



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA GENÓMICA

Funcionalidad de genes esenciales en el cromosoma secundario p42e en  
*Rhizobium etli* CFN42

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. SOFÍA CAROLINA MARTÍNEZ ABSALÓN

DIRECTOR DE TESIS  
DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR  
DRA. MARÍA DE LOURDES GIRARD CUESY  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM  
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MOR.

ABRIL 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Sofía Martínez Absalón recibió durante el Doctorado el apoyo de una beca (420679) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). La investigación presentada en esta tesis tuvo apoyo financiero parcial a través del apoyo 255365 del Fondo SEP-CONACYT, otorgado a David Romero Camarena.

Pongamos una puerta donde antes no había una.  
**Oliver Jeffers**

Doesn't really matter where you come from  
We are home.  
**AURORA**

La revolución será feminista o no será  
**Ana Tijoux**

Sergio, las palabras no hacen falta aquí, o tal vez no las hayan suficientes. Ya te lo he dicho, si tratara de explicar a este mundo el hombre que eres, no lo creerían.

Helena, tú no sabes lo aburrido del mundo antes de que tú llegaras.

Carmen, llevo siempre en mí tu fortaleza. Me he reinventado tantas veces con tu ejemplo, tu amor y tu coraje revolucionario, todo junto llena mi mundo.

Jorge, nadie me ha sabido ver mejor que tú en este mundo.

Ceci, tu determinación, tu fortaleza, tu éxito, han sido siempre para mí un eje en este mundo.

Valentina, en todos estos años que te he visto crecer le cayeron muchos veintes a mi mundo, sé que no te hace sentido, pero sé que lo entenderás un día.

Lucio, tú eres la cereza del pastel, de esta mi familia, mi mundo.

David, gracias. Eres la persona más comprometida con la ciencia que he conocido, pones siempre por delante a tus alumnos, los encaminas y les das las herramientas necesarias para poder desarrollarse en este cambiante mundo de la ciencia, que, como sabemos, tuvo tiempos mejores. En esta actual situación, tú eres de los pocos dignos que se han levantado para alzar la voz y defender el quehacer científico. He aprendido tanto de ti, y sé que me seguirás enseñando mucho más.

Susy, gracias. Eres de esas pocas mujeres científicas que han sabido abrirse paso en el mundo de la ciencia. Me llevo tu ejemplo conmigo y te agradezco mucho las palabras de aliento, reconocimiento a mi trabajo y crecimiento como científica.

Gracias Pablo y Alex por todos los comentarios y aportaciones a este trabajo.

Gracias Maluye y José Luis por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindarme toda su experiencia, conocimientos y comentarios que enriquecieron este trabajo

Carmen, gracias, sabes que soy la más suertuda de conocerte, que hayas llegado a trabajar al lab, en un momento tan crucial, no solo en el desarrollo de este trabajo, sino en mi vida, fue una gran fortuna (me aterra pensar que habría pasado si no hubiera tenido esa suerte). Tu apoyo incondicional, tu amistad, tu experiencia y tu trabajo han sido fundamentales para mí.

Araceli, gracias por todo tu intenso trabajo, eres un gran ejemplo de disciplina y trabajo arduo.

Laura, gracias, tú y todos en el lab lo saben perfectamente, pero tengo que decirlo, sin ti este trabajo no habría sido posible. Pero más aún gracias por toda tu amistad incondicional y por ser la gran mujer que eres.

Gracias Osam y Rogelio, saben que su apoyo, su ejemplo y todas sus enseñanzas y experiencias, fueron relevantes para este trabajo. Pero sobre todo para continuar con los retos que vienen. Les agradezco por toda su amistad y todos los buenos momentos que pasamos

Fabiola, Marta y Mariana, muchas gracias por su amistad y todos sus buenos consejos, son grandes ejemplos a seguir para mí.

Gracias Oussama, Rafael, Daniel, Julio, Estefanía y Antonio por todas las charlas científicas y no tan científicas y todos los buenos momentos que compartimos.

Gracias a Choura, Ángeles, Mac, Charly, Sandra, Daniela, Rafael, Ayari, Lulú y Otto por apoyarme en el desarrollo de este trabajo y por abrirme las puertas de sus laboratorios, brindándome todo su apoyo, experiencia y conocimiento.

Gracias a CONACYT por la beca otorgada. Gracias a DGAPA y al Programa de Ingeniería Genómica del CCG por los apoyos recibidos para asistir a congresos.

# CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Crecimiento celular en bacterias con forma bacilar. El caso específico del crecimiento unipolar en Rhizobiales.....	3
División y determinación de polarización celular en alfaproteobacterias.....	3
Biogénesis de pared celular. El caso especial de Rhizobiales.....	8
Sistemas de dos componentes y su esencialidad en bacterias.....	10
Antecedentes particulares de este trabajo.....	12
Justificación.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Estrategia Experimental.....	16
Resultados.....	18
Artículo Publicado.....	19
Martínez-Absalón, S., Guadarrama, C., Dávalos, A., and Romero, D. (2022). RdsA Is a Global Regulator That Controls Cell Shape and Division in <i>Rhizobium etli</i> . <i>Front Microbiol</i> 13, 858440. doi:10.3389/fmicb.2022.858440.....	19
Resultados adicionales.....	21
Evaluación de la capacidad de control en la expresión de genes de sistemas inducibles de expresión en <i>R. etli</i> .....	21
La depleción en la expresión del gen RHE_PE00001 genera cambios en la forma y división celular de <i>R. etli</i> .....	23
Discusión.....	28
Conclusiones.....	33
Perspectivas.....	34
Localización de posibles RR de RdsA.....	34
Efecto de la mutante cKD24 en la fisiología de <i>R. etli</i> .....	34
Materiales y Métodos.....	36
Construcción de cepas.....	36
Construcción de cepas de expresión condicional con genes reporteros.....	36
Sistema replicativo inducible por <i>lac</i> .....	36
Sistemas replicativos inducibles por de Q y Ant.....	36

Sistema replicativo inducible por tau.....	36
Construcción de sistemas de expresión condicional integrativos en Rhizobiales..	36
Sistemas integrativos inducibles por Q.....	39
Construcción de mutantes condicionales (cKD) en los genes RHE_PE00001, RHE_PE00024.....	39
Ensayos de actividad de los sistemas inducibles de Q y Ant utilizando como gen reportero mCherry.....	40
Ensayos de actividad de los sistemas inducibles tau y lac utilizando como gen reportero uidA.....	40
Ensayos de Microscopía.....	41
<b>Referencias.....</b>	<b>42</b>

## Resumen

Las alfaproteobacterias se dividen de forma asimétrica. Gran parte de los mecanismos de regulación, así como la maquinaria utilizada para llevar a cabo la división celular, se encuentran conservadas dentro del grupo de alfaproteobacterias. Sin embargo, cada grupo presenta diferencias específicas que responden a sus adaptaciones ambientales. Las Rhizobiales son un grupo distintivo dentro de las alfaproteobacterias por su crecimiento unipolar. Además, carecen del elongasoma, proteínas esenciales para el crecimiento y formación de la pared celular. *Rhizobium etli* CE3 es una bacteria fijadora de nitrógeno simbiote de frijol. *R. etli* CE3 contiene un cromosoma secundario, cuya estabilidad está dada por los genes esenciales RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024 (llamado *rdsA*). RHE\_PE00001 es una proteína hipotética conservada en Rhizobiales con un dominio de función desconocida (DUF 1612) y motivo de unión a DNA helix-turn-helix. RdsA es una histidina cinasa híbrida que forma parte de un sistema de regulación de dos componentes. Hasta el momento se desconoce el regulador de respuesta de la vía. En este trabajo caracterizamos la función de ambos genes esenciales en *R. etli*. La depleción en la expresión de RHE\_PE00001 generó cambios en la forma celular y alteraciones en crecimiento y división celular. Cerca del 24% de las células presentaron una forma redonda, que difiere a la forma bacilar de la cepa silvestre. Además, una fracción de las células (del 1-4% dependiendo de su forma celular) presentaron ramificaciones. Mientras que, casi el 7% de las células mostró filamentación. Las células redondas presentaron contenido genómico y fue posible observar diferencias en la división celular, tanto de células bacilares (57%), como de células redondas (29%). Las células bacilares presentaron alteraciones no solo al generar células redondas (13%), sino también al presentar crecimiento a través del polo viejo (cerca del 23%). El polo viejo en las células silvestres se encuentra inactivo para el crecimiento. Además, la sobreexpresión de RHE\_PE00001 también generó problemas en la determinación de forma celular. La sobreexpresión generó células redondas en un 23%, ramificaciones (en 0.1 a 1.6% dependiendo de su forma celular) y filamentación (2.4%). Estos resultados sugieren a RHE\_PE00001 como un gen esencial involucrado en la determinación de forma celular. Por otro lado, RdsA obtiene su nombre en este trabajo por “*rhizobium division and shape*”, RdsA mostró ser un regulador global involucrado en división celular y determinación de forma celular. La depleción de RdsA generó un cambio drástico en la forma celular, disminución en crecimiento y problemas en división celular. Las células depletadas en RdsA mostraron una forma redonda en cerca del 64% de las células. Las células redondas generaron células redondas con mayor frecuencia, en casi un 63%. Una fracción importante de las células bacilares (del 12-29% dependiendo de su origen celular) presentaron crecimiento a través del polo viejo. Además, algunas células (del 1-3%) presentaron crecimiento ectópico en varios polos celulares, generando ramificaciones. El análisis de RNAseq en las células depletadas en RdsA, mostró un cambio global en la expresión. La depleción de RdsA generó cambios en la expresión de genes involucrados en varios procesos biológicos esenciales. Se observó subexpresión en genes de división celular, biogénesis de pared celular, respiración oxidativa, traducción y motilidad. Adicionalmente, fuimos capaces de determinar que la homodimerización en RdsA es indispensable para llevar a cabo su función. Estos resultados sugieren que la depleción de RdsA podría generar problemas en la estabilidad y estructuración del divisoma, así como de la síntesis de pared celular. Esto nos permite proponer a RdsA como un regulador global involucrado en determinación de forma celular y división celular.

## Abstract

Alphaproteobacteria maintain cell division asymmetrically. The major regulatory mechanisms, as well as the machinery employed to carry out cell division, are conserved within the group of alphaproteobacteria. However, each group has specific differences, according to their life style. The Rhizobiales are a group distinctive among the alphaproteobacteria by their unipolar growth. In addition, Rhizobiales lack the proteins that constitute the elongasome complex, essential for cell wall biogenesis. *Rhizobium etli* CE3 is a bean symbiotic nitrogen-fixing bacterium. *R. etli* CE3 possesses a secondary chromosome, whose stability is explained by the possession of two essential genes, RHE\_PE00001 and RHE\_PE00024 (called *rdsA*). RHE\_PE00001 codes for a conserved hypothetical protein, consisting of a Domain of Unknown Function (DUF1612), conserved among the Rhizobiales, and a helix-turn-helix DNA-binding motif. *RdsA* codes for a hybrid histidine kinase protein, that is part of a two-component regulatory system. At the moment, the response regulator of the pathway is still unknown. In this work, we characterize the function of both essential genes in *R. etli*. The depletion in the expression of RHE\_PE00001 generated changes in cell shape and alterations in cell growth and division. About 24% of the cells showed a round cell shape, differing from the rod cell shape of the wild-type strain. Furthermore, a fraction of the cells (1-4% depending on their cell shape) showed branched cells. And almost 7% of the cells showed filamentation. The round cells presented genomic content, and it was possible to observe differences in cell division. The round cells generated bacillary cells (57%) and round cells (29%). The rod shape cells presented cell growth alterations, generating round cells (13%) and also showed growth through the old pole (about 23%). The old pole in wild-type cells is inactive for growth. In addition, the overexpression of RHE\_PE00001 also generates problems in cell shape determination. Their overexpression provoked round cells (23%), ramifications (in 0.1 to 1.6% depending on their cell shape), and filamentation (2.4%). These results suggest RHE\_PE00001 as an essential gene involved in cell shape determination. On the other hand, *RdsA* was named in this work after "rhizobium division and shape" and was characterized as a global regulator involved in cell division and cell shape determination. The depletion of *RdsA* generated a drastic change in cell shape, decreased growth, and cell division defects. *RdsA*-depleted cells showed a round shape in about 64% of the cells. Round cells generate round cells more frequently, by almost 63%. A significant fraction of the bacillary cells (12-29% depending on their cellular origin) grew through the old pole. In addition, some cells (1-3%) showed ectopic growth at various cell poles, generating branched cells. RNAseq analysis in *RdsA* depleted cells showed a global change in expression. *RdsA* depletion cells showed changes in expression in several essential biological processes. Downregulation was shown in genes for cell division, cell wall biogenesis, oxidative respiration, translation, and motility. Additionally, we were able to determine that homodimerization in *RdsA* is essential to carry out its function. These results suggest that the depletion of *RdsA* may affect the proper structuring of the divisome, as well as peptidoglycan synthesis. This allows us to propose *RdsA* as a global regulator involved in cell shape determination and cell division.

## Introducción

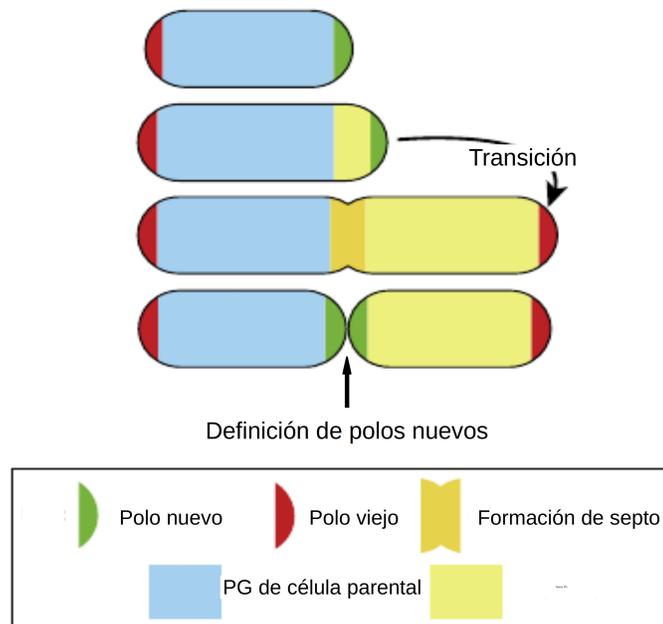
### **Crecimiento celular en bacterias con forma bacilar. El caso específico del crecimiento unipolar en Rhizobiales.**

En bacterias existe una estrecha relación entre forma celular, biogénesis de pared celular y división celular (Brown et al., 2011). Por ello es notable que bacterias que mantienen una misma forma bacilar, presenten diferentes tipos de crecimiento. De manera general, las bacterias bacilares pueden crecer, ya sea de manera lateral o bien manteniendo crecimiento a través de los polos celulares. Algunas bacterias con forma bacilar pueden crecer intercalando moléculas de peptidoglicano (PG) de manera dispersa a lo largo la pared lateral, como es el caso de *Escherichia coli* (Vollmer y Höltje 2001). Por otro lado, *Bacillus subtilis* también presenta un crecimiento lateral, pero este se da al intercalar moléculas de PG siguiendo un patrón en forma de espiral (Errington y Wu, 2017). El crecimiento polar en bacterias bacilares puede darse de manera bipolar, creciendo de manera simétrica por ambos polos de la célula, como es el caso del género *Corynebacterium* (Daniel y Errington, 2003). O bien, por un único polo, denominado este modo como crecimiento unipolar. Tal es el caso de *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens*, pertenecientes al orden Rhizobiales. El crecimiento unipolar se realiza a través de la polimerización de PG en un único polo celular, denominado polo nuevo. Mientras que el polo opuesto, denominado polo viejo, se encuentra inactivo para la polimerización de PG. La formación del septo se realiza en la parte media de la célula, lo que requiere el cese de crecimiento polar, y la transición de polimerización a la parte media celular. El siguiente ciclo de crecimiento procede a través de la incorporación de PG por el mismo polo nuevo generado en el ciclo anterior. El polo nuevo puede identificarse de manera sencilla, ya que es el polo que se ha formado durante el evento de septación (Fig. 1). La determinación del crecimiento unipolar en Rhizobiales se ha observado con detenimiento en las bacterias modelo *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, el proceso se observó a través de microscopía y tinciones fluorescentes en la pared de la célula (Brown et al., 2012), y en combinación con la localización con marcaje de fluorescencia a proteínas como FtsZ, claves para la formación del septo. De esta manera, ha sido posible determinar claramente el crecimiento unipolar y asimétrico en Rhizobiales (Cameron et al., 2014; Zupan et al., 2013). La manera en la que se desarrolla la distinción de los polos, es decir, la determinación de polaridad, en Rhizobiales es un amplio campo de investigación, que aún se mantiene abierto. No obstante, en secciones posteriores de este trabajo se profundizará más sobre el tema.

### **División y determinación de polarización celular en alfaproteobacterias**

El desarrollo de una maquinaria que permite la polarización de proteínas y distinción de los polos es necesario para la diferenciación celular presente en muchas alfaproteobacterias (Brown et al., 2011; Kysela et al., 2013). *Caulobacter crescentus* es una alfaproteobacteria que se ha convertido en el modelo por excelencia para el estudio de división celular asimétrica en bacterias. Si bien *C. crescentus* no mantiene crecimiento unipolar, la asimetría en su desarrollo es evidente, ya que al dividirse genera dos células con morfología y fisiología diferentes. La célula madre, comúnmente denominada célula sésil (debido a que se encuentra anclada a una superficie, por medio de una estructura denominada prosteca ó *stalk*), es la forma activa para división celular. Al dividirse, genera una célula móvil, que se encuentra inactiva para división celular y replicación. El ciclo reinicia a través de un fino sistema de regulación que desencadena la síntesis de una nueva prosteca, para la formación de la célula sésil con capacidad de división (Laub et al., 2002). Dentro de las proteínas claves

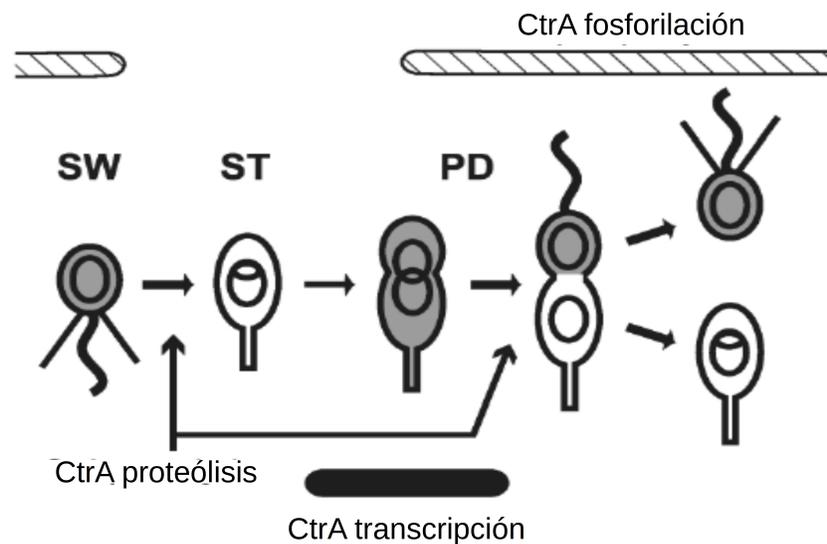
en la regulación de división celular en *C. crescentus* se encuentra el regulador maestro CtrA, que junto con la histidina cinasa (HK) CckA desencadenan una cascada de expresión de genes que permiten la diferenciación celular y la determinación de polarización celular (Mann et al., 2015).



**Figura 1. Crecimiento unipolar en Rhizobiales.** En Rhizobiales el crecimiento ocurre a través de un único polo denominado polo nuevo (en verde). El cual se encuentra activo para la polimerización de PG (en amarillo claro). Por otro lado el polo viejo (en rojo), se encuentra inactivo para la polimerización de PG. Durante la formación del septo el crecimiento unipolar se inactiva (Transición). La formación del septo, zona activa para la polimerización de PG (en amarillo oscuro), da lugar a la definición de los dos polos nuevos (verde) activos para la reanudación del siguiente proceso de crecimiento celular en ambas células. Figura modificada de (Cameron et al., 2015).

CtrA es una proteína clave para la coordinación de la división celular en alfa-proteobacterias. Específicamente, en *Caulobacter* se encuentra claramente documentada su actividad a lo largo del ciclo celular (Fig. 2). CtrA tiene una participación crucial en la coordinación entre división celular y replicación del cromosoma. CtrA reprime el inicio de la replicación y segregación cromosomal en las células móviles. Al mismo tiempo, inhibe la formación del septo al reprimir la proteína FtsZ (Wortinger et al., 2000). Sin embargo, esto solo ocurre durante la fase G1 del ciclo celular (Lasker et al., 2016). Una vez que la célula móvil pasa a su estado sésil, y da comienzo la fase S del ciclo celular, la cantidad de CtrA disminuye, dando paso a replicación y segregación del cromosoma, así como al inicio de la transcripción de FtsZ (Wortinger et al., 2000). Al mismo tiempo comienza la activación de PodJ, que participa en la formación de organelos polares, como pili y flagelo. PodJ existe en dos isoformas, PodJL, y PodJS, que son claves para la polarización celular. PodJS se genera tras la degradación parcial de PodJL por la proteasa PerP. PodJS participa en el reclutamiento de PleC, hacia el polo opuesto de la prosteca. PleC es una HK, que mediante

un sistema de señalización de dos componentes percibe el proceso de septación celular. Se encarga de la desfosforilación del regulador de respuesta DivK, lo que desencadena una cascada de señalización que promueve la diferenciación celular, con la formación de flagelo (Hinz et al., 2003). Así, en la mitad de la fase S, se desencadena un aumento en la cantidad de CtrA, lo que permite la biogénesis de flagelo (Laub et al., 2002). En este punto se propone a CtrA como un “checkpoint” de replicación y segregación de cromosoma, desencadenando la activación por parte de CtrA de FtsAQ, para dar inicio al proceso de formación del septo y el inicio de la fase G2 (Wortinger et al., 2000). Es aquí, antes del inicio de la fase G2, es decir, en una célula que se encuentra en estado de predivisión celular, donde la actividad de CtrA se encuentra solo en la célula diferenciada móvil, lo que da paso al proceso final de septación (Fig. 2).



