacionaron estos factores con la incidencia de los grupos microbianos presentes. Encontrándose que las diferencias entre sitios fueron principalmente debidas al contenido de materia, carbono y nitrógeno orgánico, además de fósforo asimilable en el suelo. Revelando que la diversidad fúngica y bacteriana puede variar entre cosechas de un mismo lugar.

La integración de la información obtenida de las distintas zonas muestreadas permitirá conocer las comunidades de microorganismos presentes en diferentes contextos, su interacción con el suelo, la planta y el modo en que resultan relevantes para la industria vitivinícola.



## Rol de una diguanilato ciclasa de *Bordetella* en el proceso de infección y formación de biofilm *in vivo*.

Keila Belhart

Las bacterias del género *Bordetella* colonizan las vías respiratorias de los seres humanos y animales. *Bordetella bronchiseptica* (Bb) tiene un amplio rango de huéspedes, causando enfermedad en una gran variedad de mamíferos, incluido el humano.

Ha sido reportado que las bacterias de este género pueden persistir dentro del huésped formando biofilm. Se han visualizado estructuras del tipo biofilm en el tracto respiratorio de animales infectados con *B. bronchiseptica* hasta 38 días post-inoculación, y de 19 días en *B. pertussis*, lo que sugiere que la formación de biofilm permite la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio.

A fin de profundizar el conocimiento sobre la interacción huésped patógeno y establecer bases que ayuden al desarrollo de estrategias de prevención y eventual erradicación de las enfermedades causadas por las bacterias del género de *Bordetella* es que nos propusimos, junto con mi equipo de trabajo, estudiar una diguanilato ciclasa, BdcB, la cual está implicada en la síntesis de un segundo mensajero c-di-GMP. Actualmente el c-di-GMP se considera un segundo mensajero ubicuo en bacterias, clave en la regulación de la transición del estilo de vida planctónico al estado de vida sésil o en asociación formando biofilm. La presencia de este mensajero favorece la formación de biofilm mientras que inhibe la movilidad.

Mediante la implementación de diferentes técnicas para evaluar movilidad y formación de biofilm, incluida microscopia electrónica de barrido (SEM), hemos visto que las cepas que tienen deletado el gen *bdcB* (*BbΔbdcB*) presentan una formación de biofilm *in vitro* alterada respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, la sobreexpresión de *bdcB* inhibe la movilidad y aumenta la formación de biofilm, indicando que probablemente BdcB sea una diguanilato ciclasa activa y por lo tanto su sobreexpresión aumente los niveles de c-di-GMP dentro de la célula.

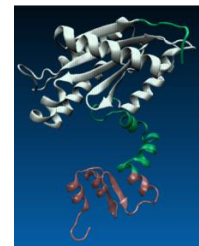


Figura 1: Estructura de BdcB

En un ensayo de supervivencia en macrófagos se vio que, si bien la cepa Bb silvestre podía persistir dentro de los macrófagos incluso 24 horas después de la infección, *BbΔbdcB* era incapaz de hacerlo después de las 4 horas. Esto nos sugiere que BdcB podría ser importante en distintas etapas del proceso de infección. En vista de esto, ensayamos la supervivencia al  $H_2O_2$ , el crecimiento a pH ácido y la supervivencia a pH 4 (pH en el cual Bb es incapaz de crecer) de las distintas cepas de Bb con diferenciada expresión de BdcB. Mientras que no se observaron diferencias significativas en la supervivencia al  $H_2O_2$  ni en el crecimiento a pH ácido, la cepa *BbΔbdcB* mostró una menor supervivencia a pH 4 respecto de la cepa silvestre.

Un paso fundamental en el mecanismo catalítico de las diguanilato ciclasas es la dimerización de las mismas. En general la dimerización se ve facilitada por los dominios acompañantes en la proteína al dominio catalítico GGDEF. El modelado de BdcB presenta el dominio GGDEF (Fig. 1, blanco) y otro dominio N-Terminal no determinado. A fin de comprobar si esta porción N-Terminal resulta importante para la actividad diguanilato ciclasa, ensayamos la movilidad de una cepa que sobreexpresa la proteína BdcB con la porción N-Terminal deletada. Esta cepa no fue capaz de inhibir la movilidad, confirmando la importancia de esta región proteica en el correcto funcionamiento de BdcB.

Los resultados alcanzados hasta el momento sugieren un rol importante de BdcB en el proceso de infección de *B. bronchiseptica*.

## Virosis emergentes en el Cinturón Hortiflorícola Platense, resultados del STAN

Luciana Ferrand

El Cinturón Hortiflorícola Platense (CHFP) es la segunda región más importante del país en cuanto a superficie y producción de hortalizas y flores de corte. Entre los cultivos más relevantes se encuentran tomate, pimiento, alcaucil, hortalizas de hoja, crisantemo, alstroemeria, rosa y clavel, cubriendo más de 8000 hectáreas.

Las infecciones virales son el mayor problema sanitario para la producción de estos cultivos, el cual se ha visto agravado por la emergencia de enfermedades virales transmitidas por insectos vectores de varias virosis (supervectores) que ocasionan la dispersión de graves epidemias condicionando la viabilidad de la producción. El éxito de las estrategias de manejo de estas virosis dependerá, en primer lugar, del diagnóstico correcto del agente causal.

En el marco del Servicio tecnológico de alto nivel (STAN) ‘Determinación de virus fitopatógenos’ desarrollado en nuestro laboratorio, hemos identificado diferentes infecciones virales, algunas de las cuales no habían sido reportadas previamente en el país, como *tomato blistering mosaic virus* (ToBMV) y *tomato chlorosis virus* (ToCV). ToBMV, transmitido por coleópteros (familia *Chrysomelidae*), fue detectado en lotes de tomate distribuidos en diferentes quintas del CHFP. El análisis de la secuencia de la proteína de la nucleocápside, reveló que los aislamientos de ToBMV del CHFP son idénticos a aislamientos provenientes de cultivos de tomate y tabaco de Brasil. ToCV, transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), fue encontrado infectando tres cultivares de tomate en distintas localidades del Cinturón, lo que representa una amenaza para la producción regional de tomate. Más aún, esto se ve agravado por la existencia de sinergismo viral con tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV), el virus que más daño ha causado en la región. Se ha reportado en España que la presencia de ToCV le permite a TSWV infectar un cultivar resistente, ocasionando sintomatología idéntica a la observada en un cultivar susceptible. La presencia de ambos virus en las mismas plantas de tomate del CHFP también se vio reflejada en la severidad de la sintomatología que presentaban los frutos, imposibilitando su comercialización.

Además, hemos encontrado TSWV infectando *Alstroemeria sp*, flor de corte cuyo material de propagación agámico proviene de países asiáticos. A partir de estos datos, determinados mediante el STAN, se realizó un análisis filogenético con la secuencia de la proteína N, indicando que ésta sería la fuente de TSWV para los cultivos de tomate y pimiento.

Estos resultados aportan un dato epidemiológico importante a tener en cuenta para desarrollar estrategias más eficientes dentro del manejo integrado de enfermedades en la región.

## **Estudio del rol de los sistemas de dos componentes, presentes en el simbiote de alfalfa *Ensifer meliloti*, que participan en la respuesta bacteriana al estrés térmico.**

Leda Mailen Vera

*E. meliloti* es un rizobio capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con *Medicago sativa* (alfalfa). La temperatura óptima de cultivo para la mayoría de los rizobios es 25-30 °C, sin embargo, tanto en vida libre como durante el proceso simbiótico los rizobios son a menudo expuestos a temperaturas fuera de este rango. La temperatura elevada del suelo en la zona de raíz influye en la supervivencia rizobiana, y también tiene un efecto inhibitorio sobre la adherencia de bacterias a los pelos de la raíz y en la formación del hilo de infección.

Considerando el cambio climático global y la necesidad de extender el área cultivada de alfalfa para aumentar la producción de los cultivos de esta leguminosa en ambientes adversos, los cultivares tolerantes al estrés deberán combinarse con rizobios también tolerantes.

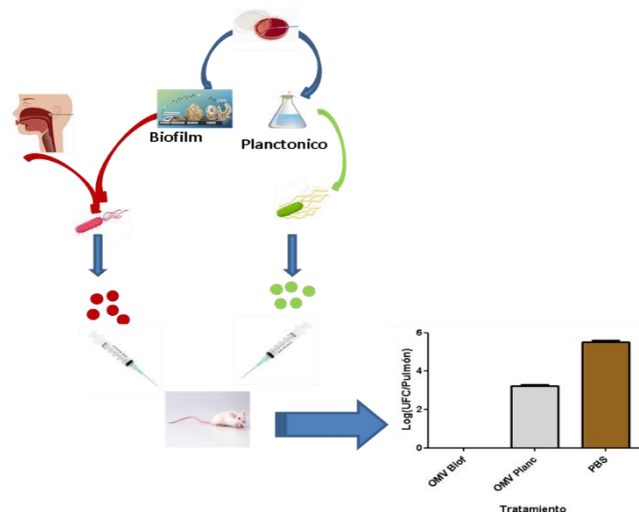
En este contexto, con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares que determinan la tolerancia a las altas temperaturas, hemos abordado la búsqueda y caracterización de sistemas de traducción de señales que involucran sistemas de dos componentes donde participa una histidina quinasa responsable de sensar el cambio en el ambiente, y un regulador de respuesta (RR) que generalmente actúa como regulador transcripcional modificando la expresión génica.

En esta etapa inicial nos hemos concentrado en el estudio del efecto del estrés térmico (40°C) sobre el crecimiento de un conjunto de mutantes generados por inserción o transposición en relación con el de la cepa salvaje. A partir del análisis de las curvas de crecimiento pudimos identificar 6 genes candidatos que podrían participar de las respuestas moleculares asociadas a la tolerancia a altas temperaturas. En paralelo, estamos comenzado a evaluar si estos RRs poseen además algún rol en la capacidad de nodulación y en la fijación biológica de nitrógeno.