**Figura 2. Actividad del regulador maestro CtrA a lo largo del ciclo celular en *C. crescentus*.** La actividad de CtrA (color gris dentro de la célula) es dinámica a lo largo del ciclo celular. La célula móvil (SW) mantiene actividad de CtrA fosforilada (barra en rayas). Posteriormente, se inicia la proteólisis de CtrA, lo que promueve la transición de la célula móvil hacia una célula sésil (ST) y el desencadenamiento del inicio de la replicación del cromosoma. Una vez comenzada la replicación del cromosoma, se activa la transcripción de CtrA (barra negra inferior). La activación de CtrA promueve la formación del flagelo en el polo naciente en la célula predivisiva (PD). En esta fase CtrA es degradada por proteólisis en la porción de la célula sésil. Finalmente, se genera la división celular y la célula sésil inicia un nuevo ciclo celular. Figura modificada de Ryan et al., 2002

Es claro que en *C. crescentus* existen proteínas claves para la determinación de polarización, asimetría y control de la división celular. En general, estas proteínas se encuentran conservadas a través de todo el grupo de alfa-proteobacterias. Sin embargo, existen algunas diferencias en cuanto a su función a lo largo de los diferentes grupos de alfa-proteobacterias, que posiblemente responden a sus diferencias en fisiología, morfología y nicho (Poncin et al., 2018). Si bien en Rhizobiales se reconoce la importancia de CtrA como regulador del ciclo celular, se ha observado que la red de regulación no se conserva del todo en comparación a lo reportado en *C. crescentus* (Fig. 3; Pini et al., 2014). Algunas de las diferencias son que

CtrA en *S. meliloti* no parece regular *ftsAZ* o *ftsQW*. Por otro lado, CtrA de *S. meliloti*, presentó una regulación clara hacia el operón *minCDE*, donde CtrA reprime la expresión del operón. Pini et al., 2014 proponen que CtrA podría regular de manera indirecta la expresión de *ftsZ* por medio de la regulación de MinCDE. Sin embargo, la regulación de MinCDE sobre *ftsZ* no ha sido corroborada con la adecuada evidencia experimental en *S. meliloti* (Cheng et al., 2007). Adicionalmente, CtrA en *S. meliloti* no mostró una activación clara hacia PleD y DivK. Sin embargo, es capaz de activar directamente a DivJ, por lo que esto podría funcionar como un mecanismo aleatorio de regulación del ciclo celular en *S. meliloti* (Pini et al., 2014). Por otro lado, las funciones de regulación de PleD, DivK y DivJ en *S. meliloti*, parecen ser muy similares a las reportadas en *C. crescentus*. En ambos modelos PleD funciona como un represor de DivK. A su vez, DivK funciona como un represor de CtrA. Mientras que DivJ funciona como activador de DivK (Sadowski et al., 2013). Además, la función de CtrA como precursor de la biogénesis de flagelo y mecanismos de motilidad es compartida por ambas bacterias (Pini et al., 2014). Así mismo, CtrA de *S. meliloti* realiza la activación directa de la proteína SciP, un importante modulador de la actividad de CtrA en la célula móvil en *C. crescentus* (Tan et al., 2010). Una actividad indispensable para el sostenimiento del ciclo celular en bacterias es la coordinación entre replicación y segregación del cromosoma y la división celular. CtrA es un regulador clave para llevar a cabo este proceso en *C. crescentus*. *C. crescentus* contiene un sitio de unión a CtrA en el inicio de replicación del cromosoma. Por tanto, la presencia de CtrA en el sitio de inicio de replicación, impide la actividad de DnaA y en consecuencia el inicio de la replicación en las células motiles (Laub et al., 2002). De manera similar, CtrA en *S. meliloti* parece participar en esta indispensable función. La depleción de CtrA en *S. meliloti* genera descoordinación entre la replicación celular y la división celular. Sin embargo, *S. meliloti* no parece tener un sitio claro de unión a CtrA en el inicio de replicación del cromosoma. Por tanto, se desconoce el mecanismo por el cual CtrA participa en la coordinación de replicación del cromosoma y división celular (Pini et al., 2014). CtrA es un activador de CcrM, esta actividad se comparte para ambos grupos bacterianos (Rhizobiales y Caulobacterales) (Gonzalez et al., 2014; Kahng et al., 2001; Pini et al., 2014). CcrM participa en la metilación del DNA y logra controlar la expresión de genes esenciales para la progresión del ciclo celular, lo que permite coadyuvar con la coordinación de replicación del cromosoma y la división celular. Este proceso de regulación de CcrM parece estar compartido tanto en *C. crescentus* como en *A. tumefaciens* (Gonzalez et al., 2014; Kahng et al., 2001).

Por otro lado, existen algunas diferencias más entre los propios mecanismos de regulación de CtrA. En *C. crescentus* la actividad de CtrA se regula por varios mecanismos. Por regulación transcripcional, fosforilación (CckA-ChpT) y proteólisis. Uno de los mecanismos de regulación transcripcional es por autoregulación de CtrA. Sin embargo, en *S. meliloti* no fue posible observar autoregulación en CtrA. La vía de proteólisis, en *C. crescentus*, se activa por CtrA a través de la activación de RcdA (Iniesta et al., 2006). No obstante, esta activación no se observó claramente en *S. meliloti* (Pini et al., 2014), por lo que no se ha descrito con claridad la vía específica de degradación de CtrA en Rhizobiales.

Es evidente que la función esencial del CtrA como regulador de división celular y coordinador de replicación cromosomal y división celular se conserva en alfaproteobacterias. Sin embargo, existen cambios específicos en las vías genéticas utilizadas para lograr la función. Estos cambios podrían responder a las diferentes adaptaciones dadas para cada grupo (Pini et al., 2014; Poncin et al., 2018). Además, existen algunas otras diferencias en los mecanismos que emplean las Caulobacterales y Rhizobiales para definir la polaridad celular

y mantener una división asimétrica. Concretamente, en *S. meliloti* la actividad de PodJ parece ser similar a la de *C. crescentus*. En ambos casos participa en la motilidad flagelar, y en la determinación de polaridad. PodJ en *S. meliloti* es necesaria para la localización de DivK en el polo nuevo, de manera similar a *C. crescentus*. Sin embargo, la capacidad de PodJ en el reclutamiento de PleC no ha podido ser comprobada (Fields et al., 2012).

En *A. tumefaciens* se ha observado que PodJ juega un importante rol en la polarización celular, ya que su localización cambia en torno al ciclo celular (Grangeon et al., 2015). En *A. tumefaciens*, PodJ tiene una función particular, puesto que participa en la localización de FtsA y FtsZ en la zona media de la célula, siendo indispensable para la formación del septo (Anderson et al., 2016).

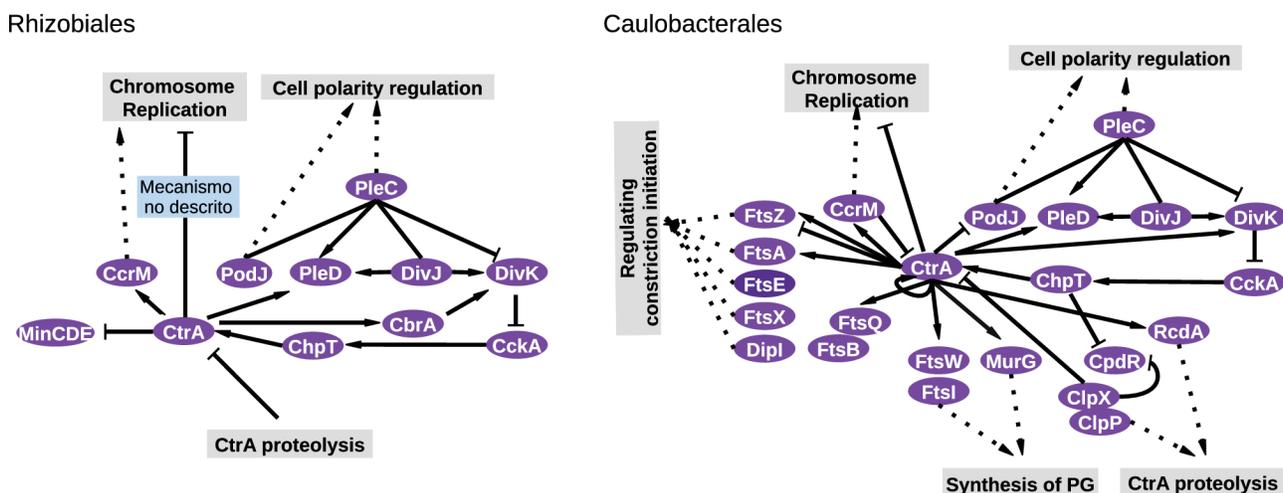
PopZ, una proteína que participa en definir la polarización en *C. crescentus*, localiza en el polo de la prosteca, y no en el polo naciente donde se formará el flagelo. Participa en la segregación de cromosoma y en la formación de flagelo (Viollier et al., 2002; Ptacin et al., 2014). De manera similar, PopZ se determina como una proteína que participa en la polarización celular en Rhizobiales y de igual manera participa en la segregación del cromosoma y en la formación de flagelo (Ehrle et al., 2017). Sin embargo, en Rhizobiales PopZ localiza exclusivamente en el polo nuevo. Esto es contrastante al compararlo con el comportamiento de PopZ de *C. crescentus*. Además, PopZ en *A. tumefaciens* es indispensable para la formación del septo (Grangeon et al., 2015).

En Rhizobiales se propone que las proteínas de división celular FtsA y FtsZ podrían jugar un papel en la determinación de polarización celular. FtsA es una proteína de anclaje a membrana. Su participación es esencial para que FtsZ, una proteína similar a la tubulina citoplásmica, localice en la parte media celular, y se realice la adecuada formación del septo (Addinall et al., 1996; Du et al., 2019). En Rhizobiales se sugiere que FtsZ y FtsA, además de llevar a cabo su actividad durante la división celular, probablemente también sean necesarias para la determinación de polarización, ya que localizan en el polo nuevo y se mantienen ahí durante todo el crecimiento celular, hasta su relocalización en la parte media para la formación del septo (Howell et al., 2019; Zupan et al., 2013).

En *C. crescentus* TipN es una proteína clave en la definición de polaridad celular. Es indispensable para el posicionamiento de estructuras en los nuevos polos como el posicionamiento del flagelo y promueve la segregación del cromosoma interactuando con ParA, proteína clave para la replicación del cromosoma (Schofield et al., 2010).

En Rhizobiales, no parece haber un homólogo claro para TipN, sin embargo, se han podido establecer genes en Rhizobiales que podrían jugar un papel similar. En *A. tumefaciens* recientemente se caracterizó la proteína GPR por sus siglas en inglés (GROWTH POLE RING). GPR es una proteína de gran tamaño (2,115 aa) que se propone como una proteína estructural que da forma a la célula, formando un anillo hexamérico esencial para mantener la forma bacilar en *A. tumefaciens* (Zupan et al., 2019). Además, RgsE se ha identificado como proteína ortóloga a GPR en *S. meliloti*, que de igual manera se describe como una proteína esencial para el mantenimiento de la forma bacilar, trabajando en conjunto con el complejo Tol-Pal y las proteínas RgsA-D, RgsF-H y RgsM,S y P. Las 11 proteínas Rgs (llamadas así por rhizobial growth and septation), se ven involucradas en el crecimiento unipolar en *S. meliloti*, donde las proteínas RgsE, P y M se determinan como esenciales para el mantenimiento de la forma y el crecimiento unipolar en *S. meliloti*. En especial, RgsP y M localizan en la zona de polimerización de PG durante el crecimiento (polo nuevo), y en la zona media durante la formación del septo (Krol et al., 2020).

Por otro lado, el operón *minCDE*, ha mostrado ser vital para la localización del septo en la parte media celular. Su mutación resulta en la formación de minicélulas en *E. coli*, las cuales frecuentemente carecen de nucleoide (Rothfield et al., 2005). Sin embargo, la función de MinCDE en Rhizobiales resulta poco clara, ya que la delección del operón completo en *S. meliloti* parece no tener efecto, pero la sobreexpresión o delección individual de los genes mostró efectos en la forma celular de *S. meliloti* (Cheng et al., 2007). Por otro lado, en *Rhizobium etli* la interrupción del operón no generó minicélulas, por el contrario, solo se observó la formación de bacilos más pequeños en relación a la cepa silvestre (Landeta et al., 2011). De manera similar, en *A. tumefaciens* la delección del operón *minCDE* no generó defectos importantes en el desarrollo de la división celular. Aunque también se observaron células visiblemente más chicas en comparación a la cepa silvestre, y la formación del septo en una zona cercana a los polos (Flores et al., 2018). Esto indica que la determinación de la porción del septo en Rhizobiales podría requerir de otros elementos aún no descritos. Los mecanismos de regulación del ciclo celular en Rhizobiales aún mantienen cabos sueltos. Los elementos y mecanismos que las Rhizobiales emplean para mantener su ciclo celular es aún escasamente conocido (Fig. 3). Es por ello necesario aumentar el esfuerzo para entender más sobre el ciclo celular de este peculiar grupo que difiere en el desarrollo celular de otras bacterias.

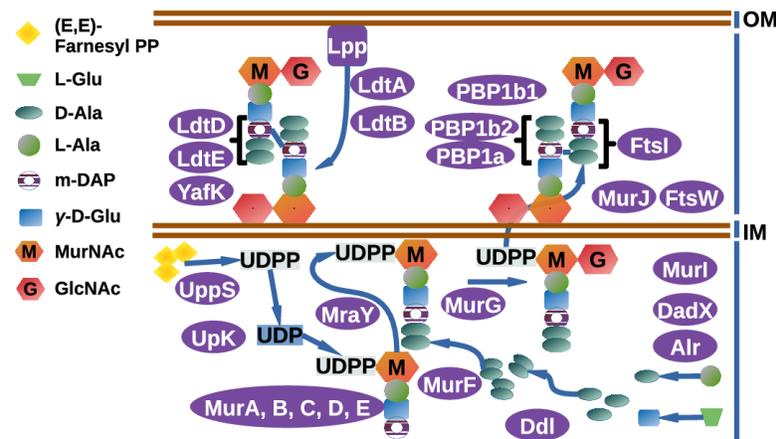


**Figura 3. Comparación de la vía de regulación de CtrA entre Rhizobiales y Caulobacteriales.** La vía de regulación de CtrA de ambos grupos mantiene una misma lógica a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, existen diferencias específicas dentro de los elementos que la componen. Para la representación de la vía de CtrA en Rhizobiales nos basamos en Pini et al., 2014; Sadowski et al., 2013. Para la representación de la vía en Caulobacteriales nos basamos en Mapas de vías de KEGG: Peptidoglicano biosíntesis, metabolismo de D-alanina y D-glutamato.

### Biogénesis de pared celular. El caso especial de Rhizobiales

La síntesis de PG en Gram negativas, conlleva desde la síntesis de las moléculas precursoras de PG, también llamadas lípido II, el transporte de dichas moléculas a través de la membrana y la formación del enlace de las moléculas de PG.

La síntesis de las moléculas precursoras de PG requiere de varias proteínas. El UDP-muramyl-L-Ala-D-g-Glu-meso-diaminopimelato (UDP-MurNAc) se forma en pasos secuenciales que requieren a las proteínas MurA-MurE. MurF y Ddl en conjunto con las racemasas Murl, DadX y Alr participan en la adición del resto de los péptidos. MraY en conjunto con UpK y UppS sintetizan Undecaprenil-difosfato-MurNAc, también llamado lípido I. Finalmente, MurG sintetiza Undecaprenil-difosfato-MurNAc-N-acetilglucosamina, llamado lípido II. Las moléculas precursoras o lípido II son transportadas hacia la membrana por la flipasa MurJ. Allí, FtsW, en conjunto con PBPs, polimeriza el lípido II en peptidoglicano. Los enlaces de peptidoglicano son realizados por las PBP y las LD-transpeptidasas. Existen dos tipos de enlaces para la unión de las moléculas de PG en la pared celular. Se encuentra el enlace 4,3 entre los residuos D-alanina y m-Dap que se lleva a cabo por las PBP. Y el enlace 3,3 entre dos residuos de m-Dap que es llevado a cabo por LD-transpeptidasas. (Egan et al., 2018; Fig. 4)



**Figura 4. Vía de síntesis de PG en Gram negativas.** La vía de síntesis de PG en Gram negativas abarca 3 pasos. Síntesis de las moléculas precursoras de PG (parte inferior de la imagen). El transporte de las moléculas precursoras hacia la membrana (MurJ), y finalmente su ensamblaje para la formación de pared celular, llevado a cabo en conjunto por FtsW, PBPs y LD-transpeptidasas.

En *E. coli* y en *B. subtilis* el crecimiento se da por medio enlaces de polímeros de PG a través de las paredes laterales. En este proceso se encuentran involucradas un conjunto de proteínas esenciales que constituyen el elongasoma. Estas proteínas son claves para la regulación y ubicación de las proteínas de involucradas en síntesis de PG.

El elongasoma está constituido por las proteínas MreB, MreC, MreD, RodA, RodZ, y PBP2. Sin embargo, todas estas proteínas se encuentran ausentes en Rhizobiales. Aunado al crecimiento asimétrico unipolar presente en Rhizobiales, es deducible que las Rhizobiales, tienen su propio mecanismo para organizar y regular la polimerización de PG (Cameron et al., 2014; William et al., 2021).

Actualmente, se han descrito varias proteínas fundamentales en la biogénesis de pared en Rhizobiales y, por tanto, de la forma bacilar en este grupo bacteriano.

Dentro de las proteínas que han sido propuestas como posibles organizadoras del crecimiento unipolar en Rhizobiales es GPR en *A. tumefaciens* y su ortólogo *RgsE* en *S. meliloti*. Como se mencionó anteriormente, GPR localiza a en el polo nuevo y funciona como una proteína que da estructura a la forma bacilar en Rhizobiales (Zupan et al., 2019).

Una peculiaridad a hacer notar en Rhizobiales es que estas contienen mayor cantidad de enlaces del tipo 3,3 que se dan entre dos residuos de m-Dap. Tanto en *S. meliloti* como en *A. tumefaciens*, este tipo de enlaces 3,3 abarcan más del 50% de los enlaces entre péptidos (Brown et al., 2012; Cameron et al., 2014), mientras que en *E. coli* solo representan el 10% de los enlaces (Magnet et al., 2008). Por otro lado, los enlaces del tipo 4,3 entre los residuos D-alanina y m-Dap que son llevados a cabo por las PBPs, son más escasos en Rhizobiales (William et al., 2021).

En congruencia con estos datos, encontramos que en el genoma de Rhizobiales existen una gran cantidad de LD-transpeptidasas. Algunas de ellas ya caracterizadas en *A. tumefaciens* han mostrado estar involucradas en el crecimiento y determinación unipolar. En especial, la proteína LdtB (Atu0845) que localiza claramente el polo nuevo durante todo el desarrollo de crecimiento unipolar en *A. tumefaciens* (Cameron et al., 2014; Grangeon et al., 2015).

Por otro lado, recientemente se ha caracterizado a la proteína PBP1-a como la PBP, que en conjunto con un grupo de LD-transpeptidasas se encargan del ensamblaje de PG en Rhizobiales durante el crecimiento unipolar. Mientras que el resto de las PBP podrían jugar un papel menos relevante en la síntesis de PG (William et al., 2021)

### **Sistemas de dos componentes y su esencialidad en bacterias.**

En bacterias, uno de los mecanismos más utilizados para la regulación de los procesos celulares, son los sistemas de dos componentes (Gao y Stock, 2009). Tradicionalmente relacionados con responder a estímulos ambientales y como reguladores de vías no esenciales. Actualmente, se reconocen como reguladores ampliamente distribuidos en todas las bacterias, e incluso se han descrito sistema de dos componentes que resultan esenciales para el ciclo celular bacteriano.

Los sistemas de señalización de dos componentes se constituyen de una proteína histidina cinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR). La HK activa el RR a través de un sistema de fosforilación y el RR se encarga de regular los genes blancos de la vía. Las HK están compuestas por uno o varios dominios sensores, los cuales se encargan de percibir una señal que da paso a la autofosforilación de la HK por medio de su dominio catalítico (CA). La autofosforilación se realiza en una histidina conservada dentro del dominio de dimerización histidina fosfotransferasa (DHP). El domino DHP transfiere el grupo fosfato hacia el RR a un aspartato conservado en el dominio receptor (REC) del RR. Con ello, el RR queda activo para la regulación de los genes que forman parte de la vía de señalización.

Existen otros tipo de sistemas de dos componentes, los cuales mantienen más pasos de fosforelevo. Las HK-híbridas contienen un dominio REC adicional. De esta manera, el dominio DHP transfiere el fosfato a un aspartato conservado en el dominio RED de la HK-híbrida. Por tanto, los sistemas de dos componentes con HK-híbridas, mantienen interacción con un tercer elemento, una histidina fosfotransferasa (HPt), la cual no contiene un dominio CA, ni sensor, para realizar autofosforilación, y solo puede recibir y transferir grupos fosfato. El HPt activa el RR por medio de la transferencia del grupo fosfato en el dominio REC del RR.