## Una visión clásica aplicada al mejoramiento de una vacuna contra pertussis, una enfermedad resurgente.

Francisco Carriquiriborde

La evidencia experimental recolectada desde hace muchos años es clara respecto a que la vacunación es la forma más efectiva y rentable de combatir las enfermedades infecciosas que amenazan la vida. Sin embargo, todavía en el comienzo del tercer milenio las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa en el mundo de morbilidad y mortalidad. De hecho, las enfermedades prevenibles por vacunas están siendo responsables de aproximadamente el 25% de las 10 millones de muertes ocurridas anualmente entre niños menores de cinco años de edad. Más aún, alrededor del 25% de las muertes de adultos todavía se atribuyen a enfermedades infecciosas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar algunas vacunas tradicionales además de diseñar nuevas vacunas para patógenos emergentes, re-emergentes o resurgentes. Una de las vacunas tradicionales que requiere ser mejorada es la destinada a prevenir la enfermedad respiratoria conocida como pertussis. Para el control de esta enfermedad en la actualidad existen dos tipos de vacunas: uno denominado vacuna celular (wP) constituida por una suspensión del agente causal (*Bordetella pertussis*) muerto por calor y detoxificado químicamente y las vacunas acelulares o de componentes (aP) constituidas por inmunógenos proteicos purificados. El uso masivo de estas vacunas desde los años 50 permitió reducir drásticamente la morbilidad y mortalidad asociada a la enfermedad. Sin embargo, en las últimas dos décadas las tasas de incidencia de la enfermedad se han incrementado (24 millones de casos, con aproximadamente 160.000 muertes). Varias son las causas esgrimidas para explicar el resurgimiento de la enfermedad, todas ellas hacen referencia a debilidades de las actuales vacunas. En este contexto nuestro grupo de trabajo ha diseñado hace varios años un candidato vacunal en base a vesículas de membrana externa (OMVs). Respondiendo a exigencias de la OMS el mismo fue obtenido a partir de una cepa de *B. pertussis* muy caracterizada. Teniendo en cuenta que dicha cepa se ha adaptado a condiciones de cultivo en el laboratorio, como parte de mi trabajo de tesis he abordado el mejoramiento de nuestro candidato vacunal en pos de una mejor respuesta frente a los aislamientos circulantes que no están adaptados al laboratorio. Para ello he analizado y caracterizado la presencia de OMVs en cultivos biofilm de una cepa de nuestra colección aislada en el año 2001, siendo esta forma de crecimiento una característica evidenciada durante el proceso infeccioso natural dentro del huésped. La caracterización de las OMVs fue realizada comparativamente con OMVs obtenidas de cultivos planctónicos. Empleamos para la caracterización metodologías in vitro e in vivo empleando el modelo murino de desafío intranasal. Los resultados obtenidos han mostrado que la formulación conteniendo a las OMVs derivadas de un cultivo en biofilm se presentan como más efectivas que las obtenidos en condiciones de cultivo planctónico para la reducción de colonización en los pulmones de los animales inmunizados. Hemos ya avanzado en la identificación de los efectores moleculares involucrados en la protección ejercida por las OMVs.



## Desarrollo de estrategias moleculares para el control de la enfermedad HuangLongBing de los cítricos

Victoria Gardella

La enfermedad denominada Huanglongbing (HLB) es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Esta representa actualmente la mayor de las amenazas al cultivo de cítricos, al causar una disminución en la producción y la calidad de la fruta y llevando eventualmente a la muerte de los árboles infectados, con un sustancial impacto económico. En la Argentina, las primeras plantas afectadas por dicha enfermedad fueron detectadas en 2012 en la provincia de Misiones y actualmente exceden los 300 casos en varias provincias. Otras bacterias, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causante de la Cancrosis de los cítricos, y *Xylella fastidiosa*, causante de la Clorosis Variegada de los Cítricos, causan también enormes pérdidas económicas. Actualmente la modificación genética es una de las aproximaciones más rápidas para la generación de plantas resistentes a estas enfermedades, por lo que nos encontramos evaluando dos posibles estrategias para producir un aumento en la resistencia de los cultivos de cítricos.

La forma más utilizada para cultivar cítricos en la Argentina es el uso de portainjertos, plantas con mayor resistencia a las condiciones del suelo o a ciertos patógenos de la zona sobre las cuales se realiza el injerto de un cítrico de interés comercial. Es así que la primera estrategia que estamos desarrollando es la generación de plantas transgénicas de *Citrange troyer*, un portainjerto usado comúnmente para cultivo de cítricos, que expresen péptidos de acción antimicrobiana (AP). Los APs son compuestos producidos por diversos organismos para protegerse de microorganismos patogénicos, causando su muerte o frenando su reproducción. Al introducir en el genoma de las plantas construcciones genéticas que permitan la expresión de los APs snakin/GASA (proveniente de papa) o de lisozima (proveniente de huevo de gallina) se espera que se produzca un aumento de la tolerancia o la resistencia de los árboles a las enfermedades bacterianas mencionadas.

Los patógenos, al producirse la infección, interactúan con algunos productos génicos de la planta para poder reproducirse y/o para evitar que la planta se defienda ante la enfermedad. Los genes que codifican dichos productos se denominan 'genes de susceptibilidad'. Antecedentes muestran que modificando estos genes puede generarse resistencia a ciertas enfermedades. Proponemos entonces una segunda estrategia que lleve a la generación de plantas de naranjo dulce editadas en su genoma mediante Cas9-sgRNA, una tecnología de edición genética basada en el sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas utilizado para eliminar DNA plasmídico y viral. Se utilizará la proteína denominada Cas9 y algunas de sus variantes, las cuales pueden ser 'programadas' para modificar el ADN en las zonas correspondientes a los genes de interés, posibilitando la edición de dichos genes de forma altamente específica y consiguiendo así resistencia o tolerancia a las enfermedades de interés.



## Nueva presentación de inoculantes para soja

Esteban Tomás Iturralde

La soja ante la escasez de compuestos nitrogenados asimilables en el suelo puede desarrollar nódulos en sus raíces donde los rizobios son capaces de reducir el  $N_2$  atmosférico a amonio ( $NH_4^+$ ), forma asimilable por los sistemas biológicos. Este proceso se denomina Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). De esta forma, la planta puede utilizar el nitrógeno para su desarrollo sin desabastecer al suelo de este elemento. Es por tal motivo que la mayoría de los campos sojeros de nuestro país son inoculados con *Bradyrhizobium* spp. (*B. japonicum* o *B. diazoefficiens*), con alta capacidad de fijación de  $N_2$ . Los inoculantes agregados al momento de la siembra compiten por la ocupación de los nódulos con la población autóctona de rizobios que habitan en el suelo procedentes de inoculaciones en campañas previas.

El objetivo general de mi tesis es el desarrollo de una nueva presentación de inoculantes para soja que mejore la competencia para la nodulación. Se ha demostrado que esta cualidad es de suma importancia para que los rizobios del inoculante ocupen la mayor cantidad de nódulos donde puedan realizar la FBN.

Trabajos previos muestran que, entre otros factores, una mejor distribución de los rizobios en el suelo favorece la competencia para la nodulación de las cepas del inoculante. Así, nuestro producto biotecnológico se aplicaría en el surco de siembra.

Otro factor importante que aporta a la competencia para la nodulación es la movilidad de los rizobios en el suelo. De una colección de cepas aisladas de suelos ácidos sojeros argentinos, se hallaron dos cepas con buena capacidad fijadora de  $N_2$ . Mediante un método de selección artificial, se obtuvieron las variantes más móviles de ambas. Así, estaríamos optimizando la competitividad de dos cepas tolerantes a la que presentan una buena capacidad de fijación de  $N_2$ .

En nuestra presentación se podrían incorporar otros microorganismos que tengan un efecto benéfico para la planta de soja. *Trichoderma harzianum* es un hongo del suelo de rápida proliferación que se utiliza en cultivos extensivos de invierno. Ensayos de compatibilidad demostraron que *B. japonicum* E109 (cepa recomendada por el INTA para la formulación de inoculantes) y *T. harzianum* Th5cc no se inhiben mutuamente. A la vez, que el proceso de nodulación no se ve afectado por la presencia de *T. harzianum* Th5cc, esta es capaz de controlar el crecimiento de los hongos que causan las enfermedades más importantes en los cultivos de soja del país. Por todo lo expuesto se podrían coexistir en la nueva presentación de inoculante.

Sorprendentemente, hay nódulos en las plantas de soja coinoculadas con *T. harzianum* Th5cc y *B. japonicum* E109 en presencia de altas concentraciones de  $KNO_3$ , situación donde el rizobio sólo, no nodula. El análisis de la ultraestructura mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de dichos nódulos mostró que son capaces de fijar nitrógeno. Con los resultados obtenidos, tenemos herramientas para desarrollar una presentación de inoculante para soja que se aplique en el surco de siembra y que posea cepas de rizobios con una buena capacidad de fijación de N y mejoradas en la movilidad. Además, se podría incorporar a la presentación el hongo *T. harzianum* con el fin de mejorar la protección contra hongos fitopatógenos y la nodulación de los cultivos de soja aún en presencia de formas asimilables de nitrógeno en el suelo.