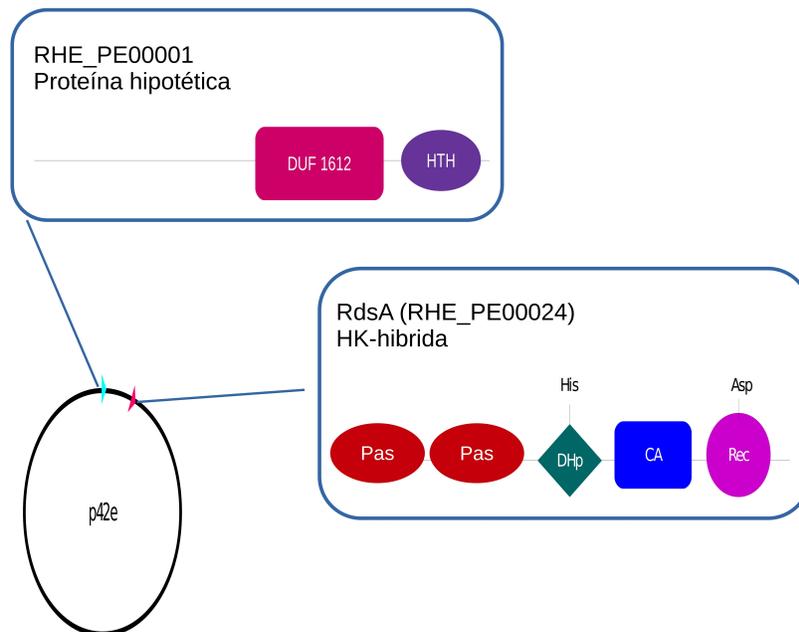
El ciclo celular en alfaproteobacterias está regulado por sistemas de dos componentes. CtrA es el regulador maestro del ciclo celular en *C. crescentus*, es parte de una vía de señalización de dos componentes. Compuesta por la HK-híbrida CckA, el HPt ChpT, y el RR CtrA. Como se mencionó anteriormente, este sistema se encuentra conservado en todas la alfaproteobacterias y coordina el ciclo celular.

El sistema de dos componentes DivJ-DivK es también un sistema esencial para la división asimétrica en alfa-proteobacterias, determinante para diferenciación de los polos, forma parte de la red de regulación de CtrA (Hinz et al., 2003). Igualmente, el sistema de dos componentes PleC-PleD es parte de la red de regulación de CtrA y participa en la polarización celular. Además, DivJ y PleC son HK antagónicas que regulan de manera diferencial a DivK. DivJ fosforila DivK, mientras que PleC desfosforila DivK. DivJ recluta a e activa DivK en el polo sénil, mientras que PleC está involucrado en la inactivación de DivK en el polo naciente (Radhakrishnan et al., 2008).

Adicionalmente, existen otros sistemas de dos componentes esenciales, el sistema YycFG (WalRK) está conservado en Firmicutes y es esencial para *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Se encarga de regular la homeostasis y división celular. De manera similar a la red de CtrA, en la red de YycFG convergen otros sistemas de señalización de dos componentes. Además, el sistema YycFG se ha identificado como un sistema que genera resistencia en patógenos (Ji et al., 2016).

## Antecedentes particulares de este trabajo.

*R. etli* es una bacteria simbiote de frijol y fijadora de nitrógeno. Su genoma está constituido por un cromosoma, un cromosoma secundario p42e (505 kb) y 5 plásmidos grandes (p42a, p42b, p42c, p42d y p42f) con un rango de tamaño que va de 184 a 642 kb (Landeta et al., 2011). p42e se determinó como el único replicón extracromosomal altamente estable y esencial para la célula. Mientras que el resto de los plásmidos de *R. etli* CE3 son dispensables para el crecimiento medio rico (Brom et al., 1992; Brom et al., 2000), p42e se determina como cromosoma secundario, debido a que cerca del 11% de los genes que codifica participan en vías de metabolismo primario. Entre ellos destacan el operón *minCDE*, y el operón *nadABC* responsable por los primeros pasos en la síntesis de NAD. No obstante, la alta estabilidad de p42e es explicada por la presencia de dos genes esenciales, RHE\_PE00001 y *rdsA* (RHE\_PE00024) (Landeta et al., 2011). RdsA es una HK-híbrida, que forma parte de un sistema de señalización de dos componentes. Debido a que no existe un RR en la vecindad del gen, la asignación de posibles genes blanco en la vía de regulación de RdsA no es evidente. En lo que refiere al gen RHE\_PE00001, codifica para un gen conservado en Rhizobiales, con un dominio de función desconocida (DUF 1612) y un motivo de unión a DNA helix-turn-helix (Fig. 5).



**Figura 5. Genes esenciales en el cromosoma secundario p42e en *R. etli* CE3.** El cromosoma secundario p42e contiene 2 genes esenciales que explican su estabilidad en el genoma de *R. etli* CE3. Estos genes son RHE\_PE00001 que codifica para una proteína hipotética que contiene un dominio de función desconocida (DUF 1612) y un motivo de unión a DNA helix-turn-helix. El segundo gen RdsA (RHE\_PE00024) codifica para HK-híbrida que forma parte de un sistema de señalización de dos componentes. RdsA está compuesta por 2 elementos sensores (dominios PAS), un dominio de dimerización histidina fosfotransferasa (Dhp), que contiene una histidina conservada, donde se realiza la autofosforilación llevada a cabo por el dominio catalítico (CA), un dominio receptor (REC) con un aspartato conservado receptor del fosforelevo

## **Justificación**

Las Rhizobiales son un grupo de bacterias que difieren del resto de las alfaproteobacterias al mantener crecimiento unipolar y carecer del conjunto elongasoma, indispensable para el crecimiento en Gram negativas y Gram positivas. Además, las Rhizobiales han mostrado tener mecanismos de regulación en el ciclo celular, que difieren de las alfaproteobacterias, estos cambios pueden responder a las adaptaciones ambientales del grupo.

La manera en la que las Rhizobiales logran ejercer el crecimiento celular unipolar, mantener su forma bacilar, y los mecanismos que utilizan para la regulación del ciclo celular, aún son ampliamente desconocidos. Es por ello que resulta de vital importancia aumentar el estudio de la red de regulación en procesos específicos y esenciales en el ciclo celular, como lo son división celular, y síntesis de pared celular.

## **Hipótesis**

Los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024 son reguladores esenciales para el ciclo celular de *R. etli* CE3.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Elucidar la función de los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024

### **Objetivos específicos**

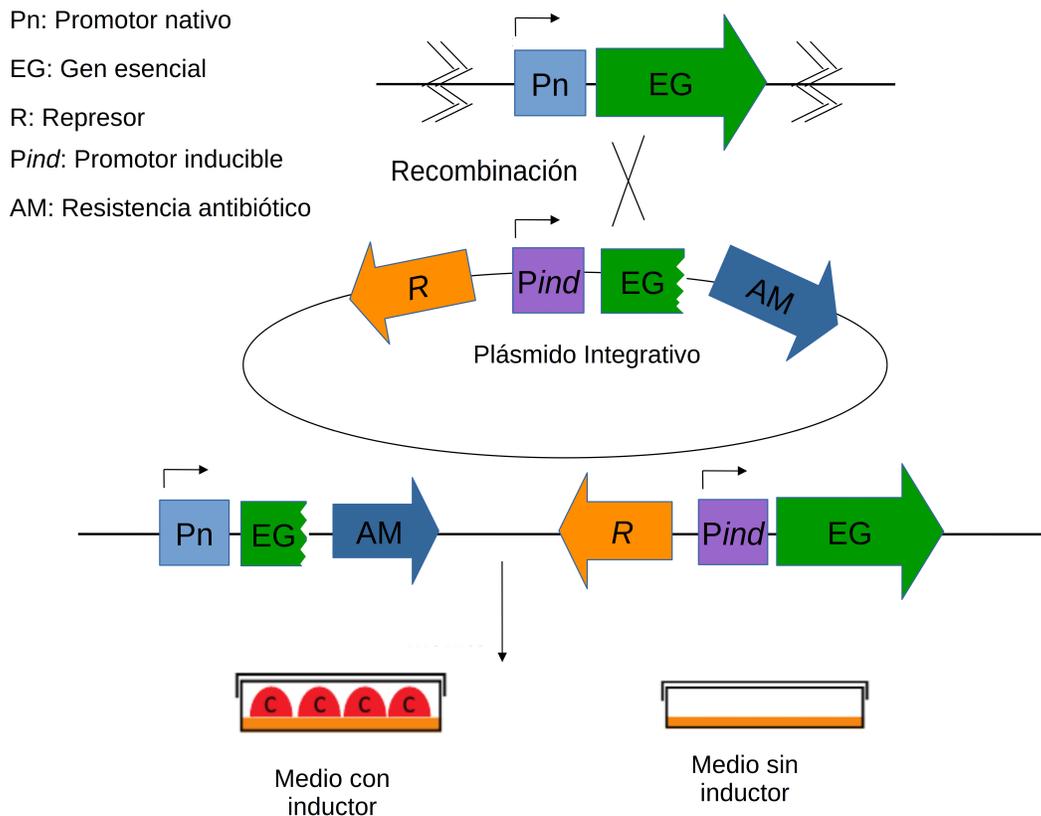
- 1.-Disminución condicional en la expresión de los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024
- 2.- Caracterización de fenotipos informativos
- 3.- Evaluar la eficacia de procesos esenciales en las cepas de expresión disminuida

## Estrategia Experimental

Para elucidar la función de los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024, se realizó la siguiente estrategia experimental.

1.- Evaluación de la eficacia de cuatro sistemas de expresión condicional en *R. etli*. Se generaron plásmidos replicativos de expresión inducibles para los sistemas inducibles lac, cumato (Q), anhidrotetraciclina (Ant) y taurina (tau). Para medir la capacidad de regulación de cada sistema inducible se fusionaron genes reporteros *uidA* para los sistemas *lac* y tau; y mCherry para los sistemas Q y Ant.

1.1.- Construcción de plásmidos integrativos de expresión condicional en sistemas inducibles (Fig. 6).



**Figura 6. Construcción de mutantes de expresión condicional.** La construcción de mutantes de expresión condicional es una herramienta que permite el estudio de genes esenciales que no pueden ser mutados por interrupción del gen. Los rasgos fenotípicos regulados por el gen esencial investigado pueden analizarse cambiando la concentración del inductor en el medio de crecimiento. El promotor inducible, junto con el gen represor más una secuencia de ADN corta que abarca la región de inicio del gen esencial objetivo, se introduce en la célula en un plásmido. Por medio de recombinación homóloga, el promotor nativo del gen esencial investigado se intercambia por el promotor inducible. El mutante condicional construido permite el control de la expresión del gen esencial por un promotor inducible dependiente de la concentración del inductor.

2.- Caracterización del fenotipo de las cepas cKD24 y cKD01 (Control de la expresión de los genes RHE\_PE00024 y RHE\_PE00001 bajo el sistema inducible por Q).

2.1.- Cuantificación de los niveles de expresión en los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024, en las cepas de expresión condicional cKD24 y cKD01, en ausencia y presencia de inducción, por medio de un análisis por RT-qPCR.

2.2.- Análisis de la forma celular de las cepas cKD24 y cKD01 en presencia y ausencia de inductor, utilizando microscopía óptica.

2.3.- Presencia de nucleóide en ambas cepas en presencia y ausencia del inductor Q. Por medio de la tinción por DAPI usando microscopía de epi-fluorescencia.

2.4.- Seguimiento de patrones de crecimiento y división celular en las cepas de expresión disminuida (ausencia de inductor) para ambas cepas. Por medio de ensayos por microscopía óptica por time-lapse. (Seguimiento del desarrollo celular bajo el microscopio óptico tomando registro cada 10 min por un periodo máximo de 10 h).

3.- Análisis por RNAseq para evaluar la eficacia en procesos esenciales en la mutante cKD24. Determinación de Genes Diferencialmente Expresados (DEGs por sus siglas en inglés). Identificación de posibles procesos biológicos y vías metabólicas con DEGs asociados a la depleción en la expresión del gen RHE\_PE00024.

### **Artículo Publicado**

Martínez-Absalón, S., Guadarrama, C., Dávalos, A., and Romero, D. (2022). RdsA Is a Global Regulator That Controls Cell Shape and Division in *Rhizobium etli*. *Front Microbiol* 13, 858440. doi:10.3389/fmicb.2022.858440.



# RdsA Is a Global Regulator That Controls Cell Shape and Division in *Rhizobium etli*

Sofía Martínez-Absalón, Carmen Guadarrama, Araceli Dávalos and David Romero\*

Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Peter Graumann,  
University of Marburg, Germany

### Reviewed by:

Emanuele Biondi,  
CNRS I2BC, France  
Nils Meiresonne,  
Universidade NOVA de Lisboa,  
Portugal

### \*Correspondence:

David Romero  
dromero@ccg.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Physiology and Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 20 January 2022

Accepted: 10 March 2022

Published: 07 April 2022

### Citation:

Martínez-Absalón S,  
Guadarrama C, Dávalos A and  
Romero D (2022) RdsA Is a Global  
Regulator That Controls Cell Shape  
and Division in *Rhizobium etli*.  
Front. Microbiol. 13:858440.  
doi: 10.3389/fmicb.2022.858440

Unlike other bacteria, cell growth in rhizobiales is unipolar and asymmetric. The regulation of cell division, and its coordination with metabolic processes is an active field of research. In *Rhizobium etli*, gene RHE\_PE00024, located in a secondary chromosome, is essential for growth. This gene encodes a predicted hybrid histidine kinase sensor protein, participating in a, as yet undescribed, two-component signaling system. In this work, we show that a conditional knockdown mutant (cKD24) in RHE\_PE00024 (hereby referred as *rdsA*, after rhizobium division and shape) generates a striking phenotype, where nearly 64% of the cells present a round shape, with stochastic and uncoordinated cell division. For rod-shaped cells, a large fraction (12 to 29%, depending on their origin) present growth from the old pole, a sector that is normally inactive for growth in a wild-type cell. A fraction of the cells (1 to 3%) showed also multiple ectopic polar growths. Homodimerization of RdsA appears to be required for normal function. RNAseq analysis of mutant cKD24 reveals global changes, with downregulated genes in at least five biological processes: cell division, wall biogenesis, respiration, translation, and motility. These modifications may affect proper structuring of the divisome, as well as peptidoglycan synthesis. Together, these results indicate that the hybrid histidine kinase RdsA is an essential global regulator influencing cell division and cell shape in *R. etli*.

**Keywords:** two-component systems, peptidoglycan synthesis, polar growth, bacterial divisome, gene knockdown

## INTRODUCTION

In bacteria, there is a tight relationship between cell shape and cell division. Cell shape is ultimately determined by the cell membrane and the cell wall (Cava et al., 2013; Kysela et al., 2016). For rod-shaped (bacillary) cells such as *Escherichia coli*, cell growth occurs by dispersed incorporation of new peptidoglycan (PG) alongside the lateral wall, followed by PG synthesis at the midpoint of the cell, where the septum will be located at cell division (Dewachter et al., 2018). Studies in *E. coli* of the cell machinery needed for growth and division and their control has revealed an astonishing level of complexity (Männik and Bailey, 2015; Haeusser and Margolin, 2016; Dewachter et al., 2018; Krupka and Margolin, 2018; Levin and Janakiraman, 2021; Straume et al., 2021). These insights have been expanded, both in scope and complexity, by the study of new bacterial groups.

In  $\alpha$ -proteobacteria, cell cycle regulation is closely related to their lifestyle. *Caulobacter crescentus*, unlike other bacteria, generates upon division two cells with different morphology

and physiology. The mother cell is sessile and active for cell division. The daughter cell is a mobile cell, inactive for cell division and replication (Laub et al., 2002). Asymmetrical cell division is a widespread characteristic among  $\alpha$ -proteobacteria (Hallez et al., 2004). Understanding the mechanisms that lead to the formation of these specialized cells and the coordination of cell division has motivated an intense research (Curtis and Brun, 2010; Collier, 2016; Woldemeskel and Goley, 2017). Moreover, it has revealed the presence of a complex regulatory mechanism, with a hierarchical cascade of transcriptional regulators, in which the CtrA regulator has a central role in the coordination of cell division (Quon et al., 1996; Laub et al., 2000, 2002; Mann et al., 2016; Delaby et al., 2019). CtrA controls, either directly or indirectly, 26% of the cell cycle-regulated genes in *C. crescentus* (Laub et al., 2000).

Two-component regulatory systems are of paramount importance to achieve control of *C. crescentus* cell-cycle regulated genes. When the hybrid histidine kinase sensor protein CckA is phosphorylated, it can transfer the phosphate group to the phosphotransfer protein ChpT, which in turn phosphorylates the response regulator CtrA. The phosphorylated form of CtrA is responsible for transcriptional activation of its target genes. The kinase activity of CckA is shut off by the action of the phosphorylated form of the response regulator DivK, stabilized by the atypical histidine kinase DivL. Phosphorylation of DivK is controlled by the histidine kinase DivJ and the phosphatase PleC. PleC also modulates phosphorylation of the diguanylate cyclase PleD, leading to the synthesis of cyclic di-GMP. Switching of CckA from a kinase to a phosphatase activity is instrumented by binding of cyclic di-GMP, effectively precluding phosphorylation of CtrA and activation of their target genes (see Poncin et al., 2018 and references therein).

Although the general architecture for regulation of cell division is conserved among the  $\alpha$ -proteobacteria, there are also interesting departures from this scheme. Bacteria of the order Rhizobiales lack various proteins (MreB MreCD, PBP2, RodA, and RodZ) of the elongasome complex (Egan et al., 2020). Rhizobiales with bacillary morphology, such as *Sinorhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens*, carry out cell growth in a distinctive manner. In both bacteria, cell growth is asymmetric and polarized, but cell elongation occurs through the polymerization of PG at a single cell pole, called the new pole. The opposite pole, called the old pole, remains inactive for polymerization (Brown et al., 2012; Cameron et al., 2015). Further rounds of cell division maintain both the asymmetry and polarization, growing exclusively from the new cell poles. How unipolar growth takes place and the identification of the mechanisms allowing the distinction between the old and new poles in Rhizobiales is an active field of research. Transcriptional regulation of the cell division cycle has also revealed new variations. Although the centrality of the CtrA regulator is maintained, the transcriptional network reveals some plasticity, where some modules are maintained but other new modules are integrated into the network among the different bacteria that constitute the group (Pini et al., 2015; Poncin et al., 2018).

The rod-shaped bacterium *Rhizobium etli* is a nitrogen-fixing bean symbiont, widely studied for its use as a biofertilizer and

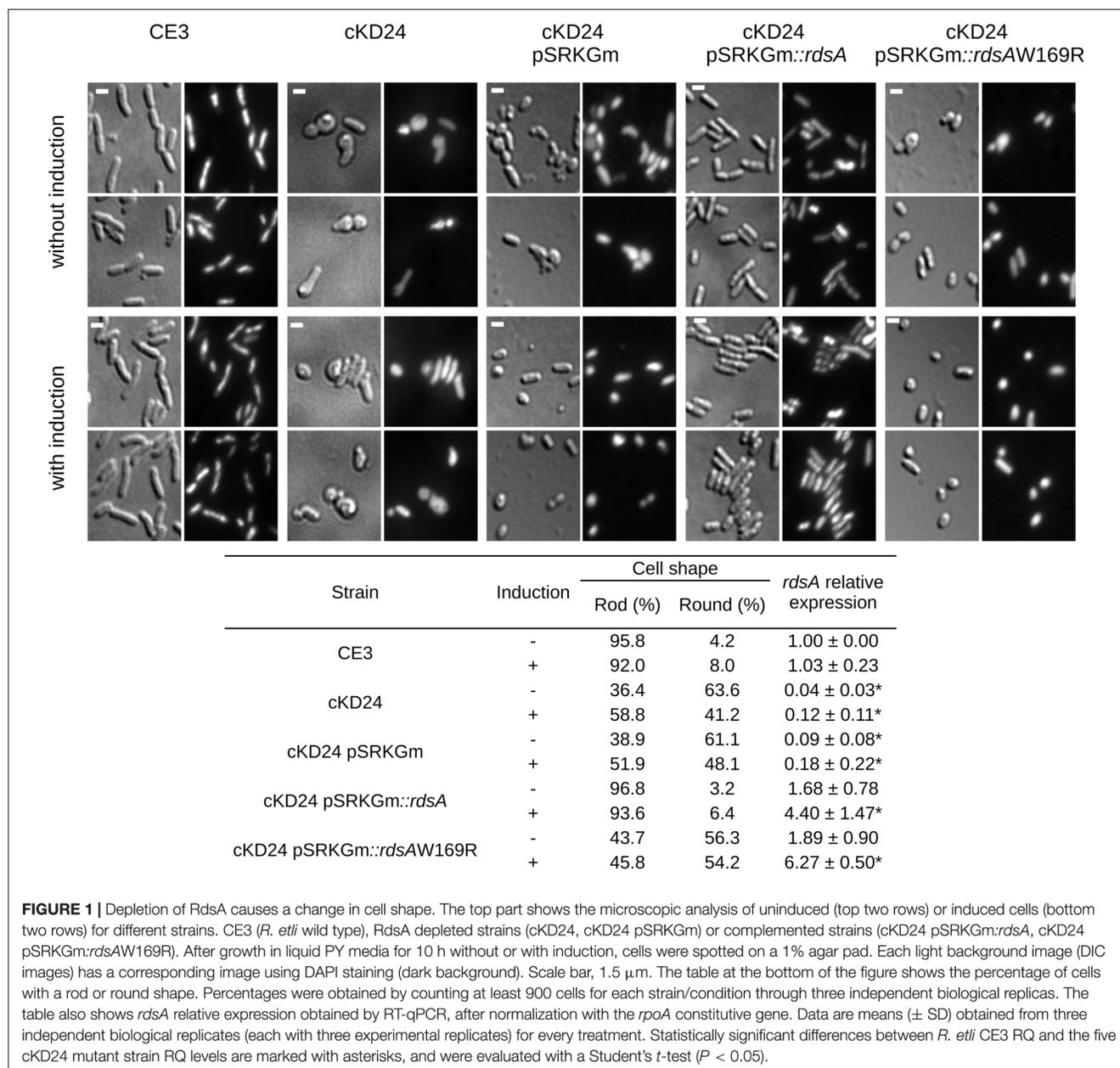
interesting genome architecture (González et al., 2006). The *R. etli* CFN42 genome consists of six extra-chromosomal replicons (ranging in size from 184 to 642 kb) and one chromosome. Five of these extra-chromosomal replicons (plasmids p42a, p4b, p42c, p42d, and p42f) are dispensable for growth under laboratory conditions in rich medium (Brom et al., 1992, 2000). Plasmid p42e (505 kb) cannot be eliminated from the cell, appearing to be a secondary chromosome. Nearly 10% of the gene content in p42e participates in central metabolic processes, but it also contains two essential genes (Landeta et al., 2011). Genes RHE\_PE00001 and RHE\_PE00024 were proposed as essential genes because their mutation is lethal for the cell. Convincing orthologs for both genes are mainly restricted to the Rhizobiales, including *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. Gene RHE\_PE00001 codes for a conserved hypothetical protein, consisting of a Domain of Unknown Function (DUF1612) conserved among the Rhizobiales, and a helix-turn-helix DNA binding motif in the N-terminus. Gene RHE\_PE00024 encodes a predicted hybrid histidine kinase (HK) sensor protein, that is part of a two-component regulatory system of as yet unknown function (Landeta et al., 2011).