## Nuevos mecanismos moleculares que regulan la transferencia de plásmidos en Rizobios

Lucas Castellani

Los rizobios son un grupo de bacterias que poseen la capacidad de interactuar de forma simbiótica con las raíces de plantas leguminosas. Una vez en contacto con las mismas, estos microorganismos inducen la generación de un nuevo órgano en la planta, denominado nódulo. Dentro del mismo las bacterias se diferencian en bacteroides y pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas que la planta pueda utilizar para su desarrollo. Por este motivo, la liberación de estos microorganismos es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar el rendimiento de diversos cultivos. Estas bacterias, al igual que muchas otras, son portadoras de elementos genéticos extracromosomales llamados plásmidos. Los plásmidos son capaces de ser transferidos hacia otras bacterias en un proceso denominado conjugación, para el cual es necesario el contacto entre ambas células. A la vez, es necesaria la expresión de un conjunto de proteínas específicas involucradas en el procesamiento del DNA (codificadas por genes de la región Dtr) y en la generación de la maquinaria encargada de transferirlo (genes Mpf). Debido a esto, la liberación de microorganismos que posean plásmidos plantea la posibilidad de que exista transferencia horizontal de genes entre bacterias mediante conjugación, lo cual afectaría notablemente la población de microorganismos del suelo. Es por esto que el estudio de los mecanismos que regulan la transferencia de plásmidos es de gran relevancia.

Si bien hasta el momento sólo han sido descriptos 2 mecanismos involucrados en la regulación (uno dependiente de *quórum-sensing* y otro del par represor/activador *rctA/rctB*), observamos que pLPU83a, un plásmido autotransmisible de *Rhizobium favelukesii* LPU83, no presentaba ninguno de estos mecanismos. López-Fuentes *et al.*(1) describieron 3 genes plasmídicos ubicados entre las regiones Dtr y Mpf de p42a de *R. etli* CFN42, los cuales codificaban proteínas hipotéticas involucradas en la conjugación. Analizando la región de conjugación de pLPU83a, encontramos 2 genes (pLPU83a\_0146 y pLPU83a\_0148) con una ubicación muy similar a la de los genes encontrados en p42a, que codificaban proteínas hipotéticas sin una función predicha. Al realizar mutantes por delección en cada uno de ellos, comprobamos que ambos genes estaban involucrados en el proceso conjugativo. Al eliminar pLPU83a\_0148 la conjugación dejaba de observarse, mientras que al eliminar pLPU83a\_0146 la frecuencia de transferencia aumentaba notablemente. Para cada mutante se pudo restablecer el fenotipo salvaje al complementar tanto con una copia del gen como con una fusión del gen a un *His-tag* y a GFP.

Con la hipótesis de que la expresión de los genes en estudio estaba afectando a nivel transcripcional la expresión de los genes involucrados en conjugación, se realizó un análisis transcriptómico por RNA-seq de los mutantes. Se observó que el mutante en pLPU83a\_0146 presentaba un aumento notable de la expresión de todos los genes involucrados en la transferencia, a excepción de *traM*, el cual codifica una proteína represora de la conjugación. El mutante en pLPU83a\_0148 no presentó diferencias en el transcriptoma. Teniendo en cuenta los resultados, se realizó un mutante por delección en *traM*, observando que la frecuencia de conjugación no se veía afectada, por lo que se concluyó que la proteína codificada no sería funcional en esta cepa.

Con el propósito de continuar avanzando en la caracterización funcional de estas proteínas, analizaremos la transferencia de pLPU83a y sus variantes mutantes desde diferentes entornos genéticos. A la vez, realizaremos nuevos mutantes que nos permitan interpretar el mecanismo por el cual la transferencia del plásmido es regulada. Además, con las fusiones a GFP estamos realizando observaciones al microscopio confocal con el objetivo de analizar la localización celular de cada proteína. Tanto con la fusión a *His-tag* como a GFP se intentará purificar cada proteína y se abordará el estudio de posibles interacciones DNA-proteína o proteína-proteína. (1). Lopez-Fuentes, E. (2015) Front Microbiol, 5, 793.

## **Análisis transcriptómico de un mutante en *bvgR* de *Bordetella bronchiseptica***

María de la Paz Gutierrez

*B. bronchiseptica* es una bacteria Gram negativa capaz de generar infecciones en el tracto respiratorio de numerosos animales e inclusive de pacientes humanos inmunocomprometidos.

Durante el proceso de infección es indispensable que *B. bronchiseptica* sintetice una serie de factores de virulencia. La producción de éstos está regulada por un sistema de dos componentes, BvgAS, que media la transición entre tres fases fenotípicas: una virulenta, una intermedia y una avirulenta. Cada una de estas fases presenta un perfil de proteínas característico.

Hace más de 10 años, se reportó que *bvgR*, uno de los genes activados por el sistema BvgAS, es responsable de la regulación negativa de los genes de avirulencia durante la fase virulenta de la bacteria, como es el caso del gen de la flagelina en *B. bronchiseptica*. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual actúa BvgR así como la mayoría de las proteínas cuya expresión regula. La proteína BvgR presenta un único dominio correspondiente a proteínas con actividad diguanilato fosfodiesterasa, capaces de degradar al segundo mensajero c-di-GMP; no obstante, carece de los aminoácidos descriptos como relevantes para esa actividad enzimática.

En este contexto, el objetivo general de mi Tesis es determinar tanto el mecanismo por el cual la proteína BvgR reprime la expresión de proteínas de *Bordetella*, así como las proteínas que regula. Este resumen se enfoca principalmente en el último objetivo: ¿qué proteínas están reguladas por BvgR y en qué fenotipos están involucradas?

Con el objetivo de determinar qué proteínas son reguladas por BvgR, decidimos comparar el transcriptoma de *B. bronchiseptica* BvgR<sup>-</sup> con el de la cepa silvestre, mediante RNAseq y siguiente corroboración de determinados genes por qPCR. Adicionalmente, se desarrolló un sistema reportero con dos proteínas fluorescentes para poder estudiar específicamente la regulación de ciertos genes que resultaron de interés.

En la RNAseq se observaron un total de 319 genes expresados diferencialmente entre dichas cepas: 221 genes sobreexpresados y 98 menos expresados en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre. A grandes rasgos, se encontraron múltiples reguladores transcripcionales, transportadores de membrana, proteínas asociadas al metabolismo de c-di-GMP y a la formación de biofilm, entre otras. Como se esperaba, el gen de la flagelina así como todos los genes que codifican para el aparato flagelar, estaban sobreexpresados en la cepa mutante. Sorprendentemente, se encontraron significativamente menos transcriptos correspondientes a proteínas del sistema de secreción tipo III de *B. bronchiseptica* en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre. Históricamente, se asoció a BvgR únicamente con la represión de factores de avirulencia, por lo que éste sería el primer indicio de que también es capaz de regular factores de virulencia.

Dentro del grupo de proteínas asociadas al metabolismo de c-di-GMP reguladas por BvgR, encontramos que la expresión de la fosfodiesterasa PdeB estaba aumentada en el mutante BvgR<sup>-</sup>. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de fosfodiesterasas está asociada con un aumento en la movilidad bacteriana, decidimos estudiar si la regulación de BvgR sobre la movilidad era a través de PdeB. Para ello construimos las cepas  $\Delta$ PdeB y  $\Delta$ BvgR $\Delta$ PdeB y evaluamos su movilidad en agar blando. Asimismo, como además se encontraron sobreexpresados en la mutante BvgR<sup>-</sup> genes involucrados en la formación de biofilm, se ensayó la capacidad de formar biofilm de estas cepas.

### Respuesta al estrés por Nitrógeno en *Bradyrhizobium diazoefficiens*

Florencia Lamelza

El nitrógeno es un elemento primordial para la vida. En particular, en el suelo, los compuestos nitrogenados fácilmente asimilables son escasos por lo que los microorganismos que lo habitan han desarrollado sistemas específicos que les permiten captar y asimilar este nutriente aun cuando se encuentra presente en bajas concentraciones. Un ejemplo de estos sistemas es la cascada de respuesta al estrés por nitrógeno (NSR). La NSR ha sido muy bien caracterizada en bacterias como *Ensifer meliloti* (simbionte de alfalfa), sin embargo, en *Bradyrhizobium diazoefficiens* (rizobio simbionte de la leguminosa soja) este mecanismo aún no ha sido descifrado. Si investigamos e intentamos comprender la regulación del metabolismo de N en *B. diazoefficiens*, y cómo las condiciones fisiológicas y metabólicas de los rizobios pueden verse alteradas, es posible aprovechar a futuro ese conocimiento adquirido para mejorar la eficiencia de la simbiosis rizobio-leguminosa y así contribuir con las prácticas de agricultura sustentable.

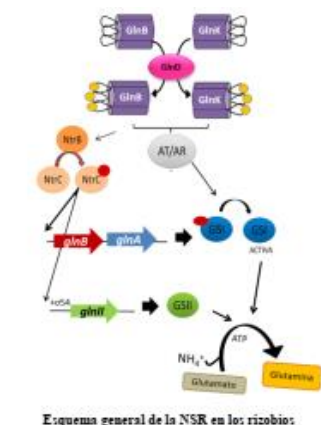
Los elementos centrales de la NSR son las proteínas de señalización PII: GlnB y GlnK (codificadas respectivamente por los genes *glnB* y *glnK*). Estas proteínas se encuentran altamente conservadas y responden a la relación carbono/nitrógeno intracelular. En el genoma de *B. diazoefficiens* encontramos genes homólogos a las proteínas PII, en particular, una copia de *glnB* y dos copias de *glnK* (que denominamos *glnK1* y *glnK2*). Este hecho es llamativo ya que los rizobios tienen sólo una copia de *glnK*, y solo se han descrito la existencia de esta duplicación génica en arqueas o en bacterias fijadoras de N en vida libre. Ante la ausencia de conocimiento sobre estas proteínas en *B. diazoefficiens* nos propusimos investigar si las dos GlnK son funcionales, y si es así cuál es el rol que cumple cada una de ellas, junto con GlnB, en la NSR de este rizobio.