In this work, we unravel the function of the hybrid histidine kinase sensor protein encoded in RHE\_PE00024, by studying the phenotypic effects displayed by a conditional knockdown mutant (cKD24) in this gene. Depletion in the RHE\_PE00024 encoded protein generated a striking change in cell morphology, characterized by the finding of a high proportion (nearly 64%) of round, nearly spherical cells. Both the round and bacillary cells present a lethargic, stochastic and uncoordinated cell division. A significant proportion of bacillary cells (12 to 29%, depending on their origin) display growth from the old pole, a sector that is normally inactive for growth in a wild-type cell. Branched cells, the product of ectopic growth poles that do not complete division, were also seen. RNAseq analysis of the cKD24 mutant showed that the predicted hybrid histidine kinase sensor protein encoded by RHE\_PE00024 acts as a global regulator, controlling, either directly or indirectly, genes participating in five different biological processes (cell division, PG synthesis, oxidative respiration, translation and motility). Based on these results, we propose to name this gene *rdsA* (after *rhizobium division and shape*).

## RESULTS

### Change in Cell Shape in a Conditional Knockdown Mutant for *rdsA*

Gene *rdsA* (RHE\_PE00024) encodes the sensory component of an essential hybrid Histidine Kinase (HK) regulatory system. Canonical HK proteins constitute the sensor part of two-component regulatory systems. In these, the canonical HK contains an input domain able to sense regulatory stimuli and subsequently the catalytic ATP binding (CA) domain phosphorylates a His residue in the dimeric histidine phosphotransfer (DHp) domain. The phosphoryl group is then transferred to an Asp residue in the receiver (REC) domain of a separate response regulator protein (Gao and Stock, 2009;



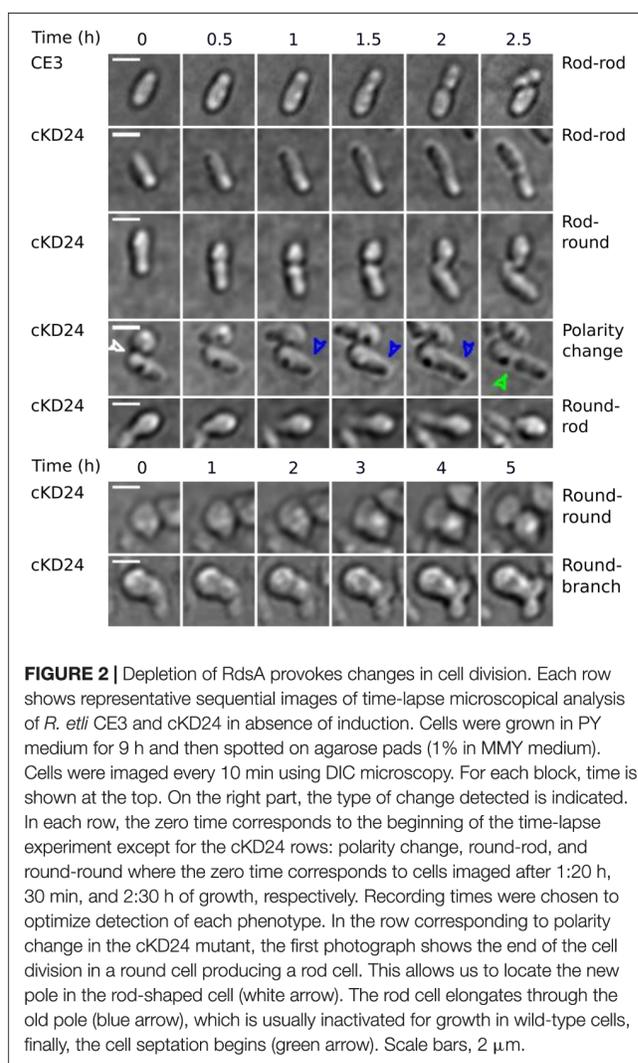
Rodríguez et al., 2020). In contrast, the predicted hybrid histidine kinase RHE\_PE00024 is comprised of a putative N-terminal sensory region (containing two PAS sensor domains) and a kinase core containing both the CA and the DHP domains. Additionally, it contains a REC domain with a potentially phosphorylatable Asp residue. In systems of this kind, transfer of the phosphoryl group to the corresponding response regulator protein frequently entails an intermediate protein with a phosphorylatable His residue, designated as histidine phosphotransferase or Hpt (Gao and Stock, 2009). No genes encoding a plausible response element or a Hpt protein were found in its vicinity. To better understand the possible function of RdsA, we implemented a conditional knockdown system in which the *rdsA* gene is put

under the control of a cumate inducible promoter (Chubiz et al., 2013). In the corresponding mutant (cKD24), expression of *rdsA* depends on the inducible cumate system (see section “Materials and Methods”). Interestingly, growth of the cKD24 mutant in rich medium without cumate was slower [growth rate constant ( $\mu$ ) = 0.23 h<sup>-1</sup>, mean generation time (*g*) = 2.9 h] than the wild type cells ( $\mu$  = 0.33 h<sup>-1</sup>, *g* = 2 h, **Supplementary Figure 1**). The slower growth of cKD24 was observed even upon addition of cumate to the medium ( $\mu$  = 0.22 h<sup>-1</sup>, *g* = 3.1 h). No significant differences were observed in relative viability between strains (data not shown). Notably, microscopical analysis of the cKD24 knockdown mutant showed a striking change in shape compared to the wild-type cells. In the absence of cumate,

cKD24 showed 63.6% of cells with a round shape, while 36.4% maintained a bacillary shape (Figure 1). DAPI staining revealed nucleoid material in both kinds of cells (Figure 1), suggesting that they are viable. In contrast, when expression of *rdsA* is increased by addition of cumate, the cKD24 mutant showed a reduced proportion of round cells (41.2%), and a correspondingly higher proportion of bacillary cells (58.8%, Figure 1). Even in the presence of induction there are a high percentage of cells with a round shape, suggesting that wild-type expression levels of *rdsA* were not achieved. To verify this, *rdsA* gene expression was monitored by RT-qPCR analysis. In the absence of induction, a low expression level of *rdsA* was seen, at a level representing just 4.6% of the wild-type levels. However, for unknown reasons, cumate addition did not lead to high expression levels of the gene, showing only 12% of the wild-type levels (Figure 1). To enhance the level of expression of *rdsA* in the cKD24 mutant, we introduced supernumerary copies of the *rdsA* gene (under the control of an IPTG inducible system), in a replicative plasmid. The complemented strain (cKD24 pSRKGm:*rdsA*) showed expression levels of *rdsA* 1.68-fold higher than in the wild-type cells, even in the absence of induction; in contrast, a fourfold increase in expression compared to the wild-type was seen upon IPTG addition (Figure 1). Microscopical analysis of cells in the complemented cKD24 pSRKGm:*rdsA* strain, revealed a wild-type phenotype, where 97% of the cells showed a bacillary shape (Figure 1), with a low proportion of cells with a round shape. As a control, a mock complementation experiment was done, introducing an empty plasmid in mutant cKD24. Both the expression levels of *rdsA* (Figure 1) and proportion of round cells (61.1 and 48.1% without and with induction, respectively, Figure 1) were indistinguishable from the ones seen in the cKD24 mutant. Together, these results indicate that RdsA depletion causes an anomalous round shape in *R. etli* CFN42. Since cell morphology in Gram-negative bacteria is determined by a proper structuring of the cell wall (Cava et al., 2013), *rdsA* may participate in the regulation of cell wall biogenesis.

## Homodimerization Is Essential for Proper Functioning of the RdsA Hybrid Histidine Kinase

Many HK proteins require homodimerization to carry out their phosphorylation function (Mann et al., 2016). To evaluate if the HK-hybrid protein RdsA requires homodimerization for its function, an *Escherichia coli*, LexA-based two-hybrid system (Dmitrova et al., 1998) was used (Supplementary Figure 2). In this system, repression of a target reporter gene is seen only if a fusion of LexA with the desired protein is able to dimerize (Dmitrova et al., 1998). Most of the clones obtained with *rdsA* revealed a strong repression, indicating the ability of the corresponding protein to dimerize. Interestingly, one of the clones revealed a reduced ability to repress the target gene, indicating a reduced dimerization (Supplementary Figure 2). Although the amplification protocol used to generate these clones was not designed to introduce mutations, this clone displayed a spontaneous single-base change provoking an aminoacid change

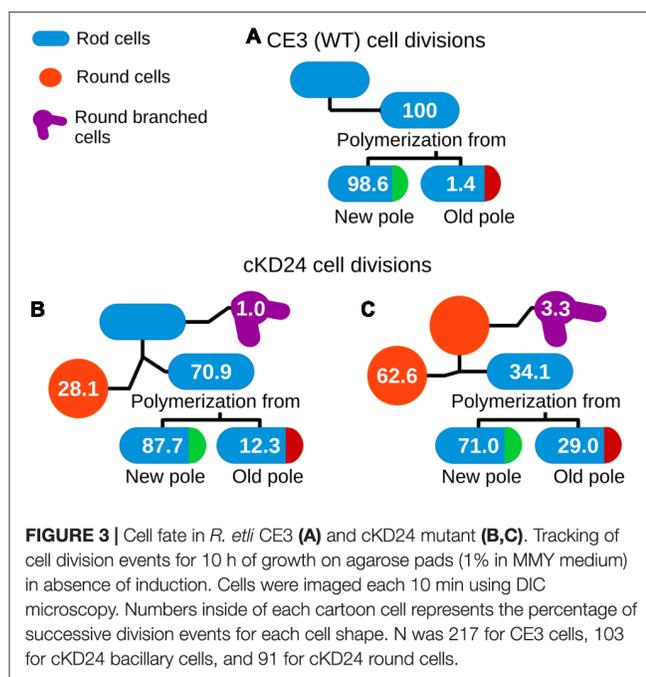


**FIGURE 2 |** Depletion of RdsA provokes changes in cell division. Each row shows representative sequential images of time-lapse microscopical analysis of *R. etli* CE3 and cKD24 in absence of induction. Cells were grown in PY medium for 9 h and then spotted on agarose pads (1% in MMY medium). Cells were imaged every 10 min using DIC microscopy. For each block, time is shown at the top. On the right part, the type of change detected is indicated. In each row, the zero time corresponds to the beginning of the time-lapse experiment except for the cKD24 rows: polarity change, round-rod, and round-round where the zero time corresponds to cells imaged after 1:20 h, 30 min, and 2:30 h of growth, respectively. Recording times were chosen to optimize detection of each phenotype. In the row corresponding to polarity change in the cKD24 mutant, the first photograph shows the end of the cell division in a round cell producing a rod cell. This allows us to locate the new pole in the rod-shaped cell (white arrow). The rod cell elongates through the old pole (blue arrow), which is usually inactivated for growth in wild-type cells, finally, the cell septation begins (green arrow). Scale bars, 2  $\mu$ m.

(W169R), located in the second PAS domain of RdsA. PAS domains are frequently involved in protein-protein interactions (Möglich et al., 2009). To evaluate if this failure to dimerize affects function, the mutant version *rdsAW169R* was introduced in a replicative plasmid (see section “Materials and Methods”). The cKD24 pSRKGm:*rdsAW169R* strain, showed 56 and 54% of round cells both in the absence and presence of induction, respectively (Figure 1), indicating a failure to complement the changes in shape characteristic of the cKD24 mutant. Failure for proper complementation was not due to an absence of expression of the mutant gene, as evaluated by a RT-qPCR analysis (Figure 1). These results are consistent with the interpretation that homodimerization of RdsA is essential for its function.

## RdsA Depletion Causes Uncoordinated and Stochastic Cell Division and Change of Polarity

To evaluate if depletion of RdsA lead to changes in cell division pattern, a time-lapse analysis of living cells was carried out (see



section “Materials and Methods”). For this, the division pattern of both *R. etli* CE3 (wild-type,  $n = 217$ ) and cKD24 (without cumate induction,  $n = 194$ ) cells was followed over a time course of at most 10 h. To minimize damage to the cells during incubation, a system that reduces evaporation (FluoroDish™ plates) was used. **Figure 2** shows the type of growth patterns detected, with a summary of the results of cell fate for each strain (**Figure 3**). As reported for *A. tumefaciens* (Cameron et al., 2015) and *S. meliloti* (Krol et al., 2021), *R. etli* CE3 displays an unipolar division pattern (**Figure 2**), where deposition of new material is concentrated in the new poles (**Supplementary Movie 1**). During these time-lapse experiments, no round cells were observed for the wild type strain. In contrast, cells from strain cKD24 showed alterations in several aspects of cell division, including cell division time, polarity and shape (**Supplementary Movies 2–4**). Since populations of cKD24 are nearly evenly split in two shape classes (round and bacillary) the progeny of each class was followed separately. For mother cells with bacillary shape, most of their progeny was composed of bacillary cells (70.9%), showing unipolar and asymmetric cell growth (**Figure 2**, row cKD24 rod-rod; **Figure 3B**), although their cell division time was slower (3 vs. 2 h) than in the wild type cells. Of these bacillary cells, 12.3% had a polarity change (**Figure 2**, see row cKD24 polarity change), namely, they begin to synthesize cell envelope by the old pole, while the new pole resulted inactivated for growth (**Supplementary Movie 4**). This change of polarity is a transient effect; further divisions in these cells resume growth from the new poles. A large fraction of mother cells of bacillary shape (28.1%) produced daughter cells with round shape (**Figure 2**, see row cKD24 rod-round) with a cell division time of 2.5 h. Finally, some of the mother cells of bacillary shape (1%)

produced round daughter cells with multiple growth foci, giving a branched appearance.

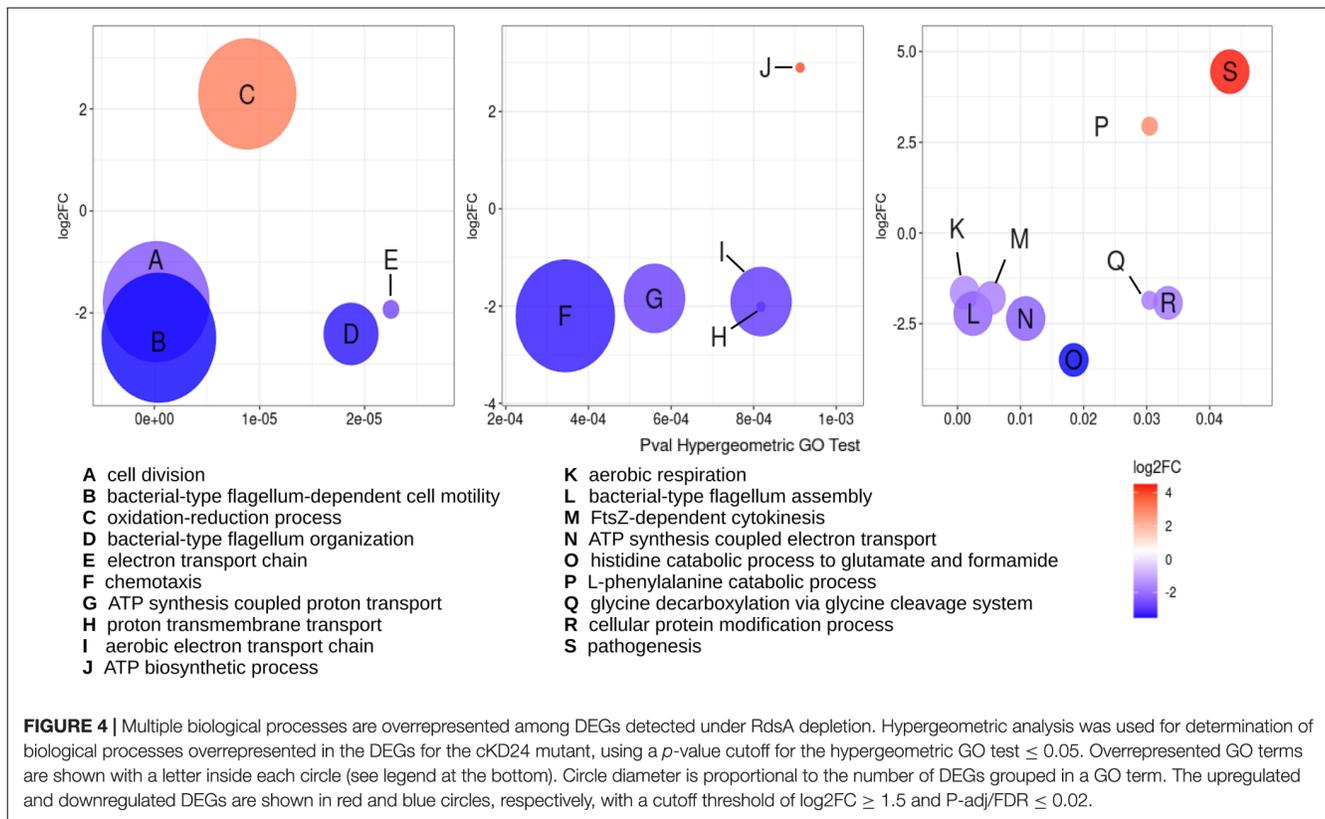
On the other hand, cell division in mother cells with round shape produced daughter cells with round (62.6%), bacillary (34.1%) and branched (3.3%) shapes. Notably, the bacillary cells that came from mother cells with a round shape, showed polarity change in a higher proportion (29%) than the one seen in daughter bacillary cells from a mother with bacillary shape (12.3%) (**Figures 3B,C**). Even in these cases the change of polarity is a transient effect, with cells resuming growth from newly-generated poles. Most of the round cells that produced bacillary daughter cells did so solely from a single point in the round cell (**Figure 2** see column cKD24 round-rod). Round cells were able to divide and produced new round cells, but they did so with a long division time, of about 8 h (**Figure 2** see row cKD24 round-round, **Supplementary Movie 2**).

A significant proportion of both bacillary (1%) and round cells (3.3%) from cKD24 produced growth foci at several points in the cell, without producing novel cells, giving a branched shape (**Figure 2**, see row cKD24 round-branch, **Supplementary Movie 3**). These branched cells remained in this state for the whole course of the experiment, failing to produce new cells. We were unable to detect a growth pattern, either, for the type of shape generated by each mother cell, or in the position and number of growth sectors, an effect that is clearly seen in the round cells that grow from several points of the cell in a quasi-simultaneous manner (**Supplementary Movie 3**). There are reports in Rhizobiales of null mutants that generate round cells (Kobayashi et al., 2009; Calatrava-Morales et al., 2017; Zupan et al., 2019; Krol et al., 2020). What is unusual in this case is that depletion of RdsA produced a wealth of effects, modifying cell morphology, polarity, and time and number of growth foci. All these point toward a major disruption of the cell division program in these cells.

## Depletion of RdsA Causes a Global Change in Gene Expression

To identify which genes presented alterations in expression in strain cKD24, we undertook a RNAseq analysis using the Illumina system (see section “Materials and Methods”). For that, both *R. etli* strains CE3 and cKD24 were grown in minimal medium (without cumate induction) to mid-exponential phase. Three biological replicates were used for each strain. Details for this analysis are shown in **Supplementary Datasets 1C–E** and **Supplementary Figure 3**.

Using as criteria a FDR or adjusted  $p$ -value cutoff  $\leq 0.02$  and a  $\log_2$  fold change of 1.5, a total of 1,105 genes were classified as differentially expressed genes (DEGs). Of these, 437 DEGs were downregulated, while 668 DEGs were upregulated (**Supplementary Dataset 1E**). Functional classification of the DEGs was achieved using the Gene Ontology (GO) database by biological processes. Assignment to GO groups belonging to clear biological processes was possible only for 352 DEGs, indicating that most of the changes in expression occur in genes without a known function. To evaluate if there are significant overrepresentation of particular biological



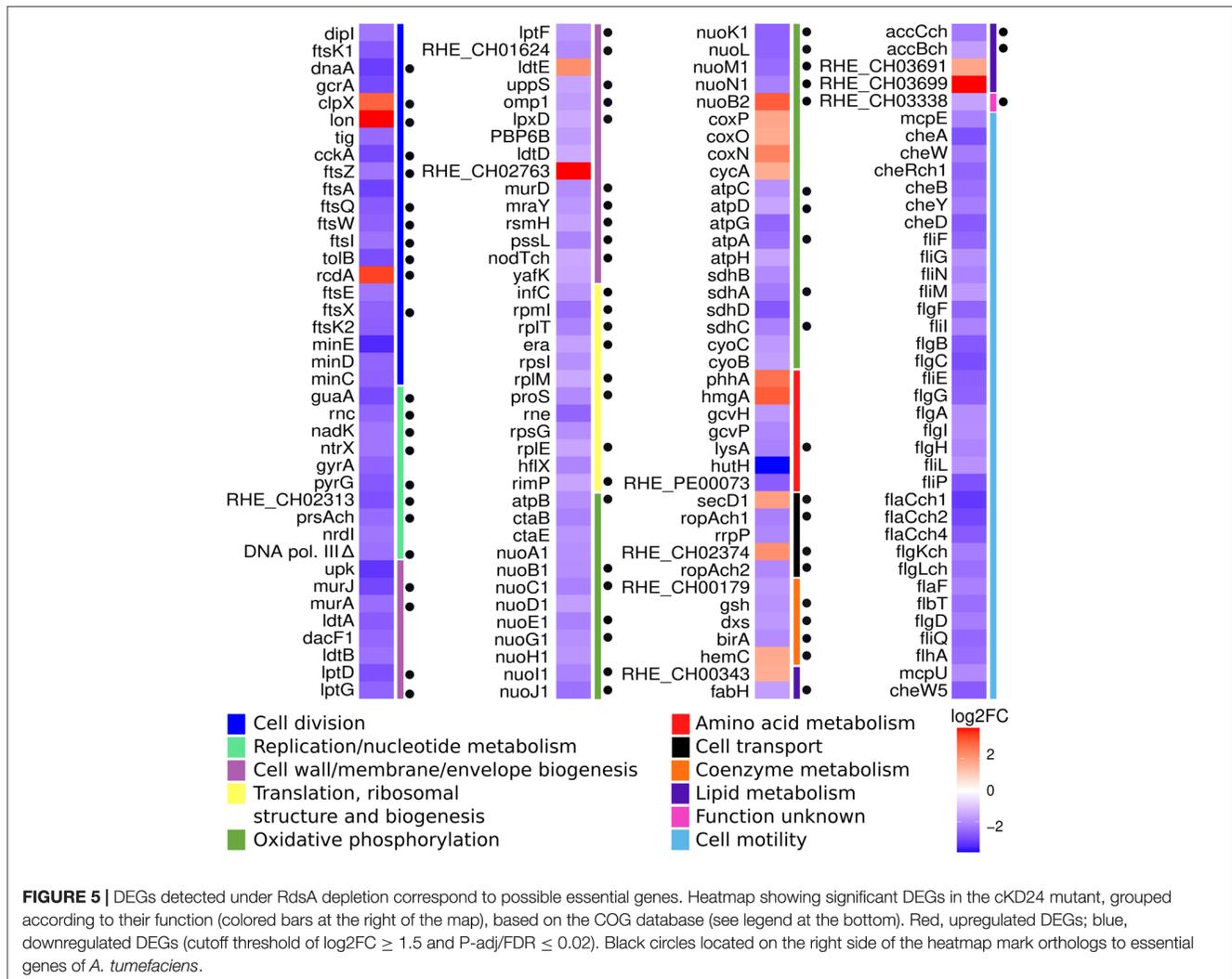
processes among the functionally annotated DEGs, these were subjected to a hypergeometric analysis (Figure 4). From this analysis, 101 DEGs were identified as belonging to significantly overrepresented groups. The most overrepresented groups were cell division (including FtsZ-cytokinesis), oxidative respiration (comprised of electron transport chain, ATP synthesis-coupled proton and electron transport, proton transmembrane transport, aerobic electron transport chain, and aerobic respiration), and cell motility (including chemotaxis, flagellum-dependent cell motility, and organization and assembly of the flagellum). The DEGs belonging to these three biological processes were mostly downregulated. On the other hand, the most prominent, overrepresented biological processes that were found to be upregulated are the oxidation-reduction process and pathogenesis (Figure 4). The subset of DEGs comprising the oxidation-reduction process is comprised of proteins with a general prediction of oxidoreductases. No genes that participate in tolerance to oxidative stress were found among the DEGs. The pathogenesis group is composed of proteins belonging to the BA14K protein family, which are poorly characterized.

This analysis was complemented by classification of all the DEGs according to their function in the COG (Clusters of Orthologous Groups) database (Figure 5). This approach revealed groups of genes that correspond in function to those identified by hypergeometric analysis, such as cell division, oxidative phosphorylation and cell motility. Interestingly, 55 DEGs belonging to novel groups were easily detected, corresponding to the classes of replication/nucleotide

metabolism; cell wall/membrane/envelope biogenesis; and translation, ribosomal structure, and biogenesis. This combined approach allowed the establishment of a collection of 156 DEGs to be analyzed (Figure 5). Many of these DEGs appear in classes that may be considered essential for bacterial growth. For that reason, we carefully reviewed the existence of orthologs to essential genes among the DEGs. Currently, there is no report about essential genes in *R. etli*, so the list of DEGs was examined looking for orthologs to essential genes of *A. tumefaciens* (Curtis and Brun, 2014). In this way, we were able to establish the existence of 70 potentially essential DEGs in cKD24 (Figure 5).

### RdsA Depletion Causes a Decrease in Expression of Essential Genes for Cell Division and Cell Wall Biogenesis

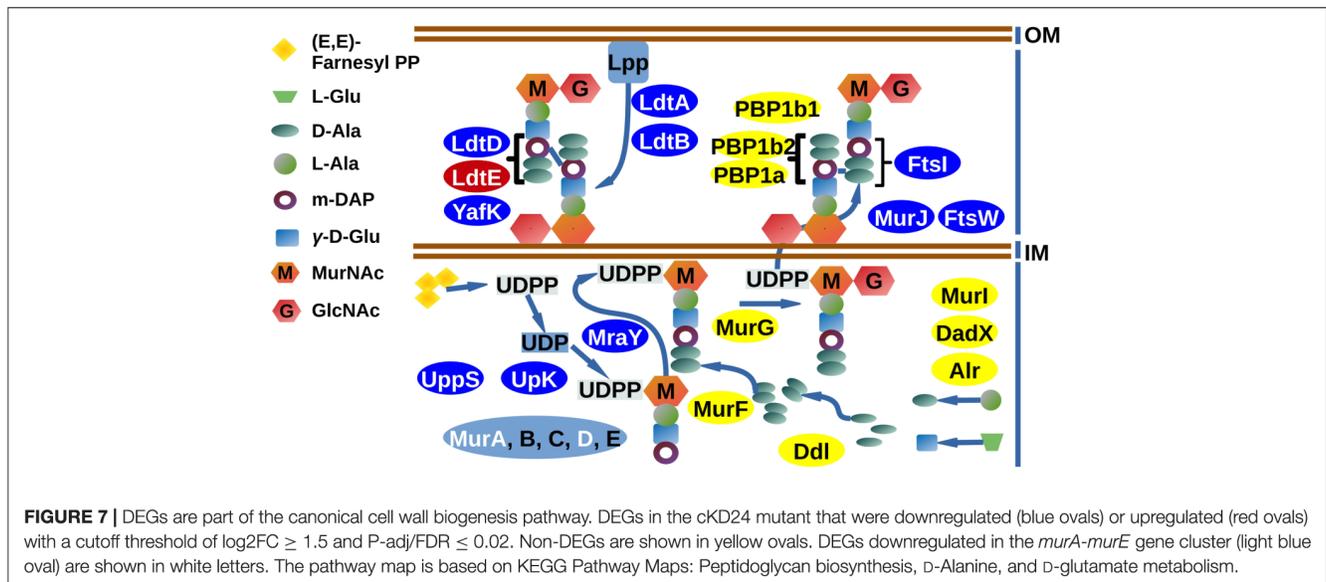
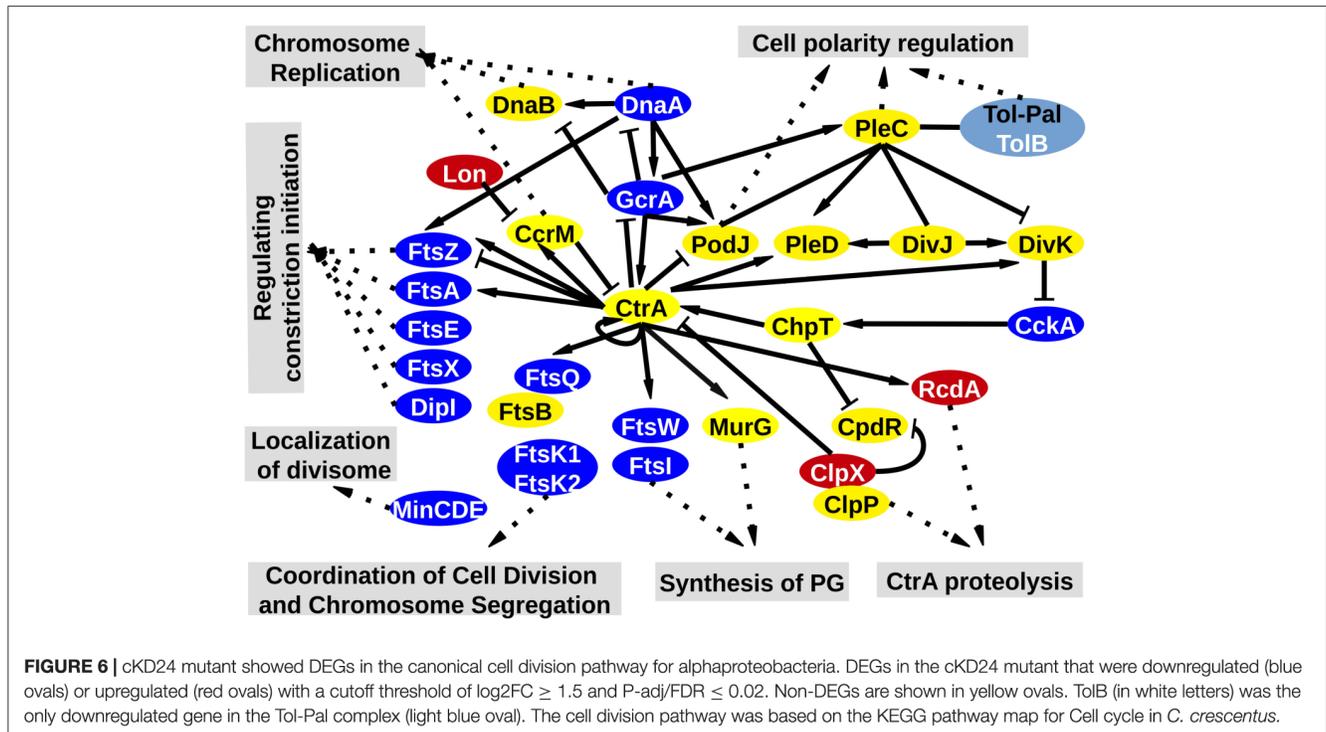
As expected from the phenotype exhibited by the cKD24 mutant, significant alterations were found in 21 genes participating in cell division. Most of these changes were corroborated by RT-qPCR analyses (Supplementary Figure 4). These are depicted in the KEGG map corresponding to cell division, based on the cell division pathway of *C. crescentus* (Laub et al., 2002), as shown in Figure 6. Most of these genes are conserved in Rhizobiales, such as *S. meliloti* (Pini et al., 2015). The first aspect to highlight is that the genes *ftsA*, *E*, *I*, *K1*, *K2*, *Q*, *W*, *X*, and *Z*, whose products comprise most of the divisome, as well as the *minCDE* operon, participating in the correct location of the septum (Rothfield et al., 2005), were downregulated. Significant



reductions in expression were also seen for *dnaA* (responsible for genome replication in coordination with cell division), *dipI* [a periplasmic protein that interacts with the *ftsQLB* complex (Osorio et al., 2017)], *gcrA* (an activator of *ctrA*) and *cckA* (a cell-cycle kinase). Interestingly, the master cell division regulator CtrA (Mann et al., 2016) was not downregulated (Figure 6 and Supplementary Figure 4). On the other hand, genes such as *pleC* (Kim et al., 2013), *podZ* (Grangeon et al., 2017; Howell et al., 2017), *popJ* (Fields et al., 2012; Anderson-Furgeson et al., 2016), *divK*, *divJ* (Pini et al., 2013), and GPR (Zupan et al., 2019, 2021), participating in determination of asymmetric and unipolar growth, displayed normal expression levels in the cKD24 mutant. The downregulation in many genes for cell division suggests a major perturbation in cell division, which is consistent with the longer cell division times and cell division problems exhibited by the cKD24 mutant (Figures 2, 3 and Supplementary Movies 2–4). These data indicate that depletion of RdsA affects, either directly or indirectly, a sizable fraction of genes involved in cell division.

For the PG synthesis pathway (Figure 7), extensive downregulation, verified by RT-qPCR analysis (Supplementary Figure 4) was also detected. The *uppS* and *upK* genes, performing the synthesis of di-trans, poly-*cis*-undecaprenyl phosphate from farnesyl diphosphate, were shown to be downregulated. Downstream in the pathway, the genes *murA*, *murE*, and *mraY* (involved in the synthesis of precursors of PG) displayed reduced levels in the cKD24 mutant. Reductions in the expression levels of both *dcl* and *alr* genes, which participate in synthesis of D-amino acids, were undetectable in the RNAseq analysis, but showed a distinct downregulation in the RT-qPCR analysis. Low gene expression was also seen for genes, such as *murJ*, participating apparently in flipping of the PG precursors across the plasma membrane for subsequent polymerization (Egan et al., 2020) and *ftsW*, a peptidoglycan glycosyltransferase (Taguchi et al., 2019). These observations point toward a general decrease in the synthesis of PG precursors.

Furthermore, the penicillin-binding proteins (PBP) *ftsI* and PBP1b1, which are responsible for the transpeptidation and



transglycosylation of PG molecules during the cell division cycle (Cameron et al., 2014), were downregulated in the cKD24 mutant, although the reduction in expression of PBP1b1 was only detected in the RT-qPCR analysis (**Supplementary Figure 4**). Interestingly, similar levels of expression to the wild-type cells were seen for PBPs that participate in cell elongation, such as PBP1c, or essential for polar growth in *A. tumefaciens* and *S. meliloti*, as PBP1a (Williams et al., 2021). Down regulation was also observed for low molecular weight PBPs, such as PBP6B and *dacF*. The significance of these reductions is difficult

to ascertain, given that its individual participation might be dispensable for the polymerization of PG, due to their redundant activities (Egan et al., 2020; Williams et al., 2021). However, cell branching and ectopic cell poles have been reported for *E. coli* cells lacking multiple low molecular weight PBPs (Nilsen et al., 2004; Potluri et al., 2012). For the LD-transpeptidases, participating in PG biosynthesis during cell elongation (Egan et al., 2020; Aliashkevich and Cava, 2021), enhanced expression was found for *ldtE*, but lower expression was seen for *ldtA*, *ldtB*, and *ldtD*. Interestingly, one of these (*ldtB*) localizes to the growth

pole, at least in *A. tumefaciens* (Cameron et al., 2014; Grangeon et al., 2015). These data indicate that RdsA may function as an activator, either directly or indirectly, of the PG biosynthetic pathway. The complex phenotype displayed by mutant cKD24, characterized by a change in cell shape and altered cell division, may be the product of the reductions in expression of genes for cell division and PG biosynthesis.

## RdsA Depletion Generates Changes in the Expression of Essential Genes in Oxidative Respiration and Translation

Concerning the DEGs involved in oxidative respiration, most of the genes of the *nuo* clusters, which encode respiratory complex I, were shown to be downregulated. Similar behavior was observed for the succinate dehydrogenase operon (*sdhBADC*), comprising respiratory complex II. A large fraction of the genes that encode the ATP synthase complex in *R. etli*, affecting both the F<sub>1</sub> (*atpA*, *C*, *D*, *G*, *H*) and the F<sub>0</sub> (*atpB*) regions were also downregulated in cKD24. The marked reduction in expression of genes for respiratory complexes suggests that the mutant cKD24 could face difficulties in the generation of energy.

Surprisingly, reductions in expression of several genes that participate in ribosome structure and function, corroborated by RT-qPCR (**Supplementary Figure 4**), were also seen. For structural ribosomal proteins, S7 (*rpsG*), L5 (*rplE*), L13 (*rplM*) and L35 (*rplI*) displayed reduced expression in cKD24. Significant reductions were also seen for *infC* that encodes for the translation initiation factor IF-3 (Singh et al., 2005) and *proS* encoding the proline-tRNA ligase (Zajac et al., 2020). These results suggest that cKD24 may present problems in the synthesis of proteins.

## DISCUSSION

In this study we show that *rdsA* plays a crucial role in determining cell division and shape in *Rhizobium etli*. Depletion of RdsA causes a round cell phenotype, longer generation time and changes in cell polarity, causing some of the cells to start growing from the old pole. Ectopic growth poles were also seen, giving rise to branched cells. It should be stressed that these changes were seen upon long-term depletion of RdsA. Due to technical limitations, we were unable, at this time, to institute a short-term depletion regime. Thus, it should be kept in mind that an unknown fraction of the changes that we see might be indirect or pleiotropic. Despite this caveat, the combination of changes observed is unusual among mutants affecting cell division in Rhizobiales. Regarding cell shape, round cells were detected upon depletion of GPR in *A. tumefaciens* (Zupan et al., 2019, 2021) or its ortholog (*rgsE*) in *S. meliloti* 1021 (Krol et al., 2020), as well as upon elimination of *cpdR* in *S. meliloti* 1021 (Kobayashi et al., 2009) or *ntfY* in *S. meliloti* GR4 (Calatrava-Morales et al., 2017). A round cell phenotype has been described also in cells that overproduce RgsM in *S. meliloti* 1021 (Schäper et al., 2018). Interestingly, branched cells or changes of polarity were not described in these cases, and no changes in the expression for any of these genes were found in cKD24. Changes in stoichiometry

of specific proteins in the *minCDE* system of *S. meliloti* 1021 may affect cell shape and branching (Cheng et al., 2007). These effects require imbalance between the *min* components, such as elimination of *minE* but preservation of the other proteins, and were not seen upon knocking-out of the whole operon. Overproduction of *minCDE* produces filamentous cells, with multiple branching points (Cheng et al., 2007). In contrast, reduced expression of the *minCDE* was observed in the cKD24 mutant. Our previous work (Landeta et al., 2011) revealed that a mutation in *minCDE* produced a high amount of minicells.

Medium-dependent shape changes toward round cells, sometimes coupled with delocalization of a polar protein, were seen upon overproduction of specific proteins in *S. meliloti*, such as RgsA, RgsB, RgsC or RgsS, but not upon their depletion (Krol et al., 2020). Moreover, expression of the corresponding orthologous genes remained unaltered in mutant cKD24.

Formation of ectopic growth poles, branching and changes in polarity were seen upon depletion of polar-organizing proteins or global regulators. For instance, deletion of regulators such as *divK*, *pleC* or the *pleC*-related regulator *pdhS1* in *A. tumefaciens* generated branched cells with ectopic growth poles (Kim et al., 2013). In *A. tumefaciens*, either elimination or depletion of *popZ* lead to the formation of ectopic growth poles, branching and even minicell formation (Grangeon et al., 2017; Howell et al., 2017). Mutants depleted of PodJ in *A. tumefaciens* revealed a high proportion of branched cells with ectopic growth poles, as well as a low proportion of minicells (Anderson-Furgeson et al., 2016). In these mutants, a high proportion of cells with a changed polarity (as much as 47%), were also seen, linked to a mislocalization of the PopZ protein (Anderson-Furgeson et al., 2016). Similarly, a *podJ1* mutant in *S. meliloti* showed a medium-dependent apparition of branched cells, sometimes with multiple growth poles (Fields et al., 2012). Alterations in the expression of these genes were not seen for mutant cKD24. In fact, the combination of effects seen upon depletion of RdsA (round cell shape, changes in polarity, ectopic growth poles and branched cells), remains unique among mutants affecting cell division in the Rhizobiales.

The transcriptomic analysis of mutant cKD24 reveals that RdsA acts as a global transcriptional regulator. Although many of the genes with altered expression in the mutant have not been characterized, it is clear that depletion of RdsA alters, either directly or indirectly, at least five biological processes, namely cell division, cell wall biosynthesis, aerobic respiration, translation and motility. Regarding cell division, reduced transcript levels were detected for many of the genes that participate in divisome assembly (such as *ftsA*, *E*, *I*, *K1*, *K2*, *Q*, *W*, *X*, and *Z*) and proper septum formation (*minCDE*). Reduced transcript levels were also seen for *dnaA* (crucial for DNA replication) *dipI* (interacting with *ftsQLB*) and for global regulators such as *cckA* and *gcrA*, but not *ctrA*. For cell wall biosynthesis, reduced transcript levels were seen for genes participating in almost every step of peptidoglycan biosynthesis, including precursor synthesis, flipping, transpeptidation and transglycosylation. Aerobic respiration also showed extensive downregulation, affecting complex I (the *nuo* clusters), complex II (succinate dehydrogenase system), and complex V (ATP

synthase). Genes encoding proteins of significance for the translation process were also downregulated, including four ribosomal proteins (for the small and large subunits of the ribosome), an initiation factor for translation (IF-3) and a unique gene for tRNA<sub>pro</sub> synthesis (*proS*). Cell motility was also affected, with significantly reduced expression in 36 out of the 52 genes that comprise the motility cluster.

It is not easy to explain the pattern of expression displayed by mutant cKD24 by invoking control of known regulatory genes involved in each biological process. For cell cycle control, the master regulatory gene in many bacteria is *ctrA*, but *ctrA* was not differentially expressed in cKD24. However, alterations in functioning of the CtrA system may occur at the posttranscriptional level, which it was not explored in this work. Although the *ctrA* regulon has not been described in *R. etli*, it was reported for the related bacterium *S. meliloti* (Pini et al., 2015). An inspection of the differentially expressed genes in the *ctrA* depleted strain of *S. meliloti* and cKD24 in *R. etli*, revealed just a few relevant similarities, restricted mainly to *dipI*, *mcpA*, *mcpE*, *mcpZ*, *minCDE*, and PBP6b. Similarly, transcriptomic analysis of strains depleted or lacking known regulatory genes involved in cell division, such as *ntfY* in *S. meliloti* GR4 (Calatrava-Morales et al., 2017), *cdnL* (Woldemeskel et al., 2020) and *hfq* (Irnov et al., 2017) in *C. crescentus*, did not reveal similarities with the transcriptional pattern described for the depletion of RdsA.

The phenotypic effects of depletion of RdsA on cell shape, division and polarity can be attributed to the changes in functioning of key genes for cell division and peptidoglycan assembly. At this moment, is not possible to ascertain what components are under the direct control of RdsA, and which are due to indirect control. The main difficulty is that RdsA is a predicted hybrid histidine kinase, but its response element remains unknown, a point which will be the subject of future work. As mentioned before, convincing orthologs to *rdsA* are mainly restricted to the Rhizobiales, including *Agrobacterium* and *Rhizobium* species.

Coordination between division and cell metabolism is an essential aspect for the evolutionary success of any organism (Sperber and Herman, 2017; Bergé et al., 2020). RdsA in *Rhizobium* may be a key regulator controlling a plethora of functions relevant not only to division, but also for general cell metabolism. Understanding this mechanism, including the target genes subject to direct control, will be the aim of future work.