Para cumplir con este objetivo obtuvimos, mediante técnicas de biología molecular, cepas mutantes en cada uno de los genes que codifican las PII: *glnB*, *glnK1* y *glnK2*. La caracterización fenotípica de estas cepas nos permitió observar que ninguna de las tres proteínas PII es esencial por sí sola para el crecimiento de las bacterias en medios limitados en N. Llamativamente, en medios con exceso de N encontramos que únicamente GlnB es de gran importancia para las etapas tempranas del crecimiento de la bacteria. La capacidad de la cepa mutante en *glnB* para adaptarse a esta condición de exceso de N y alcanzar una biomasa final equivalente a la de la cepa salvaje nos indica que la función que lleva a cabo GlnB posiblemente pueda ser suplida por alguna de las otras proteínas PII que encontramos en *B. diazoefficiens*. Sin embargo, esta hipótesis aún no la hemos podido confirmar, lo que continúa siendo un desafío interesante en esta línea de investigación.

Dado que el blanco final de la cascada NSR son las enzimas Glutamino Sintetasa (GSI y GSII), encargadas de la asimilación del amonio intracelular, analizamos el efecto de las cepas mutantes en la expresión y la actividad de las GSs, encontrándose que todas las PII de *B. diazoefficiens* actúan regulando estas enzimas, mediante un mecanismo aún no dilucidado en esta bacteria.

Finalmente, al evaluar las características simbióticas de las cepas mutantes, pudimos observar que sólo GlnB resulta de vital importancia para el adecuado desarrollo y ocupación de los nódulos en las plantas de soja y por ende en la fijación biológica de  $N_2$ .

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que todas las copias de PII son funcionales en *B. diazoefficiens* y que el rol que tiene cada una de ellas es diferente, aunque bajo ciertas condiciones podrían superponerse. Además, hemos observado que es necesario el accionar de las 3 proteínas en conjunto para llevar a cabo eficientemente la asimilación de amonio, siendo cada una de las PII clave para una regulación fina de la NSR en este rizobio.



## Bioinformática

Ulises Maximiliano Mancini

La bioinformática es un campo interdisciplinario que desarrolla y aplica métodos y herramientas de software para la comprensión de datos biológicos. Se describe como el campo de estudio biológico que desenvuelve y emplea herramientas informáticas como parte de su metodología de trabajo. La bioinformática tiene activa participación en la secuenciación y anotación de genomas, en la identificación de genes candidatos y en estudios de polimorfismos. Cumple un rol fundamental en la minería de datos y facilita los estudios de regulación y expresión génica. Esta ciencia permite la descripción de redes biológicas en el área de biología de sistemas y proporciona herramientas para la simulación y el modelado molecular. También proporciona un marco importante para la realización de estudios comparativos y evolutivos, entre muchas otras aplicaciones.

En virtud de lo antes expuesto, el objetivo general de las tareas realizadas es proporcionar apoyo en la aplicación y ejecución de herramientas bioinformáticas a las diferentes necesidades de los proyectos desarrollados en el Instituto (IBBM/CONICET). Entre los trabajos realizados, se destacan aquellos relacionados con el ensamblado y el análisis de genomas (Fig.1), estudios transcriptómicos, análisis de micro RNAs y proteínas, estudios de elementos reguladores, filogenias moleculares y modelado proteico, entre otros. Entre las actividades de extensión ejercidas se enfatiza una Maestría en Bioinformática y Biología de Sistemas en la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y la participación en un curso de posgraduación sobre ciencias OMICAs en la Universidad Nacional de La Plata (IBBM/UNLP). Entre otras tareas ejercidas se pueden mencionar el montaje, mantenimiento y actualización de la página web y red social del instituto y la participación como miembro representante de la Comisión de Prensa y Difusión del IBBM en el Centro Científico Tecnológico, La Plata y miembro representante de la Comisión Evaluadora del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, IBBM/CONICET.



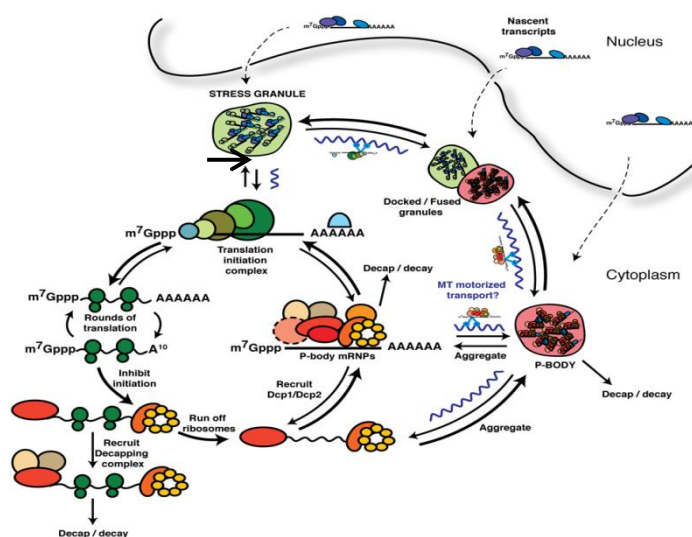
Fig. 1. Control de calidad, ensamblado y análisis de genomas en Galaxy (<https://usegalaxy.org/>)

## Adaptación de la técnica de TRAP (*Translating Ribosome Affinity Purification*) para la inmunopurificación de proteínas específicas de gránulos citoplasmáticos Processing Bodies (PBs) y Stress Granules (SGs) en etapas tempranas de la interacción simbiótica *Medicago truncatula*- *Ensifer meliloti*

Marcos Lancia

La técnica de purificación por afinidad de ribosomas en traducción (TRAP) combinada con RNA-Seq permite identificar mRNAs que están asociados a ribosomas y están siendo traducidos activamente. Este análisis permitió observar que a las 48hs de la interacción simbiótica entre *Medicago truncatula* y *Ensifer meliloti* ciertos mRNAs no cambiaban su abundancia total, pero sí cambiaban su asociación a polisomas. Nuestra hipótesis es que estos mRNAs no serían producto de la transcripción de genes y síntesis de *nov*o, sino que podrían estar almacenados en ciertos gránulos citoplasmáticos denominados cuerpos de procesamiento (PBs) o gránulos de estrés (SGs), los cuales se sabe que forman complejos ribonucleoproteicos (mRNPs) en citoplasma y pueden interaccionar entre sí e intercambiar mRNAs y proteínas. En ellos se almacenan o degradan mRNAs, algunos de los cuales podrían recuperar su traducibilidad uniéndose a ribosomas. En este trabajo se adaptó el método de inmunoprecipitación utilizado en TRAP fusionando a una proteína específica de cada gránulo (RBP47 para SGs; DCP1 para PBs) un epítopo FLAG para el cual contamos con anticuerpos antiFLAG comerciales, para luego aislar los mRNAs unidos a estas proteínas y realizar la secuenciación masiva de los pools de mensajeros en cada gránulo.

Se obtuvo tejido de tres réplicas biológicas de raíces de plantas de *M. truncatula* inoculadas con agua o con *E. meliloti*. Se confirmó la sobreexpresión de las construcciones RBP47-HF y DCP1-HF por Western blot y se estudió el fenotipo de las raíces transformadas. Además, se verificó la presencia de mRNAs y la inducción de genes específicos de nodulación en respuesta al rizobio por RT-qPCR. Por otro lado, se transformaron raíces con fusiones a proteínas fluorescentes, RBP47-RFP (rojo) y DCP1-YFP (amarilla), para observar la dinámica de los complejos por microscopía confocal. La secuenciación por RNA-Seq de las libraries de PBs y SGs nos brindará información cuali y cuantitativa de las poblaciones de mRNA presentes en cada complejo ribonucleoproteico. La comparación de estos datos con la información del traductoma nos permitirá comprender mejor el destino de cada transcripto y cómo se regula la dinámica citoplasmática del mRNA en el contexto de una interacción simbiótica de interés agronómico.



Buchan & Parker, 2009

### Composición proteica de los cuerpos de oclusión de *Epinotia aporema granulovirus* (EpapGV)

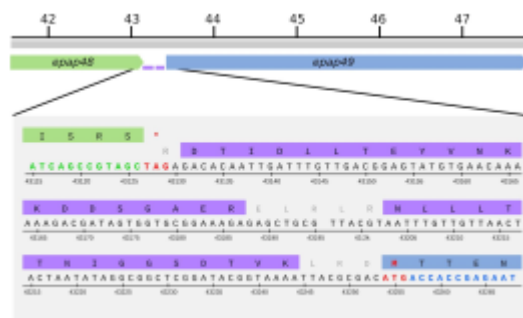
Tomás Masson

La familia *Baculoviridae* comprende un grupo de virus dsDNA con un genoma circular de 80- 180 kpb que infectan larvas de insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera*. Los baculovirus tienen un virión envuelto en forma de bastón (*baculum*). Estos virus son aplicados como biopesticidas en programas de manejo integrado de plagas debido a su estrecho rango de hospedadores. Nuestro laboratorio ha descubierto y secuenciado un betabaculovirus poliorganotrópico de rápida acción contra el barrenador del brote (*Epinotia aporema*), *E. aporema granulovirus* (EpapGV). Este aislamiento viral es un candidato para el desarrollo de un pesticida contra esta plaga.

Los viriones de los baculovirus se encuentran en el ambiente incluidos en una matriz proteica que forma cuerpos de oclusión (OB), un fenotipo que es resistente a la desecación y la radiación UV. Los OB que se encuentran sobre las hojas que son ingeridas por las larvas llegan al intestino medio y, después de disolverse a pH alcalino, liberan los virus derivados de la oclusión (ODV), que inician la infección de las células epiteliales. El proteoma de los ODV contiene proteínas asociadas con estructuras y funciones necesarias para la infección oral. Sin embargo, también se incorporan proteínas específicas de clado y de especie, las cuales participan en las interacciones propias del sistema virus-hospedador.

Buscando profundizar nuestro conocimiento sobre la patogénesis por vía oral de los betabaculovirus, decidimos determinar los componentes proteicos presentes en el proteoma de los OB de EpapGV a través del estudio por espectrometría de masas. Si bien existen informes previos sobre proteomas de baculovirus, estos se concentran en el género *Alphabaculovirus*, dejándonos con poca información referida a los *betabaculovirus*. A partir de nuestros datos, pudimos identificar 56 proteínas presentes en los OB de EpapGV. Esto apunta a que los viriones asociados con la infección oral tienen una composición compleja que se encuentra altamente conservada entre miembros de la familia *Baculoviridae*. Por otra parte, se presentan tres proteínas específicas del género *Betabaculovirus*, que representan potenciales candidatos asociados con su proceso infectivo.

Inesperadamente, al comparar los péptidos detectados con las secuencias codificantes en el genoma pudimos identificar siete péptidos no anotados. Esto nos permitió anotar una proteína ortóloga a un factor de infección oral descrito previamente en el baculovirus modelo, AcMNPV, y un posible evento de fusión entre dos proteínas. Estos resultados resaltan la utilidad de los estudios proteogenómicos como herramienta para mejorar la anotación de genomas virales complejos, como en el caso de los baculovirus.



## Estudio de la proteína FliL en los dos sistemas flagelares de *B. diazoefficiens* USDA 110

Florencia Mengucci

*Bradyrhizobium diazoefficiens* es una  $\alpha$ -Proteobacteria del suelo que vive tanto en vida libre como en simbiosis con leguminosas. Dado que es capaz de fijar  $N_2$  atmosférico durante el proceso de simbiosis, esta especie es utilizada en la formulación de inoculantes comerciales para cultivos de soja. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la eficiencia del proceso simbiótico se encuentra condicionado por la movilidad y la distribución de los rizobios en el suelo.

Existen distintos tipos de movilidad bacteriana mediada por flagelos, siendo la natación uno de ellos. En particular, *Bradyrhizobium* es el único rizobio descrito hasta la fecha que posee dos sistemas de flagelos: uno subpolar y otro lateral. Estos sistemas están compuestos por grupos de genes y proteínas distintas con regulación independiente, y a diferencia de otras especies, se expresan simultáneamente en medios líquidos.

Los flagelos son estructuras complejas formadas por muchas proteínas, varias de las cuales se encuentran bien caracterizadas en bacterias modelo como *Escherichia coli*, *Vibrio spp.* y *Salmonella spp.* Sin embargo, una proteína pequeña asociada al cuerpo basal de la estructura del flagelo, llamada FliL, no ha sido estudiada en detalle y se desconoce con exactitud su función. En *E. coli*, FliL se localiza en la base de la estructura flagelar y parece contribuir a la estabilidad del motor cuando aumenta la fuerza de torque.

*B. diazoefficiens* posee un candidato *fliL* asociado a cada sistema flagelar: *fliL<sub>sub</sub>* al subpolar y *fliL<sub>lat</sub>* al lateral. Para estudiar su función, se obtuvieron mutantes delecionales de cada gen y se evaluaron parámetros fenotípicos asociados a la natación, como producción de flagelinas, movimiento en medios semisólidos y velocidad de nado en medios líquidos. Ambos mutantes expresaron las flagelinas FliC y LafA (correspondientes al sistema subpolar y lateral, respectivamente), y mostraron los filamentos correctamente formados y ensamblados. En agar semisólido, las cepas tuvieron comportamientos diferentes, estableciéndose la secuencia  $\Delta fliL_{sub} > \text{salvaje} > \Delta fliL_{lat}$  para el diámetro de los halos de natación. La mayor movilidad en  $\Delta fliL_{sub}$  resultó novedosa, ya que no hay ningún reporte similar indicando este fenotipo de movilidad aumentada.

Dado que la cepa de estudio presenta dos sistemas flagelares, se realizó una segunda mutación sobre ambas mutantes *fliL* eliminando los genes que codificaran las flagelinas propias del otro sistema flagelar. Al evaluar la natación en medio semisólido, se observó que la cepa  $\Delta lafA/\Delta fliL_{sub}$  ( $\Delta fliL_{sub}$  sin filamentos laterales) nadó menos que su cepa parental ( $\Delta lafA$ ), demostrando que el efecto neto de la mutación en *fliL<sub>sub</sub>* se corresponde con una disminución del halo de movilidad. Ello, junto con otros indicios, indicarían que la mayor movilidad de  $\Delta fliL_{sub}$  podría deberse a una mayor expresión del sistema flagelar lateral. Como contrapartida, la cepa  $\Delta fliC/\Delta fliL_{lat}$  ( $\Delta fliL_{lat}$  sin filamento subpolar) se mantuvo inmóvil en agar semisólido, pese a la presencia de flagelinas laterales en el medio extracelular. Estos resultados, junto con predicciones de topología *in silico*, indicarían que las proteínas FliL cumplen funciones diferentes en cada sistema flagelar.

Por otro lado, mediante el tracking de células individuales en medio líquido hemos obtenido parámetros natatorios como la velocidad de nado y las trayectorias. El análisis preliminar de las trayectorias indicaría que aquellas bacterias que presentan mayor velocidad de natación no necesariamente avanzan más rápido en medios semisólidos. Además, hemos observado aportes diferenciales de cada sistema flagelar y de cada proteína FliL con el agregado de agentes viscosantes a los medios líquidos.

En la actualidad, estamos analizando el rol de cada una de estas proteínas FliL sobre movimientos en masa (*swarming*) en un sistema heterólogo (*E. coli*), e intentando establecer su localización celular mediante microscopía de fluorescencia, utilizando proteínas de fusión a GFP y/o mCherry.



## Estrategias adaptativas de *Bradyrhizobium diazoefficiens* a la vida en el suelo: estudios de los estados natatorio y sésil.

Adriana Gabriela López Guerra

*Bradyrhizobium diazoefficiens* es un rizobio frecuentemente aplicado como inoculante debido a su capacidad de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con plantas de soja (*Glycine max*). Este microorganismo es un habitante normal de la microbiota del suelo, siendo capaz de desplazarse por natación entre los poros del suelo y colonizar las superficies de las partículas bióticas y abióticas del mismo. Para caracterizar algunos determinantes bacterianos de estos procesos, en este trabajo estudiamos el rol de los flagelos y los polisacáridos extracelulares (EPS) en la colonización de granos de arena.

Para estudiar la adhesión al sustrato, suspensiones de granos de arena en medio nutritivo se depositaron entre porta y cubreobjetos, dichos sistemas se inocularon con rizobios y se mantuvieron en cámaras húmedas a 28° C por 7, 14, 21 y 28 días a fines de poder ser analizados a través de microscopía. Las cepas de *B. diazoefficiens* USDA 110 (cepa salvaje), *B. diazoefficiens* USDA 110  $\Delta$ laf (carente del flagelo lateral), y *B. diazoefficiens* USDA 110  $\Delta$ fliC (carente del flagelo subpolar), fueron marcadas con fluorescencia, lo que permitió su visualización microscópica sobre los granos de arena. El ensayo fue repetido 10 veces, obteniéndose un total de 3000 fotografías. A partir de la observación y análisis detallado de tales imágenes pudimos notar que, a los 7 días de incubación, se formaban pequeñas microcolonias sobre el sustrato. Luego, a partir de los 14 días, se observaron estructuras filamentosas de origen bacteriano que conectaban granos de arena próximos entre sí. Estas estructuras requirieron la presencia de EPS, ya que mutantes incapaces de sintetizarlos formaron escasos filamentos, y menos robustos. A tiempos mayores (21 y 28 días) las colonias bacterianas formaron estructuras alargadas y ramificadas, que requirieron la presencia de flagelos. Estas observaciones sugieren que hubo desplazamiento dependiente de flagelos sobre las superficies de los granos de arena. También hemos podido notar entre las desventajas del sistema que la humedad del mismo influye en las observaciones que se realicen.

En otra serie de experimentos, para estudiar la movilidad de los rizobios en los poros generados entre los granos de arena, empaquetamos jeringas con arena (columnas) e inoculamos los rizobios en la parte superior y luego de transcurrido el tiempo del experimento proceder al recuento obtenido desde el reservorio líquido en su base. Dicho sistema fue ensayado con diferentes medios de cultivo, así como metodologías de armado. Pese a que los resultados obtenidos hasta el momento muestran una gran dispersión, posiblemente atribuible a la heterogeneidad interréplica del soporte en este sistema, tenemos indicios de que los rizobios salvajes se recuperan del reservorio líquido luego de 4 días, mientras que mutantes carentes de flagelos que fueron co-inoculados con los salvajes no son recuperados en ese tiempo o se recuperaron en mucha menor proporción.

Estos resultados muestran que *B. diazoefficiens* es capaz de adherirse y moverse sobre los granos de arena, colonizarlos, e interconectarlos con filamentos. Dichos filamentos presentan fluorescencia y por ello consideramos que serían de origen bacterianos y estarían formados, al menos en parte, por EPS. No obstante, restan resolver dificultades provenientes de la heterogeneidad del sustrato elegido, y profundizar en los resultados hasta ahora obtenidos.

Ensayos recientes sugieren que la ausencia de ambos sistemas de flagelos (*B. diazoefficiens* USDA 110  $\Delta$ fliC $\Delta$ laf) y deficiencia de exopolisacáridos (*B. diazoefficiens* USDA 110  $\Delta$ exoB) podrían tener efectos en la adhesión al vidrio.