## MATERIALS AND METHODS

### Growth Conditions

All the *Rhizobium etli* strains were grown in PY medium supplemented with calcium chloride (Noel et al., 1984) or in MMY minimal medium (Bravo and Mora, 1988) supplemented with biotin at 1 mg l<sup>-1</sup>, at 30°C. When needed, cumate (10 µg ml<sup>-1</sup>) or Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 1.0 mM) were added as inducers. *Escherichia coli* strains were grown in LB broth at 37°C. When needed, antibiotics were added at the following concentrations (in µg ml<sup>-1</sup>): kanamycin (Kan), 30; nalidixic acid (Nal), 20; gentamicin (Gm), 30 and spectinomycin

(Sp), 100, tetracycline (Tet), 10. For *R. etli* growth curves, overnight cultures of the appropriate strains in PY medium were centrifuged, washed in saline solution and used to inoculate 200 µl microplate cultures to an A<sub>600</sub> of 0.05. Microplates were incubated at 30°C, with hourly determinations of absorbance in a BioTek Synergy<sup>TM</sup> HT reader. For viability determinations, the alamarBlue<sup>TM</sup> HS cell viability reagent (Invitrogen) was used, according to the instructions of the manufacturer.

### Primers and Strain Construction

The conditional knockdown (cKD) mutagenesis employed aimed to put gene *rdsA* (RHE\_PE00024) under the control of a cumate-inducible promoter. To that end, a region encompassing the transcriptional repressor CymR in conjunction with the PR/cmtO promoter (Chubiz et al., 2013) was amplified by PCR and ligated into pK18mob (Schäfer et al., 1994), generating pMASQ plasmid. The specific knockdown vector was generated by amplification of a 306 pb segment of *rdsA* (encompassing the translation initiation site and 295 bp downstream) and ligated into pMASQ, giving rise to pMASQ:*rdsA*<sub>300nt</sub>. This plasmid was transformed into *E. coli* S17-1 and used as donor in plate biparental matings with *R. etli* CE3, selecting for transconjugants resistant to Nal and Kan. A single-crossover recombination event with the homologous target cointegrates the whole plasmid, producing the displacement of the native *rdsA* promoter and the incorporation of the cumate-inducible promoter upstream of the full-length *rdsA* gene (strain cKD24). To minimize apparition of second-site suppressors of cKD24, all experiments were started either from newly-constructed cKD24 or from frozen stocks preserved in glycerol. For complementation, the full-length *rdsA* was cloned into the replicative plasmid pSRKGm (Khan et al., 2008), under the control of a *lac*-inducible promoter, with the restriction enzymes *NdeI*-*Bam*HI, giving rise to pSRKGm:*rdsA*. Primers employed in this work are shown in **Supplementary Datasets 1A,B**. All primers were designed with Primer-BLAST software, and purchased from commercial providers. Taq DNA polymerase (Thermo Scientific) and Platinum Taq polymerase (Invitrogen), were used in PCRs.

### Microscopy

For static visualization, samples of 9 h liquid cultures in PY medium (either with or without inducer) of *R. etli* strains were spotted on agarose beds (1% in PBS buffer, Grace Bio-Labs SecureSeal<sup>TM</sup> imaging spacer) and analyzed on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope, using 100X/1.45 NA Plan Achromat oil objective. Images were recorded with a Nikon DS-Qi2 camera. For DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining, cell pellets (washed thrice with PBS buffer), were resuspended in PBS and DAPI was added to a final concentration of 3 µg ml<sup>-1</sup>, cells were incubated in the dark for 5–10 min at ambient temperature. Cell washed three times in the same PBS buffer were spotted on an agarose pad and observed. Fluorescence was detected using a maximum emission of 456 nm, excitation of 340 nm filters. For time-lapse microscopy, samples of 9 h liquid cultures in PY medium of *R. etli* strains were spotted on agarose pads (1% in MMY medium, FluoroDish<sup>TM</sup> plates). Images were captured every 10 min for 24 h with Nikon Eclipse Ti inverted stand,

using 100X/1.45 NA Plan Apochromat oil objective, a Nikon DS-Qi2 camera and the Nikon's Digital Sight DS-U3 camera controller. Control of imaging parameters was done with Nikon NIS-Elements AR 4.20 software and a perfect focus system. Temperature (30°C) and humidity control was maintained with a Lexan Enclosure Unit with Oko-touch temperature control. Time-lapse series were analyzed with Fiji (Schindelin et al., 2012).

## Bacterial Two-Hybrid Homodimerization Assay

A LexA-based two-hybrid system (Dmitrova et al., 1998) was used. Full-length *rdsA* gene was amplified by PCR from genomic DNA of *R. etli* CE3, ligated into the LexA plasmid (pSR658-A) and transformed into *E. coli* SU101. *E. coli* SU101 harboring different plasmid constructs were grown ( $A_{600} = 1.0$ ) in LB medium with Tet, Kan, and IPTG. The  $\beta$ -galactosidase and microplate protein concentration determinations were as previously described (Guadarrama et al., 2014). The extent in reduction of  $\beta$ -galactosidase activity was used as a proxy of homodimerization efficiency (Dmitrova et al., 1998). For complementation with *rdsAW169R* in *R. etli*, the wild type *rdsA* gene was excised from plasmid pSRKGm:*rdsA* and substituted by a *BlpI*-*AatII* segment harboring *rdsAW169R* (generated by PCR, **Supplementary Dataset 1A**). pSRKGm:*rdsA* and pSRKGm:*rdsAW169R* were transferred separately to cKD24 by biparental matings, selecting for transconjugants on PY medium with Kan, Nal, and Gm.

## Western Blotting

Samples were subjected to SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and transferred to 0.45  $\mu$ m PVDF Immobilon-P membranes (Millipore) in a Tank transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk, incubated with anti-LexA polyclonal antibody or anti-DnaK monoclonal antibody (Ab-cam) and washed with PBS 1X, 0.05% Tween 20. Immunodetection was performed with a 1:15,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (polyclonal) or anti-mouse (monoclonal) antibodies (MDL Millipore Corporation) and visualized with an Immobilon Western chemiluminescence reagent kit (Millipore).

## RNAseq Analysis

Uninduced *R. etli* strains were grown in MMY at 30°C to an  $A_{620}$  of 0.5 (9 h). Three biological replicates were set up for each strain analyzed. Cell pellets for each replicate ( $10^8$  cells) were stored on RNAlater (Thermo-Fisher). RNA extraction, rRNA depletion, library preparation and Illumina sequencing was done by GeneWiz (South Plainfield, NJ, United States). Quality checking was done using FastQC<sup>1</sup> and sequences were trimmed using Trimmomatic v.0.36 (Bolger et al., 2014). Paired-end reads were mapped toward *R. etli* CFN42 reference genome (GenBank accession number GCF\_000092045.1) using Bowtie2 aligner v.2.2.6. (Langmead and Salzberg, 2012). Read counts for each CDS (6226) were generated using featureCounts software (Liao

et al., 2014), allowing MultiMapping and MultiOverlap reads. For Principal Component Analysis (PCA), the NOISeq PCA function (Tarazona et al., 2015) was used, and clustering was done with Distance Matrix Computation package in R using the function `dist2`, with normalized counts in natural logarithm. Heatmaps were visualized using `pheatmap3` of R. Differential expression analysis was done with NOISeqBio (Tarazona et al., 2015). Reads were filtered with NOISeq using method 1 and `cpm = 2`. Data post filtering were used for differential gene expression in NOISeqBio, using TMM normalization. For identification of significantly Differentially Expressed Genes (DEGs), False Discovery Rate (FDR) or adjusted *p*-value cutoff  $\leq 0.02$  and  $\log_2$  fold change  $\geq 1.5$  were used. Categorization of DEGs was achieved using the Clusters of Orthologous Groups database (Galperin et al., 2021), and mapped to known metabolic pathways with KEGG Mapper (Kanehisa and Sato, 2020). Significant overrepresentation of gene ontology (GO) groups among DEGs was determined by hypergeometric testing with Gostats (Falcon and Gentleman, 2007), using a *p*-value cutoff  $\leq 0.05$ . The universe used was GO terms in the *R. etli* genome, recovered from Uniprot (The UniProt Consortium, 2017), with the GO database of Gostats. For evaluation the essential genes in the DEG dataset, entries corresponding to *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 in the Database of Essential Genes [DEG (Luo et al., 2014)] were scanned. Matches in the DEG dataset were verified by BLASTP bidirectional best-hit analysis.

## Quantitative PCR Analysis

Transcriptional differences were validated by reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. All primers (**Supplementary Dataset 1B**) amplify 100–300 bp regions. RNA was isolated using Trizol Reagent (Zymo Research), and DNA traces were removed by DNAase I treatment. Absence of DNA from RNA samples was corroborated by PCR with *rpoA* gene primers, and RNA integrity was verified by gel electrophoresis. RNA Purity and concentration were quantified with Nanodrop 20000 Spectrophotometer (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). cDNA was generated with 2.5  $\mu$ g of RNA, using RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). RT-qPCR analysis was carried out on a StepOnePlus (Applied Biosystems<sup>TM</sup>) Real-Time PCR System using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) according to the manufacturer instructions. Three biological replicates were performed for each strain/condition, using three technical repeats. Expression levels were normalized using *rpoA* as reference gene (**Supplementary Dataset 1B**). The relative expression (RQ) was determined as  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . To detect significant differences between samples, an unpaired Student's *t*-test (*t* test function of the stats package in R) was used, employing the RQ values and a cutoff  $P \leq 0.05$ . RQ values were converted to  $\log_2$  fold changes, where RQ values  $\geq 0.65$  are shown as positive  $\log_2$  fold change, and RQ values  $\leq 0.65$  as negative  $\log_2$  fold change. To give a negative value of RQ values  $\leq 0.65$ , we use the formula  $(-1)/RQ$ .

<sup>2</sup><https://cran.r-project.org/web/packages/parallelDist/index.html>

<sup>3</sup><https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

<sup>1</sup><https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The RNAseq data generated in this study have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (GEO Series accession no. GSE184428).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DR conceived the study through discussion with all the co-authors, supervised the work, got the funding, and, together with SM-A, wrote the draft manuscript. SM-A constructed the knockdown mutant, carried out all the microscopical visualization and time-lapse experiments, and performed the bioinformatic analysis of the RNAseq experiment. CG performed the experiments for homodimerization analysis and constructed complemented strains. AD lent general lab support and performed initial work for characterization of the *rdsA* gene. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

SM-A was supported during the Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional

Autónoma de México) by scholarship 420679 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México). CG was supported by a postdoctoral fellowship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was partially supported by grant 255365 from Fondo SEP-CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México).

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Susana Brom, Lourdes Girard and José Luis Puente for helpful comments during this work, Laura Cervantes for general technical support, José Carlos Hernández and Rafael Peña for advice on time-lapse microscopy, Paul Gaytán and Eugenio López (Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos, IBT-UNAM) for oligonucleotide synthesis and Jorge Yáñez (Unidad de Secuenciación, IBT-UNAM) for Sanger sequencing.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.858440/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Aliashkevich, A., and Cava, F. (2021). LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *FEBS J.* [Epub online ahead of print]. doi: 10.1111/febs.16066
- Anderson-Furgeson, J. C., Zupan, J. R., Grangeon, R., and Zambryski, P. C. (2016). Loss of PodJ in *Agrobacterium tumefaciens* leads to ectopic polar growth, branching, and reduced cell division. *J. Bacteriol.* 198, 1883–1891. doi: 10.1128/JB.00198-16
- Bergé, M., Pezzatti, J., González-Ruiz, V., Degeorges, L., Mottet-Osman, G., Rudaz, S., et al. (2020). Bacterial cell cycle control by citrate synthase independent of enzymatic activity. *Elife* 9:e52272. doi: 10.7554/eLife.52272
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bravo, A., and Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170, 980–984. doi: 10.1128/jb.170.2.980-984.1988
- Brom, S., García de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44, 34–43. doi: 10.1006/plas.2000.1469
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., et al. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174, 5183–5189. doi: 10.1128/jb.174.16.5183-5189.1992
- Brown, P. J. B., de Pedro, M. A., Kysela, D. T., Van der Henst, C., Kim, J., De Bolle, X., et al. (2012). Polar growth in the Alpha *proteobacteria* order Rhizobiales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1697–1701. doi: 10.1073/pnas.1114476109
- Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Amezttoy, K., van Steenberg, B., and Soto, M. J. (2017). The NtrY/NtrX system of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production, and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 30, 566–577. doi: 10.1094/MPMI-01-17-0021-R
- Cameron, T. A., Anderson-Furgeson, J., Zupan, J. R., Zik, J. J., and Zambryski, P. C. (2014). Peptidoglycan synthesis machinery in *Agrobacterium tumefaciens* during unipolar growth and cell division. *mBio* 5, e1219–e1214. doi: 10.1128/mBio.01219-14
- Cameron, T. A., Zupan, J. R., and Zambryski, P. C. (2015). The essential features and modes of bacterial polar growth. *Trends Microbiol.* 23, 347–353. doi: 10.1016/j.tim.2015.01.003
- Cava, F., Kuru, E., Brun, Y. V., and de Pedro, M. A. (2013). Modes of cell wall growth differentiation in rod-shaped bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 731–737. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.004
- Cheng, J., Sibley, C. D., Zaheer, R., and Finan, T. M. (2007). A *Sinorhizobium meliloti* *minE* mutant has an altered morphology and exhibits defects in legume symbiosis. *Microbiol. Read Engl.* 153, 375–387. doi: 10.1099/mic.0.2006/001362-0
- Chubiz, L. M., Purswani, J., Carroll, S. M., and Marx, C. J. (2013). A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens*. *BMC Res. Notes.* 6:183. doi: 10.1186/1756-0500-6-183
- Collier, J. (2016). Cell cycle control in Alpha *proteobacteria*. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 107–113. doi: 10.1016/j.mib.2016.01.010
- Curtis, P. D., and Brun, Y. V. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 13–41. doi: 10.1128/mmbr.00040-09
- Curtis, P. D., and Brun, Y. V. (2014). Identification of essential alpha *proteobacterial* genes reveals operational variability in conserved developmental and cell cycle systems. *Mol. Microbiol.* 93, 713–735. doi: 10.1111/mmi.12686
- Delaby, M., Panis, G., and Viollier, P. H. (2019). Bacterial cell cycle and growth phase switch by the essential transcriptional regulator CtrA. *Nucleic Acids Res.* 47, 10628–10644. doi: 10.1093/nar/gkz846
- Dewachter, L., Verstraeten, N., Fauvart, M., and Michiels, J. (2018). An integrative view of cell cycle control in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 116–136. doi: 10.1093/femsre/fuy005
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., and Granger-Schnarr, M. (1998). A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257, 205–212. doi: 10.1007/s004380050640

- Egan, A. J. F., Errington, J., and Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 446–460. doi: 10.1038/s41579-020-0366-3
- Falcon, S., and Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 23, 257–258. doi: 10.1093/bioinformatics/btl567
- Fields, A. T., Navarrete, C. S., Zare, A. Z., Huang, Z., Mostafavi, M., Lewis, J. C., et al. (2012). The conserved polarity factor podJ1 impacts multiple cell envelope-associated functions in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 84, 892–920. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08064.x
- Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Alvarez, R. V., Landsman, D., and Koonin, E. V. (2021). COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Res.* 49, D274–D281. doi: 10.1093/nar/gkaa1018
- Gao, R., and Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 133–154. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., et al. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3834–3839. doi: 10.1073/pnas.0508502103
- Grangeon, R., Zupan, J., Jeon, Y., and Zambryski, P. C. (2017). Loss of PopZ<sub>At</sub> activity in *Agrobacterium tumefaciens* by deletion or depletion leads to multiple growth poles, minicells, and growth defects. *mBio* 8, e1881–e1817. doi: 10.1128/mBio.01881-17
- Grangeon, R., Zupan, J. R., Anderson-Furgeson, J., and Zambryski, P. C. (2015). PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11666–11671. doi: 10.1073/pnas.1515544112
- Guadarrama, C., Medrano-López, A., Oropeza, R., Hernández-Lucas, I., and Calva, E. (2014). The *Salmonella enterica* serovar Typhi LeuO global regulator forms tetramers: residues involved in oligomerization, DNA binding, and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 196, 2143–2154. doi: 10.1128/JB.01484-14
- Haeusser, D. P., and Margolin, W. (2016). Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 305–319. doi: 10.1038/nrmicro.2016.26
- Hallez, R., Bellefontaine, A.-F., Letesson, J.-J., and Bolle, X. D. (2004). Morphological and functional asymmetry in  $\alpha$ -proteobacteria. *Trends Microbiol.* 12, 361–365. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.002
- Howell, M., Aliashkevich, A., Salisbury, A. K., Cava, F., Bowman, G. R., and Brown, P. J. B. (2017). Absence of the polar organizing protein PopZ results in reduced and asymmetric cell division in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 199, e101–e117. doi: 10.1128/JB.00101-17
- Irnov, I., Wang, Z., Jannetty, N. D., Bustamante, J. A., Rhee, K. Y., and Jacobs-Wagner, C. (2017). Crosstalk between the tricarboxylic acid cycle and peptidoglycan synthesis in *Caulobacter crescentus* through the homeostatic control of  $\alpha$ -ketoglutarate. *PLoS Genet.* 13:e1006978. doi: 10.1371/journal.pgen.1006978
- Kanehisa, M., and Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci.* 29, 28–35. doi: 10.1002/pro.3711
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M. II, and Farrand, S. K. (2008). Broad-Host-Range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5053–5062. doi: 10.1128/AEM.01098-08
- Kim, J., Heindl, J. E., and Fuqua, C. (2013). Coordination of division and development influences complex multicellular behavior in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS One* 8:e56682. doi: 10.1371/journal.pone.0056682
- Kobayashi, H., De Nisco, N. J., Chien, P., Simmons, L. A., and Walker, G. C. (2009). *Sinorhizobium meliloti* CpdR1 is critical for co-ordinating cell cycle progression and the symbiotic chronic infection. *Mol. Microbiol.* 73, 586–600. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06794.x
- Krol, E., Stuckenschneider, L., Kästle Silva, J. M., Graumann, P. L., and Becker, A. (2021). Stable inheritance of *Sinorhizobium meliloti* cell growth polarity requires an FtsN-like protein and an amidase. *Nat. Commun.* 12:545. doi: 10.1038/s41467-020-20739-3
- Krol, E., Yau, H. C. L., Lechner, M., Schäper, S., Bange, G., Vollmer, W., et al. (2020). Tol-Pal system and Rgs proteins interact to promote unipolar growth and cell division in *Sinorhizobium meliloti*. *mBio* 11, e306–e320. doi: 10.1128/mBio.00306-20
- Krupka, M., and Margolin, W. (2018). Unite to divide: oligomerization of tubulin and actin homologs regulates initiation of bacterial cell division. *FI000Res.* 7:235. doi: 10.12688/fi000research.13504.1
- Kysela, D. T., Randich, A. M., Caccamo, P. D., and Brun, Y. V. (2016). Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology. *PLoS Biol.* 14:e1002565. doi: 10.1371/journal.pbio.1002565
- Landeta, C., Dávalos, A., Cevallos, M. Á., Geiger, O., Brom, S., and Romero, D. (2011). Plasmids with a Chromosome-Like Role in Rhizobia. *J. Bacteriol.* 193, 1317–1326. doi: 10.1128/JB.01184-10
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Meth.* 9, 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L., and McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4632–4637. doi: 10.1073/pnas.062065699
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M., and Shapiro, L. (2000). Global Analysis of the Genetic Network Controlling a Bacterial Cell Cycle. *Science* 290, 2144–2148. doi: 10.1126/science.290.5499.2144
- Levin, P. A., and Janakiraman, A. (2021). Localization, assembly, and activation of the *Escherichia coli* cell division machinery. *Ecosal Plus* 9, eES-0022–2021. doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0022-2021
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Luo, H., Lin, Y., Gao, F., Zhang, C. T., and Zhang, R. (2014). DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Res.* 42, D574–D580. doi: 10.1093/nar/gkt1131
- Mann, T. H., Seth Childers, W., Blair, J. A., Eckart, M. R., and Shapiro, L. (2016). A cell cycle kinase with tandem sensory PAS domains integrates cell fate cues. *Nat. Commun.* 7:11454. doi: 10.1038/ncomms11454
- Männik, J., and Bailey, M. W. (2015). Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 6:306. doi: 10.3389/fmicb.2015.00306
- Möglich, A., Ayers, R. A., and Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure* 17, 1282–1294. doi: 10.1016/j.str.2009.08.011
- Nilsen, T., Ghosh, A. S., Goldberg, M. B., and Young, K. D. (2004). Branching sites and morphological abnormalities behave as ectopic poles in shape-defective *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 52, 1045–1054. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04050.x
- Noel, K. D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155. doi: 10.1128/jb.158.1.148-155.1984
- Osorio, A., Camarena, L., Cevallos, M. A., and Poggio, S. (2017). A new essential cell division protein in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 199, e811–e816. doi: 10.1128/JB.00811-16
- Pini, F., De Nisco, N. J., Ferri, L., Penterman, J., Fioravanti, A., Brillì, M., et al. (2015). Cell cycle control by the master regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet.* 11:e1005232. doi: 10.1371/journal.pgen.1005232
- Pini, F., Frage, B., Ferri, L., De Nisco, N. J., Mohapatra, S. S., Taddei, L., et al. (2013). The DivJ, CbrA and PleC system controls DivK phosphorylation and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 90, 54–71. doi: 10.1111/mmi.12347
- Poncin, K., Gillet, S., and De Bolle, X. (2018). Learning from the master: targets and functions of the CtrA response regulator in *Brucella abortus* and other  $\alpha$ -proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 500–513. doi: 10.1093/femsre/fuy019
- Potluri, L., de Pedro, M. A., and Young, K. D. (2012). *Escherichia coli* low-molecular-weight penicillin-binding proteins help orient septal FtsZ, and their absence leads to asymmetric cell division and branching. *Mol. Microbiol.* 84, 203–224. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08023.x
- Quon, K. C., Marczyński, G. T., and Shapiro, L. (1996). Cell Cycle Control by an Essential Bacterial Two-Component Signal Transduction Protein. *Cell* 84, 83–93. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80995-2
- Rodríguez, S., Correa-Galeote, D., Sánchez-Pérez, M., Ramírez, M., Isidra-Arellano, M. C., Reyero-Saavedra, et al. (2020). A novel OmpR-Type response

- regulator controls multiple stages of the *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* N2-Fixing symbiosis. *Front. Microbiol.* 11:615775. doi: 10.3389/fmicb.2020.615775
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y. L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 959–968. doi: 10.1038/nrmicro1290
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schäper, S., Yau, H. C. L., Krol, E., Skotnicka, D., Heimerl, T., Gray, J., et al. (2018). Seven-transmembrane receptor protein RgsP and cell wall-binding protein RgsM promote unipolar growth in Rhizobiales. *PLoS Genet.* 14:e1007594. doi: 10.1371/journal.pgen.1007594
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Meth.* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Singh, N. S., Das, G., Seshadri, A., Sangeetha, R., and Varshney, U. (2005). Evidence for a role of initiation factor 3 in recycling of ribosomal complexes stalled on mRNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 33, 5591–5601. doi: 10.1093/nar/gki864
- Sperber, A. M., and Herman, J. K. (2017). Metabolism Shapes the Cell. *J. Bacteriol.* 199, e39–e17. doi: 10.1128/JB.00039-17
- Straume, D., Piechowiak, K. W., Kjos, M., and Håvarstein, L. S. (2021). Class A PBPs: it is time to rethink traditional paradigms. *Mol. Microbiol.* 116, 41–52. doi: 10.1111/mmi.14714
- Taguchi, A., Welsh, M. A., Marmont, L. S., Lee, W., Sjødt, M., Kruse, A. C., et al. (2019). FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nat. Microbiol.* 4, 587–594. doi: 10.1038/s41564-018-0345-x
- Tarazona, S., Furio-Tari, P., Turra, D., Pietro, A. D., Nueda, M. J., Ferrer, A., et al. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* 43:e140. doi: 10.1093/nar/gkv711
- The UniProt Consortium (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099
- Williams, M. A., Aliashkevich, A., Krol, E., Kuru, E., Bouchier, J. M., Rittichier, J., et al. (2021). Unipolar peptidoglycan synthesis in the Rhizobiales requires an essential class A penicillin-binding protein. *mBio* 12:e0234621. doi: 10.1128/mBio.02346-21
- Woldemeskel, S. A., Daitch, A. K., Alvarez, L., Panis, G., Zeinert, R., Gonzalez, D., et al. (2020). The conserved transcriptional regulator CdnL is required for metabolic homeostasis and morphogenesis in *Caulobacter*. *PLoS Genet.* 16:e1008591. doi: 10.1371/journal.pgen.1008591
- Woldemeskel, S. A., and Goley, E. D. (2017). Shapeshifting to survive: Shape determination and regulation in *Caulobacter crescentus*. *Trends Microbiol.* 25, 673–687. doi: 10.1016/j.tim.2017.03.006
- Zajac, J., Anderson, H., Adams, L., Wangmo, D., Suhail, S., Almen, A., et al. (2020). Effects of distal mutations on Prolyl-Adenylate formation of *Escherichia coli* Prolyl-tRNA synthetase. *Protein J.* 39, 542–553. doi: 10.1007/s10930-020-09910-3
- Zupan, J., Guo, Z., Biddle, T., and Zambryski, P. (2021). *Agrobacterium tumefaciens* Growth Pole Ring Protein: C terminus and internal apolipoprotein homologous domains are essential for function and subcellular localization. *mBio* 12, e764–e721. doi: 10.1128/mBio.00764-21
- Zupan, J. R., Grangeon, R., Robalino-Espinosa, J. S., Garnica, N., and Zambryski, P. (2019). GROWTH POLE RING protein forms a 200-nm-diameter ring structure essential for polar growth and rod shape in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 10962–10967. doi: 10.1073/pnas.1905900116

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Martínez-Absalón, Guadarrama, Dávalos and Romero. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Resultados

El análisis de la capacidad de sistemas de inducibles en control de la expresión en genes en *R. etli*, así como, los resultados referentes al gen RHE\_PE00001, se encuentran en resultados adicionales. Los resultados más relevantes en cuanto a la caracterización funcional del regulador RHE\_PE00024, nombrado como *rdsA*, se encuentran el artículo publicado por Martínez-Absalón et al. 2022 en *Frontiers in Microbiology* (Front. Microbiol. 13:858440. doi: 10.3389/fmicb.2022.858440) . En este trabajo presentamos las siguientes evidencias

La depleción en la expresión del gen *rdsA* (mutante cKD24) generó alteraciones en la forma celular. En ausencia de inducción, la mutante cKD24 mostró células con forma redonda en un 63.3%. En presencia de inducción, las células redondas continuaron observándose, aunque en una proporción más baja (41.2%). Adicionalmente, fue posible observar que cKD24 mantenía una expresión baja del gen *rdsA* en ausencia de inducción e inclusive en presencia del inductor (4.6 y 12 % con respecto a la cepa silvestre CE3, respectivamente). Por lo cual fue necesario colocar copias extras del gen completo *rdsA* en un plásmido con un promotor inducible. Esta última cepa (cKD24 pSRKGm::*rdsA*) mostró una expresión de *rdsA* similar a la cepa silvestre. Adicionalmente, presento células con forma bacilar de manera similar a la cepa silvestre.

La proteína HK-híbrida RdsA presentó homodimerización *in vivo*. Mientras que una versión mutante del gen *rdsA*, *rdsAW167R*, falló en homodimerizar. La transferencia del gen *rdsAW167R*, bajo el control de un promotor inducible, hacia la cepa cKD24, mostró 56.3 y 54.2% de células con forma redonda en ausencia y presencia de inducción respectivamente. Por otro lado, la transferencia de la versión silvestre del gen *rdsA* a la cepa mutante cKD24, mostró una forma celular similar a la cepa silvestre CE3. Esto nos indica que la homodimerización en *rdsA* es necesaria para mantener su función.

La mutante cKD24 mostró alteraciones en división y crecimiento celular, mostrando un comportamiento estocástico. Las células redondas presentaron crecimiento en varios puntos de la célula, incluso de manera simultánea. Las células redondas generaron más comúnmente células redondas (62.6 %) y en ocasiones se generaron células redondas ramificadas (3.3%). El tiempo de generación de células con forma redonda fue notablemente más largo, con un tiempo promedio de 8 h, en comparación al tiempo de división de 2 h en las células silvestre. El crecimiento en cKD24 mostró alteraciones incluso en el porcentaje de células que presentaron una forma bacilar. Las células bacilares en cKD24 presentaron crecimiento ectópico, al presentar crecimiento celular en el polo viejo, normalmente inactivo para la polimerización de peptidoglicano en la cepa silvestre. Las células de la mutante cKD24 generaron células redondas o bacilares sin presentar un patrón claro en el tipo de destino celular en la descendencia de cada célula.

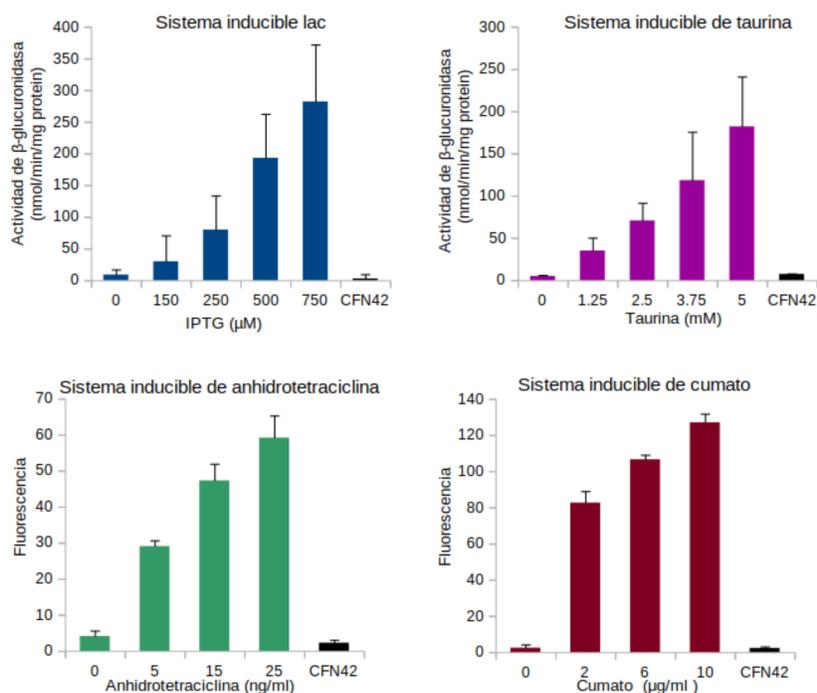
El análisis por RNAseq en la mutante cKD24 mostró que la HK-híbrida RdsA actúa como un regulador global en la expresión de genes en *R. etli*. La depleción en la expresión del gen RdsA generó alteraciones en la expresión de genes involucrados en división celular, formación de pared celular, respiración oxidativa, traducción y motilidad celular. Los

resultados sugieren que la HK-híbrida RdsA es un regulador global que participa en división celular y forma celular.

## Resultados adicionales

### Evaluación de la capacidad de control en la expresión de genes de sistemas inducibles de expresión en *R. etli*.

1.- Existen varios sistemas de expresión inducibles, diseñados para especies cercanas a *R. etli*, que pueden ser utilizados para el control de genes en esta especie. Sin embargo, ninguno de estos sistemas ha sido probado directamente en *R. etli*. Por ello, se analizó la capacidad de control en la expresión de 4 sistemas en *R. etli*, empleando genes reporteros. Los sistemas *lac* y taurina (*tau*) se fusionaron al gen reportero *uidA*, mientras que el sistema de cumato (Q), Anhidrotetraciclina (Ant) se midió usando el gen mCherry. Los cuatro sistemas logran expresar los genes reporteros en *R. etli*. La expresión de los genes reporteros en cada sistema fue proporcional a la concentración del inductor (Fig. 7).

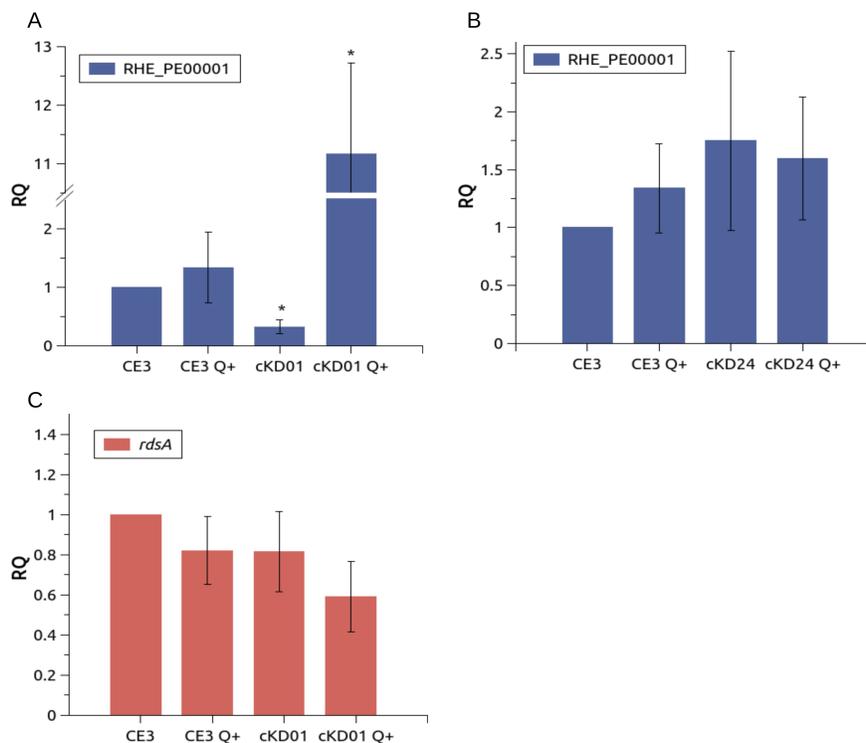


**Figura 7. Los sistemas inducibles *lac*, taurina, anhidrotetraciclina y cumato controlan la expresión de manera dependiente a la concentración de la inducción.** Los sistemas inducibles de *lac* y taurina se analizan utilizando la fusión transcripcional con el gen *uidA*. Las mediciones de la actividad del gen *uidA* se realizan a través de un método colorimétrico y se estandariza el nivel de proteína a nm/min/mg. Los sistemas de anhidrotetraciclina y de cumato se miden a través de la fusión transcripcional de mCherry y se utilizan unidades arbitrarias de fluorescencia

En ocasiones, los sistemas inducibles pueden presentar una expresión basal (en ausencia de inducción) en niveles de expresión que no logran ser lo suficientemente bajos para ver un fenotipo claro de la función de los genes. El sistema de Q presentó menor expresión de mCherry en ausencia de inducción en comparación al sistema Ant. El sistema de Q requiere muy bajas concentraciones de inductor para lograr altos niveles de sobreexpresión (Fig. 7). Estas dos últimas cualidades del sistema de Q, son deseables para lograr bajos niveles de expresión en los genes, y lograr fenotipos informativos de sus funciones.

2.- Una vez seleccionado el sistema inducible por Q como el más óptimo para lograr controlar la expresión de genes en *R. etli*, construimos un plásmido integrativo con el sistema inducible por Q pMASQ (Ver Materials and Methods en Martínez-Absalón). pMASQ fue utilizado para colocar la expresión de los genes esenciales RHE\_PE0001 y *rdsA* bajo control del promotor inducible por Q, generando las mutantes condicionales cKD01 (Materiales y métodos adicionales) y cKD24 (ver Materials and Methods publicados en Martínez-Absalón et al., 2022).

Con la finalidad de analizar la expresión del gen RHE\_PE0001 en la mutante cKD01 utilizamos el análisis por RT-qPCR. Los niveles de expresión del gen RHE\_PE0001 en ausencia de inducción en cKD01 fueron significativamente más bajos, expresando tan solo el 32% con respecto a la cepa silvestre CE3. En presencia del inductor, el nivel de expresión de RHE\_PE0001 en cKD01 fue significativamente más alto, expresándose 10 veces más con respecto a la cepa silvestre (Fig. 8).



**Figura 8. Expresión relativa del gen RHE\_PE00001 y *rdsA* en la cepa silvestre CE3 y las mutantes cKD01 y cKD24.** Análisis por RT-qPCR en presencia de inducción (Q+) o ausencia de inducción. Niveles de expresión relativa (RQ) en el gen RHE\_PE00001 (barras azules) en la cepa silvestre CE3 y las cepas mutantes cKD01(A) y cKD24(B). Expresión relativa (RQ) de *rdsA* (barras rojas) en la cepa cKD01 en comparación con la cepa silvestre CE3 (C). Los niveles de RQ se obtienen al normalizar la expresión con el gen constitutivo *rpoA*. Las mediciones provienen de 3 réplicas biológicas independientes cada una, con 3 réplicas experimentales para cada condición y cada cepa. Las barras de error representan desviación estándar. \* Diferencia estadística significativa en los niveles de RQ entre de la cepa silvestre y el RQ de las cepas mutantes, utilizando la prueba de Student con un corte de pvalue < 0.05

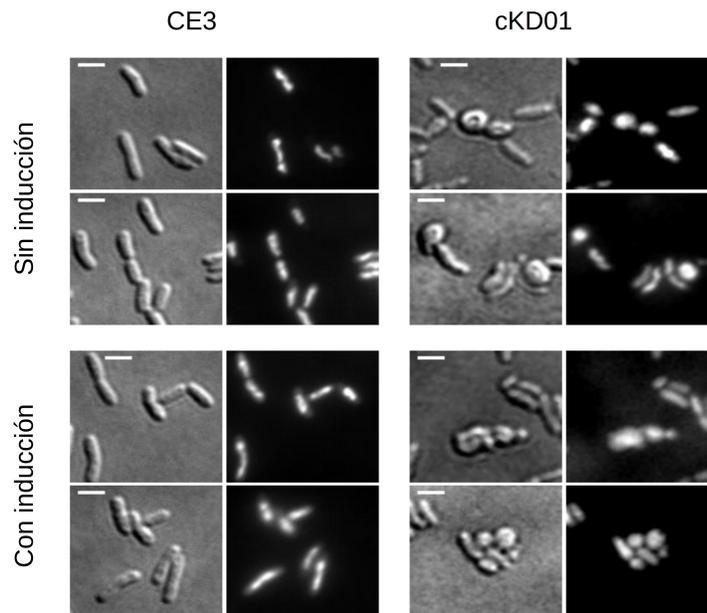
Por tanto, en la mutante cKD01 la expresión del gen RHE\_PE00001 es dependiente del inductor Q.

El gen RHE\_PE00001 codifica para un posible regulador transcripcional, debido a la existencia de un motivo helix-turn-helix. Por otro lado, el gen RHE\_PE00024 codifica para una HK-híbrida. Además, ambos genes se encuentran en el cromosoma secundario p42e y en su contexto genómico son relativamente cercanos. Debido a esto, podría existir la posibilidad de que RHE\_00001 y *rdSA* interaccionen o participen en la misma vía. Para analizar si existe una relación entre el gen RHE\_PE00001 y *rdSA*, revisamos a través de un análisis por RT-qPCR el nivel de expresión de *rdSA* en la mutante cKD01 y el nivel de expresión de RHE\_PE00001 en la mutante cKD24

Los niveles de expresión de *rdSA* en la mutante cKD01 se mostraron similares a la cepa silvestre CE3. Además, el nivel de expresión de RHE\_PE00001 en cKD24 fue similar a la cepa silvestre CE3. Por lo que no fue posible establecer una relación entre ambos genes. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para entender si la actividad de estos genes interactúa en algún nivel.

### La depleción en la expresión del gen RHE\_PE00001 genera cambios en la forma y división celular de *R. etli*.

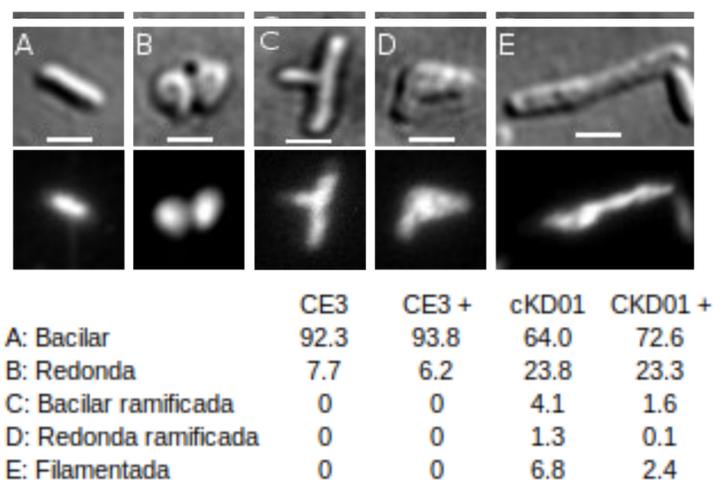
Con la finalidad de tener mayor información sobre la función del gen RHE\_PE00001, las células de la cepa silvestre CE3 y la mutante cKD01, fueron analizadas bajo microscopía óptica y de fluorescencia bajo condiciones de presencia y ausencia de inducción.



**Figura 9. Cambios en la forma celular de *R. etli* CE3 generados por la depleción y la sobreexpresión de RHE\_PE00001.** Microscopía de la cepa silvestre CE3 y la cepa mutante cKD01 en ausencia de inducción (Filas superiores) o en presencia de inducción (Filas inferiores). Las imágenes fueron obtenidas después de 10 h de crecimiento en medio líquido PY. Las células fueron colocadas en almohadillas de agarosa al 1%. Cada imagen DIC (Fondo claro) tiene su correspondiente imagen utilizando tinción con DAPI (Fondo oscuro). Barra de escala 2  $\mu$ m

Las células depletadas en el gen RHE\_PE00001 (ausencia de inducción) en la mutante cKD01, presentaron visibles cambios en su forma celular, en comparación a la forma bacilar en las células de la cepa silvestre CE3. Por otro lado, la adición del inductor (sobrexpresión del gen RHE\_PE00001) generó cambios en la forma celular de la mutante cKD01. La presencia de cumato no alteró de ninguna manera la forma celular en la cepa silvestre CE3 (Fig. 9)

Con la finalidad de detectar la presencia de nucleoide y, por tanto, la posible viabilidad celular, se realizó una tinción con DAPI en ambas cepas y condiciones. Las células fueron observadas bajo microscopía de epi-fluorescencia (Ver Materials and Methods publicados en Martínez-Absalón et al., 2022). Las diferentes formas celulares presentes en la mutante cKD01 en presencia o ausencia de inducción fueron teñidas adecuadamente con DAPI, por lo que fue posible observar material genético en las células. Por otro lado, en las células de la cepa silvestre CE3 también fue posible observar adecuadamente su material genético, tanto en presencia como en ausencia de inducción. Esto sugiere que los cambios en la forma celular de la cepa mutante cKD01 no parecen afectar la viabilidad celular (Fig. 9 y Fig. 10).

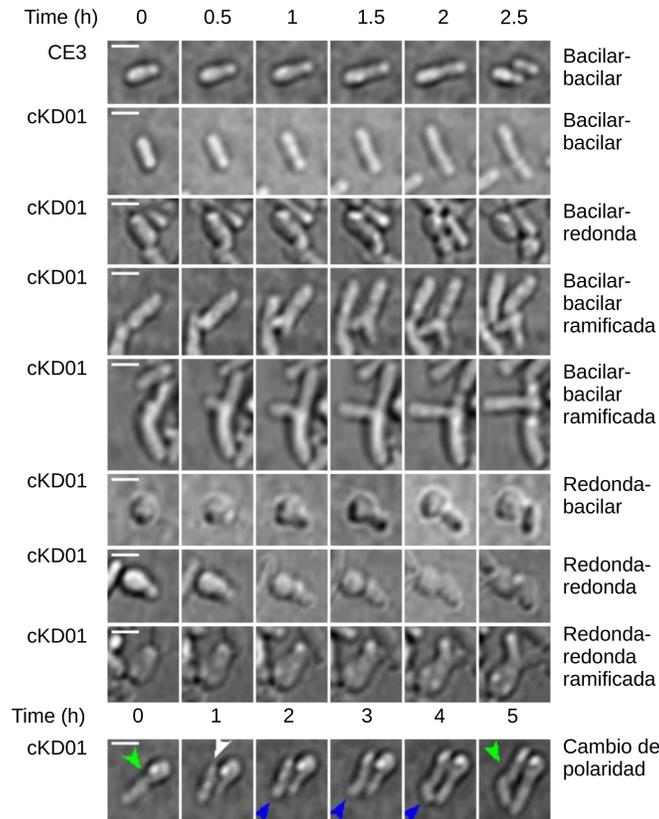


**Figura 10. cKD01 presenta diversos cambios en su forma celular.** Las fotografías son representativas de las diferentes formas celulares observadas en la mutante cKD01. Las células fotografiadas del análisis por microscopía, fueron cuantificadas a través de 3 experimentos con réplicas biológicas independientes. En cada réplica se cuantificaron 300 células para cada cepa en cada condición (ausencia y presencia de inducción (+)). Barra de escala, 2  $\mu$ m.