## Vacunación en neonatos, una estrategia posible contra pertussis

Pablo Martín Aispuro

Pertussis o tos convulsa es una enfermedad respiratoria causada por la bacteria Gram negativa denominada *Bordetella pertussis*, que puede afectar a individuos de todas las edades. Sin embargo, los cuadros de mayor gravedad se detectan en los lactantes menores de 1 año, siendo crítica la etapa neonatal hasta los 2 meses de edad en que reciben la primera dosis de vacuna contra pertussis. En la actualidad, diversas estrategias se han diseñado para revertir esta situación, siendo la inmunización de las embarazadas la más recientemente implementada en nuestro país (2012). Los datos recopilados hasta el momento muestran que esta estrategia, aunque con coberturas no muy adecuadas (60% aprox.), resulta de impacto en la reducción de la letalidad asociada a pertussis. La inmunización en los neonatos podría resultar una estrategia alternativa o complementaria, sobre todo para aquellos casos en que la vacunación maternal no se ha hecho efectiva. Esta estrategia ha sido menos explorada ya que el sistema inmune del recién nacido se ha caracterizado como primordialmente modulador de respuestas inflamatorias. Los recién nacidos sin embargo pueden montar una respuesta predominantemente de tipo Th2. Es en este contexto que me encuentro evaluando la inmunización neonatal como estrategia posible para pertussis. Empleamos para ello el modelo de protección con desafío intranasal en neonatos murinos con y sin inmunidad maternal contra pertussis. Los esquemas de inmunización se han diseñado teniendo en cuenta que a los 7 días de vida el ratón posee una madurez de su sistema inmune comparable a la del neonato humano. Utilizamos para estos ensayos vacunas comerciales acelulares (aP, perfil de proliferación de linfocitos T (Th2/Th17)) y celulares (wP, perfil Th1/Th2/Th17), así como formulaciones noveles basadas en vesículas de membrana externa (OMV-P, perfil Th1/Th2/Th17). En los neonatos sin inmunidad previa evaluamos la aplicación de una única dosis a los 7 días de nacidos o de dos dosis aplicando la segunda dosis a los 14 días post primera inmunización. Cuando ensayamos dos dosis aplicamos esquemas con un único tipo de vacuna o combinado. Para evaluar la efectividad de los distintos tratamientos se realizaron desafíos con dosis subletales del agente etiológico con posterior evaluación de la colonización bacteriana en los pulmones de los animales tratados. Estos ensayos permitieron evidenciar que, en los esquemas de una única dosis, la vacuna aP resulta la más eficaz ( $p < 0.05$ ). Para los esquemas de dos dosis, los que incluyen una dosis de aP y una segunda dosis con OMV-P o wP muestran los mejores resultados de protección ( $p < 0.05$ ). La lisis por complemento parece ser uno de los mecanismos efectores responsables de la eliminación del patógeno. En el caso de los ratones con inmunidad previa, detectamos que la protección es dependiente del tipo de vacuna utilizada en el esquema maternal y en la dosis neonatal. Detectamos además que la transferencia de la inmunidad maternal perdura por más de 30 semanas luego de la última dosis aplicada en la madre. Más aún, la inmunización neonatal aplicada en la camada de crías nacidas luego de la semana 30 post última dosis maternal, sigue siendo efectiva. Todos los resultados alcanzados muestran que la inmunización neonatal resultaría una estrategia posible de ser aplicada en individuos naïve o con inmunidad maternal.

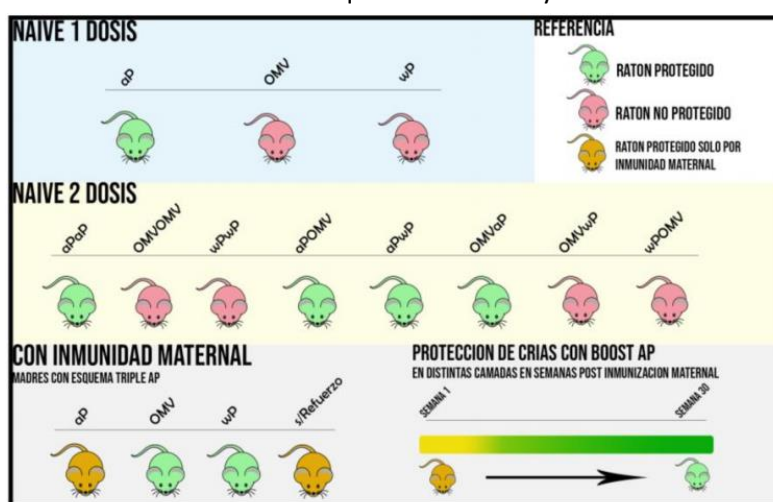


Figura: resumen de protección en los distintos grupos de tratamiento. Las leyendas indican los niveles de protección.

## Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de *Sinorhizobium meliloti* en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de Alfalfa

Ezequiel G. Mogro

El nitrógeno es uno de los componentes más importantes para el crecimiento de las plantas, implicado en la composición de ácidos nucleicos, proteínas, azúcares aminorados y compuestos aromáticos heterocíclicos. Sin embargo, la baja disponibilidad de nitrógeno asimilable en ambientes edáficos hace que sea uno de los factores limitantes en la producción vegetal intensiva. Así, el uso de fertilizantes químicos es una de las prácticas más comunes en el campo para aumentar la producción agrícola, pero conlleva un fuerte impacto en el ambiente, ya que su obtención y uso provoca riesgos ecológicos tanto en los suelos, como en el aire y agua. Por otro lado, debido al continuo crecimiento poblacional y consumo humano, se prevé un aumento en la demanda de alimentos durante, al menos, los próximos 30 años, volviéndose cada vez más urgente la necesidad de mejorar las capacidades de producción en un marco de preservación del recurso suelo y de sostenibilidad ambiental.

Una de las alternativas a la fertilización química es la utilización de rizobios como biofertilizantes. Los rizobios son  $\alpha$ - y  $\beta$ -Proteobacterias con la capacidad de fijar  $N_2$  como amonio cuando están asociados simbióticamente con raíces de plantas leguminosas. Si bien la fijación de nitrógeno se produce en estructuras radiculares especializadas (nódulos fijadores de nitrógeno), estas bacterias también tienen una etapa de vida libre en la que se hallan en mayor concentración en la rizosfera, definida como el volumen de suelo afectado directamente por las raíces de las plantas.

La existencia en el suelo de cepas nativas que presentan una mayor competitividad y menor capacidad de fijación de nitrógeno disminuye en muchos casos la eficiencia de los inoculantes. Por lo que es importante enfocar el estudio tanto en el desarrollo del conocimiento de los mecanismos que actúan en etapas tempranas de la interacción con la raíz, como en el desarrollo de productos comerciales que preserven en los microorganismos un fenotipo de competición por la colonización radicular y maximicen su supervivencia en sus formulaciones.

Para esto, nuestro laboratorio dispone de una biblioteca de mutantes de *E. meliloti*, un rizobio capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas, entre las que se encuentra *Medicago sativa* que es utilizada como planta modelo en nuestros estudios. Estos mutantes fueron generados mediante la tecnología de mutagénesis etiquetada por firmas (STM, *Signature Tagged Mutagenesis*), por lo que cada uno lleva una marca genética que permite identificarlo y cuantificarlo en ensayos realizados con mezclas de mutantes utilizando para esto técnicas de secuenciación masiva.

En el marco de mi plan de doctorado, se seleccionarán cepas de un subgrupo de estos mutantes que, en ensayos previos, mostraron un fenotipo alterado en la competencia por la colonización rizosférica y en la sobrevivencia en formulaciones de inoculantes tipo turba y líquidos. Los objetivos de este trabajo se centran en continuar con la caracterización fenotípica de mutantes seleccionados, evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes afectados en los mutantes en la competitividad por la colonización radicular, así como determinar el patrón temporal de su expresión a lo largo de la colonización, y evaluar diferentes condiciones in vitro que generen un estado inducible de alta competitividad por la colonización rizosférica y la ocupación de nódulos.

## Vectores de transmisión de *citrus psorosis virus* (CPsV)

Melina Ailin Simeone

*Citrus psorosis virus* (CPsV) es el miembro tipo de la familia *Aspiviridae*, constituida por 7 miembros de los cuales 5 son transmitidos por el hongo de suelo *Olpidium spp.*, indicando a este hongo como probable transmisor de la enfermedad. Para determinar su presencia en raíces de cítricos, se realizaron extracciones de raíces jóvenes de plantas de campo de la zona de Concordia, Entre Ríos, que presentaban síntomas de CPsV. Estas raíces fueron teñidas con trypan blue, observándose al microscopio óptico la presencia del hongo bajo la epidermis radicular. Resta confirmar estas observaciones y asociarla con la infección viral.

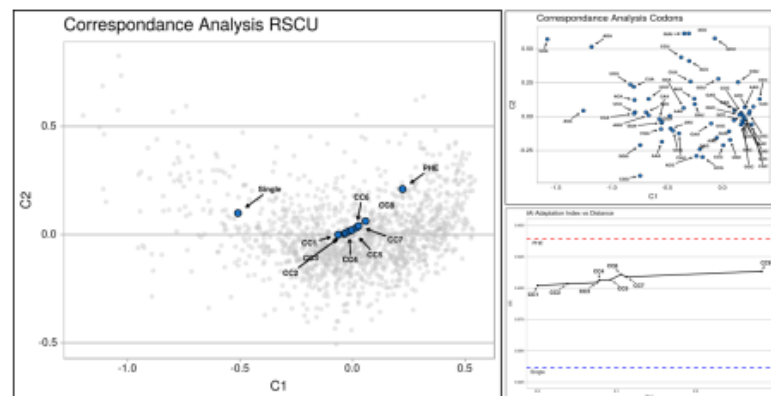
Existen viejos reportes que indicarían que la enfermedad psorosis de los cítricos, causada por CPsV, se transmite naturalmente por un vector del tipo insecto alado. Esas publicaciones presentan experimentos realizados en Argentina y Estados Unidos, sugiriendo un insecto picosuctor como vector del virus. Por esto hemos iniciado los ensayos de transmisión con una colonia del áfido *Toxoptera citricida*, libre de virus, que fue alimentada en un plantín de naranjo dulce infectado con CPsV. Después de 72 horas, los áfidos fueron pasados a un plantín sano para la transmisión del virus. Hasta el momento, no se han observado síntomas ni se ha detectado el virus en estas plantas, por lo que seguiremos intentando en ensayos posteriores disminuyendo los períodos de adquisición e inoculación.

Actualmente el método de diagnóstico de psorosis para la certificación de plantas cítricas es el indexing biológico. Este método consiste en inocular plantas sensibles al virus con tejido de las plantas que se desea diagnosticar y observar síntomas a lo largo de varias brotaciones de las plantas sensibles. Este método demora dos años en arrojar resultados, retrasando principalmente la certificación de plantas semilleras y el ingreso al mercado de nuevas variedades. Para su reemplazo, o como alternativa al método tradicional, estamos aplicando la técnica de RT-qPCR a un gran número de muestras para su valoración y validación como método de diagnóstico. En las primeras 200 muestras de cítricos analizadas, y en paralelo con el indexing biológico, hemos encontrado un índice kappa de Cohen de  $0,90 \pm 0,07$ , indicando una correlación excelente entre ambos métodos. Ello permitiría en un futuro reemplazar el indexing biológico por técnicas de PCR en tiempo real.

## Adaptación del uso de codones en genomas procariotas

José Luis López

Los genomas procariotas están constituidos en su mayoría por secuencias codificantes de proteínas, las cuales al mutar pueden provocar cambios no sinónimos en las secuencias aminoacídicas, y generar así diversidad en la secuencia, estructura y función proteica, o bien cambios sinónimos que no alteran la secuencia aminoacídica, ya que generan codones sinónimos codificantes del mismo aminoácido. ¿Cuál es el efecto de estas mutaciones sinónimas? El código genético es degenerado y la información nucleotídica que codifica a los 20 aminoácidos más frecuentes consiste de 64 codones diferentes, de los cuales 3 sirven como señales de finalización de la traducción en el ribosoma, y 2 de ellos sólo codifican un aminoácido (AUG codifica Metionina y UGG codifica Triptofano). Los restantes 59 codones codifican de manera redundante los otros 18 aminoácidos. Algunos aminoácidos son codificados por 2, 3, 4 ó 6 codones sinónimos, alternativamente. Sin embargo, en cada aminoácido, la frecuencia de uso de cada uno de estos codones sinónimos no es la misma. Esto lleva a definir al uso de codones (UC), que es la proporción de uso cada codón sinónimo. La variabilidad que existe en la secuencia nucleotídica codificante de estos 18 aminoácidos permite investigar cómo es el UC entre genomas y entre genes en un mismo genoma. Se conoce que los diferentes genomas presentan UC distintos (típicos) para cada organismo. Por ejemplo, un ser humano presenta un UC muy diferente de un virus o una bacteria, aunque ciertos virus y bacterias intracelulares adaptan su UC de codones al del hospedador. Adicionalmente al UC típico de un genoma, existen variaciones intragenómicas donde se observa que los genes que tienen altos niveles de expresión presentan un UC particular dentro del genoma, y que los elementos genéticos móviles presentan otro tipo de sesgo en el UC. El UC en los genes de mayor expresión en la célula se adapta mejor a los pools de tRNAs presentes en la célula, y se sugiere que esto se debe a una mayor eficiencia o precisión en la traducción. Por lo tanto, los cambios sinónimos también están sujetos a la selección cuando optimizar la traducción resulta importante para el fitness celular. Además, se ha sugerido un modelo donde existe un balance entre el efecto de las mutaciones y el de este tipo de selección traduccional en los genomas, sin conocerse cómo operan estos efectos a lo largo de la evolución para dar lugar a las secuencias de los genomas actuales. Con el objetivo de avanzar en la comprensión de estos procesos, analizamos el uso de codones en genomas pertenecientes a distintas familias procariotas, y mediante el cálculo de genes core (genes comunes a distintos genomas en una filogenia procariota dada) de distinto grado de ancestralidad y el análisis del UC sobre estos conjuntos de genes, pudimos analizar la adaptación de los genes con el tiempo y compararlo al UC del pool de los genes altamente expresados y accesorios (genes presentes en sólo algunas cepas de una especie). El análisis de 27 familias bacterianas y 2 familias de arqueas nos permitió analizar cómo los organismos pertenecientes a distintas taxa y contenidos GC, optimizan su uso de codones en relación a la población de tRNAs presente en cada célula hospedadora. Asimismo, pudimos analizar esto en relación a las interacciones codón-anticodón conocidas y el examen individual por familias de codones nos permitió identificar patrones universales de selección sobre el UC, en contraposición con el efecto atribuible a las mutaciones. Este tipo de estudios abre una nueva perspectiva de cara a evaluar cómo evolucionan las secuencias codificantes procariotas, el contenido GC de los genomas y el rol que tiene este tipo de variaciones en la optimización de la maquinaria traduccional.



Analisis de uso de codones en *Bifidobacterium longum*

## Producción y manejo de plantas para Ensayos

Claudio Mazo

Dos tercios de los grupos y proyectos de investigación del IBBM se dedican a comprender las interacciones entre microorganismos y las plantas. La producción y cuidado de material vegetal es un eslabón fundamental para los distintos ensayos que se realizan en el instituto.

En esta oportunidad hablaré sobre sobre las distintas variedades de plantas que se producen y sus cuidados, desde la elección y formulación de sustratos, germinación y pasando por todos los estadios hasta ser utilizadas. También comentaré sobre infraestructura relacionada a cultivos (cámaras, invernaderos) y sus condiciones que pueden alcanzar para algún ensayo. Se pondrá gran atención en los cuidados y precauciones para trabajar en un invernadero con el fin de prevenir el ingreso de plagas y enfermedades

Figura. corresponde a plantines de tomate



## **Caracterización funcional de genes involucrados en la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli***

Carla Roda

*Phaseolus vulgaris* es una leguminosa capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con la bacteria *Rhizobium etli*. Este proceso implica una compleja vía de transducción de señales que comienza con la activación jerárquica de factores de transcripción que desencadenan el programa genético requerido para la formación del nódulo, donde ocurre la fijación del nitrógeno. Las subunidades A1 y C1 del factor de transcripción heterotrimérico NF-Y y el factor de transcripción de la familia GRAS SIN1, forman un complejo transcripcional requerido para la infección bacteriana y la organogénesis del nódulo. Previamente se mostró que el silenciamiento de NF-YC1 y SIN1 afecta la expresión de genes del ciclo celular en la transición G2/M. Para determinar los targets directos de los factores NF-Y y SIN1 se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina seguida de PCR usando primers de las regiones promotoras de ERN1 y ERN2 (dos factores de transcripción que son regulados directamente por NF-YA en *Medicago truncatula*) y de genes del ciclo celular, tales como CDC25, CDC2, WEE, CYCP y CYCC de *P. vulgaris* que contienen CCAAT-box, la cual es reconocida por NF-Y. Los resultados de CHIP-PCR mostraron que el promotor del gen de la ciclina P (PvCYCP) estaba enriquecido en el inmunoprecipitado de plantas que expresan FLAG-NF-YC1 con respecto a plantas control, sugiriendo que PvNF-YC1 se une a la región promotora y activa la expresión de PvCYCP. El gen ortólogo de PvCYCP en *Medicago truncatula* se expresa principalmente en la zona meristemática del nódulo y en el meristema de la raíz, sugiriendo que podrían jugar un rol en la reactivación del ciclo celular para iniciar la organogénesis del nódulo. Para dilucidar la función biológica del gen PvCYCP en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno, estamos utilizando una estrategia de RNAi para reducir los niveles de mRNA de PvCYC en raíces de porotos seguida de estudios fenotípicos. Los estudios de CHIP-PCR serán complementados con estudios de CHIP-seq. Para ello se realizarán bibliotecas para secuenciación masiva a partir de que sobreexpresan NF-YA1, NF-YC1 o SIN1 fusionados al epítopo FLAG, inoculadas con la cepa más eficiente SC15. De esta forma se identificarán los promotores que son reconocidos por cada uno de los factores de transcripción en estudio. Una vez obtenido el material de DNA y verificada su calidad, se procederá a la construcción de bibliotecas para su secuenciación.

Por otro lado, para determinar el rol de las moléculas de señalización de las bacterias en la activación de los genes de respuesta a la simbiosis se realizaron estudios de transcriptómica. Para ello se utilizaron plantas inoculadas con cepas mutantes deficientes en la producción de Nod Factor, exopolisacáridos o lipopolisacáridos. Estos estudios permitieron identificar transcritos diferencialmente acumulados en etapas tempranas de la simbiosis. A partir de esta información se identificaron dos genes, que codifican una proteína con dominios XH/XS y una methyl CpG binding protein, respectivamente, ambas involucradas en el silenciamiento génico transcripcional mediado por siRNAs. En el presente trabajo proponemos asignar funciones biológicas a estos genes mediante genética reversa y caracterización fenotípica.

## Caracterización molecular de una cepa virulenta del virus Junín

Pablo D. Thomas

El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, una enfermedad endémica de la pampa húmeda coincidente con el hábitat de su reservorio, el ratón maicero (*Calomys musculus*).

JUNV es un arenavirus de simetría helicoidal con un diámetro de 70-120 nm compuesto por 6 proteínas, una envoltura lipídica y un genoma de casi 11 Kb conformado por dos moléculas de ARN monocatenario denominadas L y S de polaridad negativa. Cada una de estas moléculas codifican dos genes dispuestos en sentidos opuestos y una región intergénica estable. Mientras L codifica la ARN polimerasa ARN dependiente (L) y la proteína de matriz (Z), S codifica el precursor de las glicoproteína (GPC) y la proteína de nucleocápside (N).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la cepa patogénica 3441 (P) produce una infección con marcadas diferencias en modelos *in vitro* comparada con la cepa vacunal Candid 1 (C#1). Por ejemplo, la cepa patogénica mostró una modulación en la muerte celular programada (apoptosis) generando una reducción en el índice de apoptosis de las células dendríticas plasmacitoides como también se ha visto una diferencia en la modulación de ciertos receptores, como los de la vía TAM, que es distinta para una cepa como para otra. A raíz de esto, se decidió estudiar la base molecular de estas diferencias. Como no se conoce la secuencia genómica de P, se determinó comenzar por su completa secuenciación a fin de poder realizar un análisis comparativo con la secuencia conocida de C#1. Para ello, se generaron fragmentos superpuestos por RT-PCR utilizando primers basados en la secuencia de C#1.

A la fecha, se han logrado secuenciar cuatro de los seis fragmentos diseñados de S observándose un alto grado de homología tanto con C#1 como con otras cepas. Sin embargo, la mayoría de las relativamente pocas diferencias entre la secuencia de P y C#1, fueron también encontradas en las secuencias de otras cepas patogénicas sugiriendo que estas podrían ser determinantes moleculares de patogenicidad. Este análisis se encuentra en curso e incluye una segunda secuenciación a partir de nuevo ARN para descartar mutaciones generadas artificialmente.

Se espera terminar con la secuenciación en el curso de los próximos dos meses para poder realizar un análisis bioinformático más exhaustivo, que incluya desde relaciones evolutivas hasta la comparación funcional de genes.



## Caracterización funcional de una diguanilato ciclasa exclusiva de *Bordetella pertussis*

Federico Zacca

*B. pertussis* es una bacteria patógena que coloniza las vías respiratorias del humano, siendo el agente causal de la tos convulsa. A pesar de ser una enfermedad prevenible por vacunación se ha detectado un resurgimiento de la misma en las últimas décadas, que puede atribuirse en parte a la capacidad de la bacteria de persistir en el hospedador de forma asintomática. En este contexto se puede pensar, entre otras, en dos posibles estrategias del patógeno para evitar ser eliminado: la formación de biofilm en el tracto respiratorio y la capacidad de vivir dentro de células del hospedador.

El segundo mensajero c-di-GMP (diguanylato cíclico) es una molécula que participa en la regulación de numerosos procesos en bacterias, entre los que se destaca la transición entre vida planctónica y sésil (formación de biofilm). También se ha descrito su importancia en la resistencia a estrés oxidativo o bajo pH. Nuestro grupo ha demostrado que este segundo mensajero regula la formación de biofilm en *Bordetella bronchiseptica*. Las concentraciones intracelulares de c-di-GMP se encuentran determinadas por la actividad de dos tipos de proteínas: diguanilato ciclasas, que lo sintetizan, y fosfodiesterasas, que lo degradan. Es posible identificar la presencia de estas proteínas en el genoma de una bacteria debido a que presentan dominios conservados: GGDEF en las diguanilato ciclasas y EAL en las fosfodiesterasas, denominados de esta manera en referencia a los aminoácidos conservados en el sitio activo.

En este marco, nos propusimos abordar el estudio del rol de c-di-GMP en la regulación de diversos procesos en *B. pertussis*. En el genoma de *B. pertussis* Tohama I se puede identificar la presencia de 5 proteínas GGDEF, 1 proteína EAL y 2 proteínas EAL/GGDEF. En particular nos interesamos en una proteína con dominio GGDEF, BdcK. La misma solo se encuentra en *B. pertussis* y está altamente conservada en los aislamientos clínicos secuenciados hasta el momento, lo que sugiere un posible rol biológico.

Para avanzar en la caracterización de esta proteína se construyeron dos cepas de *B. pertussis*: una cepa mutante que no expresa BdcK y otra que sobreexpresa la proteína. Se evaluó la capacidad formadora de biofilm de estas cepas en placas multipocillos por tinción con cristal violeta y no se observaron diferencias respecto a la cepa salvaje. Por otra parte, en vistas de la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir en un entorno ácido como el que se encuentra dentro de un macrófago y de resultados previos de nuestro grupo que sugieren un rol de c-di-GMP en la resistencia al estrés ácido en *B. bronchiseptica*, nos planteamos estudiar si la ausencia y/o la sobreexpresión de BdcK afecta la capacidad de *B. pertussis* de adaptarse a un estrés de este tipo. Con este objetivo realizaremos dos tipos de ensayos: curvas de crecimiento a pH ácido y de supervivencia al estrés ácido.

Las diguanilato ciclasas requieren la dimerización de dos dominios GGDEF para la catálisis. En general, este tipo de proteínas presentan dominios accesorios que facilitan la dimerización del dominio catalítico. Analizando la secuencia de BdcK puede observarse junto al dominio GGDEF la presencia de un dominio GAF, comúnmente asociado al sensado de señales del entorno. Basados en esta observación, construimos una proteína híbrida con el dominio GGDEF de BdcK en el C-terminal y un dominio de dimerización en el N-terminal. Se propone próximamente evaluar su actividad in vivo para evaluar si el dominio GGDEF de BdcK es capaz de sintetizar c-di-GMP.

## Caracterización genómica, simbiótica y taxonómica de rizobios noduladores de *Desmanthus virgatus* aislados de diferentes regiones edafoclimáticas de Argentina

Nicolás Emilio Zuber

La producción ganadera del centro-norte de la República Argentina utiliza las leguminosas forrajeras como fuente principal de nitrógeno de la dieta animal. Por otro lado, el incremento de las zonas agrícolas ha desplazado a la ganadería hacia zonas marginales, donde las leguminosas forrajeras disponibles y adaptadas a esas condiciones son escasas. Una estrategia viable para mejorar la disponibilidad de forraje es el cultivo de especies leguminosas nativas con reconocido potencial forrajero, adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas. *Desmanthus virgatus* (*sensu lato*) es una especie distribuida en el centro-norte de nuestro país, con buenas características agronómicas, aunque con un potencial subaprovechado entre otras causas debido a una simbiosis con rizobios que ha sido aún poco caracterizada con las especies y variedades locales.

Atendiendo a las consideraciones precedentes y al valor para el ámbito local de contar con un sistema simbiótico eficiente para zonas agrícolas marginales, abordaremos de manera sistemática la caracterización genómica, taxonómica y funcional de los microsimbiontes del género *Desmanthus* existentes en suelos argentinos.

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos establecido una colección de más de un centenar de aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* provenientes de 10 ambientes diferentes de 8 provincias argentinas. La caracterización fenotípica de los aislamientos evidenció una marcada diversidad genómica y capacidad simbiótica entre las cepas recuperadas de nódulos. A partir de esos resultados, y con el propósito de comprender a nivel molecular las bases y la potencialidad de esta simbiosis, comenzaremos por analizar y clasificar la diversidad presente en la colección por medio de diferentes métodos que incluyen espectrometría de masas MALDI-TOF, FT-IR y análisis de huella digital por PCR. A partir de los resultados obtenidos se elegirán 5-10 aislamientos para su secuenciación genómica completa, seleccionados según su diversidad genética y características simbióticas en el laboratorio y a campo. Posteriormente analizaremos los genes vinculados a la simbiosis, y el conjunto de genes conservados (genoma core) como insumo para estudios taxonómicos en los que realizaremos inferencias filogenéticas robustas de modo de posicionar a los simbiosiontes de *Desmanthus* dentro del conjunto de los rizobios. Los resultados disponibles hasta el momento muestran una heterogeneidad muy grande de simbiosiontes que incluyen sinorizobios, mesorizobios, y rizobios, todos con capacidad de generar una simbiosis efectiva con *Desmanthus*. Desconocemos aun los determinantes genéticos comunes que, desde germoplasmas tan diversos, soportan en todos los casos asociaciones compatibles y eficientes.

En relación a los estudios que enfocarán el análisis de fenotipos simbióticos, y en particular los orientados a explorar eventuales fenómenos de coadaptación rizobio-planta, realizaremos ensayos de inoculación cruzada de semillas de diferentes poblaciones de *Desmanthus* con rizobios recuperados de diferentes suelos (el propio, y el correspondiente a la geografía de plantas de otra población). Se evaluará el número de nódulos/planta (en los tratamientos directos y cruzados), y se analizará el tipo de rizobio que ha nodulado cada población de plantas con la intención de evaluar si existen efectos específicos de selección entre simbiosiontes.

A través de los estudios genómicos y los ensayos simbióticos descriptos esperamos avanzar en el reconocimiento de cepas de elite para la inoculación de *Desmanthus* proveniente de diferentes ambientes, identificar eventuales efectos de preferencia simbiótica asociados a poblaciones particulares, con información genética del microsimbionte que permita comenzar a explorar las bases (y el manejo) de cada uno de los efectos observados.

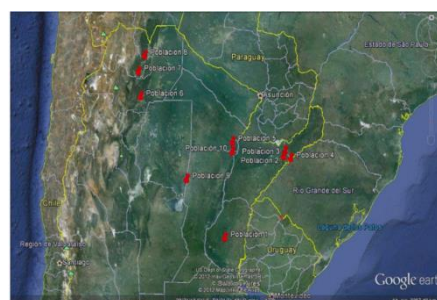


Figura 1.1: Sitios de colecta de las poblaciones del complejo *D. virgatus*.