Para registrar más adecuadamente el efecto causado por la delección y sobreexpresión del gen RHE\_PE00001 en *R. etli*, cuantificamos un total de 900 células para cada cepa y cada condición (ausencia y presencia de inducción) bajo microscopía óptica. La cuantificación se derivó de la observación de 3 réplicas biológicas independientes en cada cepa. Cada réplica biológica fue construida de novo para evitar la aparición de posibles mutaciones secundarias que puedan suprimir el fenotipo de la mutante cKD01.

La cepa silvestre mostró células con forma bacilar tanto en ausencia y presencia de inducción con un 92.3 y un 93.8% respectivamente, el porcentaje restante se constituye de células con una forma redonda (Fig. 10).

cKD01 mostró células redondas en un 23.8%. Adicionalmente, observamos células ramificadas tanto en las células con forma redonda como en las células bacilares, en un 1.3% y 4.1%, respectivamente. Además, se observaron células filamentadas en un 6.8%. Por otro lado, en presencia de inducción, la mutante cKD01 mostró células redondas en un 23.3%, mostrando ramificaciones en un 0.1%. Las células bacilares mostraron ramificaciones en un 1.6. Finalmente, se observó filamentación celular en un 2.4% (Fig. 10).



**Figura 11. cKD01 presenta cambios en la división celular.** Las filas representan imágenes secuenciales del análisis microscópico por time-lapse en la cepa silvestre CE3 y la cepa mutante cKD01. Las células fueron crecidas previamente en medio líquido PY por 9 horas y fueron esparcidas en una almohadilla de medio mínimo al 1% de agarosa. Las células fueron fotografiadas cada 10 minutos bajo microscopía óptica obteniendo imágenes DIC. El tiempo para cada bloque se muestra en la parte superior. En la parte derecha se indica el tipo de cambio en la forma celular detectado. En cada fila el tiempo cero representa el tiempo cero del inicio del experimento de time-lapse, a excepción de las filas de las células que presentan ramificación. Donde la primera fila de bacilar-bacilar ramificada inicia a partir de 6:50 y la segunda fila inicia a partir del tiempo 2:10. Para la fila Redonda-redonda ramificada, la progresión comienza después de 3:40 de haber iniciado el crecimiento. La fila de cambio de polaridad comienza a partir de 4:30 de haber iniciado el crecimiento. Las flechas en esta fila indican la formación del septo (Flechas verdes), y tras su consecuente resolución con la división es posible detectar el polo nuevo en la célula bacilar (flecha blanca) posteriormente observamos elongación celular a través del polo viejo de la célula (polo viejo) hasta la nueva formación de un septo. Barra de escala, 2  $\mu$ m.

Para analizar más atentamente los cambios en la morfología y la forma de división de las células en las cepas de *R. etli*, realizamos un análisis por time-lapse en ausencia de inducción (Ver Materials and Methods publicados en Martínez-Absalón et al., 2022). En este análisis nos fue posible observar la forma de división de las diferentes formas celulares. Fuimos capaces de detectar el crecimiento unipolar y asimétrico esperado en la cepa silvestre CE3 (Fig. 11, fila CE3 Bacilar-bacilar). Este resultado concuerda con lo reportado anteriormente para las Rhizobiales *S. meliloti* y *A. tumefaciens* (Brown et al., 2012).

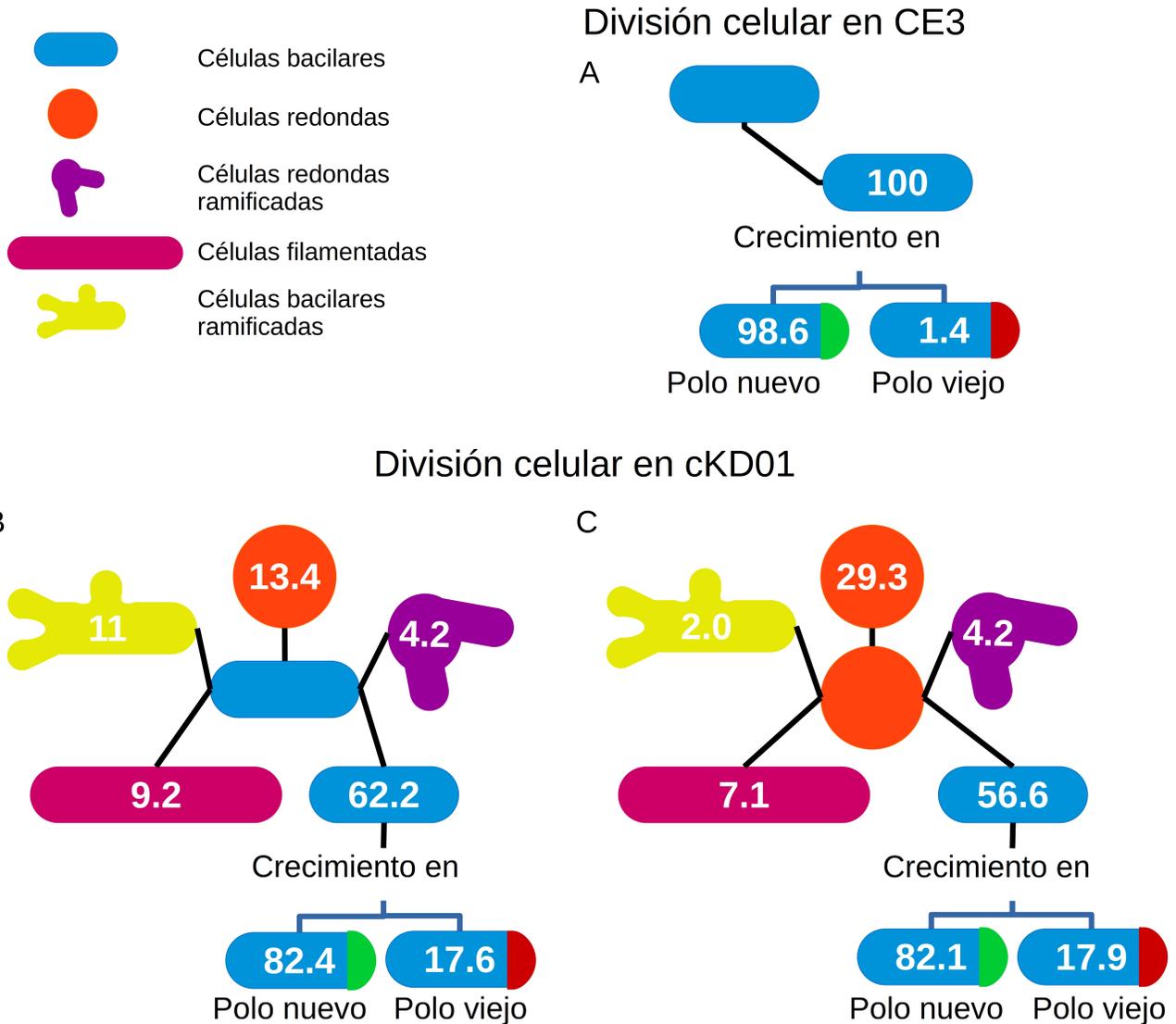
Respecto al crecimiento de la mutante cKD01, pudimos observar crecimiento del tipo silvestre (Fig. 11, fila cKD01 Bacilar-bacilar). No obstante, el crecimiento bacilar fue más lento en la mutante cKD01 con 3 horas para terminar un ciclo de división celular, en comparación de 2 horas para las células silvestres. Además, en la mutante cKD01 observamos diferentes desarrollos celulares dados tanto, en las células con forma bacilar como en las células con forma redonda. En cuanto a las células bacilares, observamos el desarrollo de células redondas (Fig. 11, fila Bacilar-redonda), así como el desarrollo de ramificaciones. Observamos dos tipos de ramificaciones, una ramificación en una forma de “y” donde la célula parte el polo nuevo en dos focos (Fig. 11, Bacilar-bacilar ramificada primera fila). Y ramificaciones en forma de “t”, donde las células desarrollan un foco en la parte media del bacilo (Fig. 11, Bacilar-bacilar ramificada, segunda fila). Además, fue posible observar el desarrollo de filamentación en células bacilares (video 1 Filamentacion). Finalmente, observamos células bacilares con crecimiento a través del polo viejo (Fig. 11, fila Cambio de polaridad).

En lo referente a las células con forma redonda, pudimos observar el desarrollo de células bacilares (Fig. 11, fila Redonda-bacilar), así como, el desarrollo de células redondeadas (Fig. 11, fila Redonda-redonda). Finalmente, observamos el desarrollo de células redondas ramificadas (Fig. 11, fila Redonda-redonda ramificada).

Con la finalidad de registrar el porcentaje de generación de todos estos tipos de desarrollos celulares, seguimos la generación celular, durante 10 horas, de 217 células en la cepa silvestre y 218 células en la mutante cKD01. La totalidad de los bacilos analizados en la cepa silvestre generaron bacilos, y el 1.4% de las células bacilares presentaron crecimiento por el polo viejo (cambio de polaridad). En este análisis no se observaron células con forma redonda en la cepa silvestre CE3 (Fig. 12 A, Resultados publicados en Martínez-Absalón et al., 2022). En el caso de la mutante cKD01, el seguimiento celular se realizó de manera independiente de acuerdo a la forma celular, con un total de 119 células con forma bacilar, y 99 con forma redonda. Las células bacilares en cKD01 generaron 62.2% de células bacilares, de las cuales el 17.6% presentó cambio de polaridad (video 2, Fig. 11, fila cambio de polaridad). Las células bacilares generaron ramificaciones en un 8.8%. Además, se observó filamentación (células con una longitud mayor a 5.5  $\mu\text{m}$ ) en un 9.2%. Finalmente, las células bacilares desarrollaron células redondas en un 8.1%, mientras que el 2.2% restante generó células redondas ramificadas (Fig. 12 B).

En cuanto a las células con forma redonda, el 29.3% generaron células redondas, el 4.2% generó células redondas ramificadas. Las células redondas generaron bacilos ramificados en un 2% y filamentación bacilar en un 7.1%. El 56.6% restante dio paso a células con forma bacilar, de las cuales el 17.9% presentó cambio de polaridad (Fig. 12 C).

Estos resultados muestran que la alteración en la expresión del gen RHE\_PE00001, ya sea en depleción o en sobreexpresión, generan cambios drásticos en la forma del *R. etli* CE3. Esto sugiere que el gen RHE\_PE00001 podría estar involucrado en la determinación de la forma celular de *R. etli*.



**Figura 12. Destino celular en *R. etli* CE3 y cKD01.** Los eventos de división celular fueron seguidos por 10 horas durante el crecimiento en camas de medio mínimo MMY con agarosa al 1%, en ausencia de inducción. El crecimiento fue seguido por medio de imágenes DIC, tomadas cada 10 minutos usando microscopía. Los números representan el porcentaje de divisiones obtenidas en cada tipo de forma celular. Los porcentajes se derivan de un total de 217 células para la cepa silvestre CE3 (Datos publicados en Martínez-Absalón et al., 2022) y de 119 células con forma bacilar y 99 con forma redonda en la cepa mutante cKD01.

## Discusión

Las alfaproteobacterias comparten una forma de división asimétrica (Hallez et al., 2004). No obstante, la vía de regulación del ciclo celular en alfaproteobacterias, difiere de manera llamativa entre los diferentes grupos que la componen. Entre las alfaproteobacterias se conservan parcialmente las vías de regulación. Algunos de los elementos conservados, son los sistemas de dos componentes CtrA-cHpt-CckA, DivJ-DivK, y PleC-PleD. No obstante, las vías de regulación, no se conservan de manera precisa, e incluso, los motivos de unión a DNA de los RR varían dentro de los grupos (De Nisco et al., 2013; Pini et al., 2014; Poncin et al., 2018). En este trabajo proponemos a RdsA como un regulador global involucrado en la determinación de forma celular y división celular en *R. etli*. RdsA codifica para una HK-híbrida que forma parte de un sistema de regulación de dos componentes. Hasta el momento se desconoce el componente de respuesta de la vía.

La delección de RdsA mostró un cambio drástico en la forma celular de *R. etli*, generando células redondas, problemas en división celular, una tasa de crecimiento menor y alteraciones en la forma de división, generando cambios de polaridad y ramificaciones.

El análisis por RNAseq en la cepa depletada en RdsA (cKD24), mostró cambios en la expresión global en varios procesos celulares importantes para el ciclo celular. Como lo son la vía de división celular, biogénesis de pared celular, respiración-oxidativa y motilidad. Una dificultad de este estudio, fue poder determinar cuáles de estas vías o genes blancos, son regulados por RdsA de forma indirecta o directa.

Fue llamativo no haber observado cambios en la expresión de genes como GPR, que fue descrita como una proteína estructural involucrada en la determinación de la forma bacilar en Rhizobiales (Zupan et al., 2019). Además, no observamos cambios en PBP-1a, una PBP propuesta como la mayor responsable en llevar a cabo los enlaces de PG tipo 4,4 en la pared celular en Rhizobiales (William et al., 2021). Por lo que podemos proponer que RdsA regula la forma bacilar por mecanismos distintos.

Dentro de los genes afectados de manera directa o indirecta por RdsA, involucrados en determinación de forma celular, se encuentran, las LD-transpeptidasas, proteínas encargadas del enlace tipo 3,3 de PG en la pared celular. En Rhizobiales, este tipo enlace es el más abundante (Brown et al., 2012; Cameron et al., 2014). Por lo que, el cambio en la expresión de las LD-transpeptidasas observado en la depleción de RdsA, no es menospreciable. *ldtB* se ha descrito en *A. tumefaciens* como una LD-transpeptidasa esencial, involucrada en el crecimiento unipolar y en la determinación de polaridad (Cameron et al., 2014). *ldtB* mostró subexpresión por lo que no podemos descartar que las LD-transpeptidasas jueguen un papel importante en el cambio de forma observado en cKD24. Por lo que podrían ser blancos en la vía de regulación de RdsA.

Por otro lado, fue llamativo observar un cambio drástico en la expresión de MurJ en el análisis de RT-qPCR, donde se observó una subexpresión de 20 veces con respecto a la cepa silvestre. MurJ es una flipasa esencial. La esencialidad de MurJ, ha sido comprobada tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens* (Curtis y Brun, 2014; Ruiz, 2008). MurJ se encarga de transportar el lípido II hacia la membrana, actividad indispensable para la biogénesis de pared celular (Egan et al., 2018). En *E. coli*, la depleción de MurJ genera cambios en la forma celular, generando células con forma redonda y una disminución de PG en la pared celular (Ruiz, 2008). La concordancia con el fenotipo de delección de MurJ, versus el fenotipo observado en la delección de RdsA, aunado a los bajos niveles de subexpresión de MurJ en cKD24, colocan a MurJ como un posible blanco de la vía de regulación de RdsA.

FtsI es la PBP más activa durante la formación del septo. Esta proteína trabaja en conjunto con las proteínas de divisoma, FtsAZQWEXK, para la adecuada formación del septo y división celular (Rothfield et al., 2005). La depleción de RdsA generó una disminución en la expresión en todos estos genes. La subexpresión del conjunto de genes *ftsAZIQWEXK* podría generar errores en la colocación del septo o fallos en su correcta formación. Por lo que la disminución en la expresión de los genes *ftsAZIQWEXK* podría estar involucrada en el fenotipo de ramificación en cKD24. Por lo tanto, los genes del divisoma podrían ser parte de la vía de regulación de RdsA.

Adicionalmente, observamos disminución en la expresión del operón *minCDE*, que en *E. coli* ha sido descrito como esencial para la correcta localización del septo (Rothfield et al., 2005). Sin embargo, esta función de MinCDE no ha podido ser adecuadamente corroborada en Rhizobiales. Incluso existe mayor evidencia de que la función de MinCDE no parece ser vital para la localización del septo en Rhizobiales (Cheng et al., 2007; Flores et al., 2018; Landeta et al., 2011).

En cuanto a los cambios de polaridad observados en RdsA, es notable que genes involucrados en la determinación de polaridad en Rhizobiales, como son PodJ y PopZ, no presentaron cambios en su expresión en la cepa cKD24. No obstante, genes como *ftsA*, *ftsZ* y *ldtB*, han sido reportados como determinantes en la polarización de Rhizobiales, así como esenciales para el crecimiento unipolar. (Grangueon et al., 2015; Zupan et al., 2016; Cameron et al., 2014). *ftsA*, *ftsZ* y *ldtB* fueron encontrados con niveles de subexpresión en cKD24. Por lo que es posible que la disminución en la expresión en estos genes, participe en los cambios de polaridad observados en cKD24.

Algo que nos llamó la atención fue no ver cambios en la expresión del regulador maestro CtrA. Tampoco, observamos cambios en los sistemas de expresión de dos componentes como PleC-PleD y DivK-DivJ. Por lo que podemos proponer que RdsA logra regular la división celular por una vía genética distinta.

RdsA se encuentra codificado en el cromosoma secundario p42e y fue descrito a la par del gen RHE\_PE00001 como genes esenciales responsables de la estabilidad de p42e (Landeta et al., 2011). En este trabajo nos centramos en describir la función de ambos genes esenciales. En lo referente a RHE\_PE00001 construimos la cepa de expresión condicional cK01. Esta cepa mostró depleción del gen RHE\_PE00001 en ausencia de inducción y sobreexpresión, en presencia de inducción. El análisis por microscopía de la cepa mutante cKD01 mostró alteraciones en la forma celular. cKD01 generó células redondas, pero también una fracción de células presentaron filamentos, y ramificaciones. Los cambios en la forma celular en cKD01 se observaron en condiciones de subexpresión y sobreexpresión de RHE\_PE00001. Adicionalmente, fue posible observar crecimiento por el polo viejo de la célula. Estos resultados nos permiten sugerir a RHE\_PE00001 como un posible regulador de la forma celular y división en *R. etli*.

La similitud que existe entre los fenotipos de las cepas depletadas en la expresión de los genes RHE\_PE00001 y *rdsA*, aunado a su cercanía en el genoma, podría llevar a suponer que RHE\_P00001 podría ser el RR de la vía de RdsA. Sin embargo, no hemos podido generar evidencia experimental que lo compruebe. Por el contrario, el análisis por RT-qPCR de la expresión de ambos genes en ambas clonas no mostró una relación o regulación por parte de los genes. De manera similar, el análisis de RNaseq, en la cepa depletada de RdsA, no mostró una relación entre RdsA y RHE\_PE00001. RHE\_PE00001 carece además de los motivos característicos de un regulador de respuesta. Por último, el fenotipo que presenta la

cepa cKD24 es más marcado que el fenotipo de la mutante cKD01. Por estas razones, consideramos que RHE\_PE00001 no es el regulador de respuesta que trabaja con RdsA. Para buscar este regulador de respuesta, Carmen Guadarrama ha generado anticuerpos específicos contra RdsA, los cuales se emplearán en experimentos de *pull down* in vivo, con la intención de ver con qué proteínas se asocia RdsA. Paralelamente, Araceli Dávalos y Carmen Guadarrama están intentando inactivar por mutación cada uno de los 23 reguladores de respuesta en el cromosoma de *R. etli* CFN42. La idea es que el RR que trabaje con RdsA no debería de poderse inactivar por mutación, dado que sería también un gene esencial. Los RR que se comporten como genes esenciales serán modificados para generar expresión condicional de ellos, empleando el sistema de *cumato*. Nos concentraremos en aquel que muestre un fenotipo similar a cKD24, tanto en forma como en división celular. De encontrarse, verificaremos su posible interacción por coimmunoprecipitación, además de realizar experimentos de fosfotransferencia.

Los sistemas de dos componentes que contienen HK-híbridas, frecuentemente requieren de un tercer elemento de interacción, un elemento HPT (Gao y Stock, 2009). En el genoma de *R. etli* CE3 se han reconocido, hasta ahora, dos proteínas con dominios HPT que podrían ser esenciales. El grupo de Lourdes Girard determinó que los genes *hpt* ( RHE\_CH03800) y *chpT* no pueden ser mutados por interrupción (datos no publicados). Para determinar si estos HPTs son parte del sistema de dos componentes de RdsA, Carmen Guadarrama utilizó el sistema de dimerización *in vivo* LexA (Dmitrova et al., 1998). Este sistema podría determinar si alguna de estas HPTs son capaces de heterodimerizar o interactuar con RdsA. Sin embargo, no fue posible demostrar interacción o dimerización entre RdsA y alguno de los dos elementos HPTs analizados. Así mismo, probamos con este mismo sistema LexA, la posible interacción entre RdsA y RHE\_PE00001. Sin embargo, tampoco fue posible encontrar una interacción entre estas dos proteínas.

No obstante, aún son necesarios más estudios para concluir si RdsA y RHE\_PE00001 participan en una misma vía de señalización o si convergen de alguna manera. O bien, si HPT o ChpT son posibles elementos de fosforelevo para RdsA.

Adicionalmente, en el grupo de trabajo no había sido posible construir mutantes por interrupción en ambos genes esenciales RHE\_00001, y *rdsA*. Sorprendentemente, Araceli Dávalos logró obtener mutantes por interrupción en ambos genes, pero a una frecuencia extremadamente baja, estimada en  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ . Debido a su baja frecuencia, proponemos que estas mutantes portan además mutaciones supresoras. Las mutantes supresoras se originan debido a que una pequeña parte de la población bacteriana contiene una segunda mutación (o más) en su genoma, la cual permite la interrupción del gen, sin generar un fenotipo. Este fenómeno enmascara el efecto de la mutación por interrupción, y no genera un fenotipo claro de la función del gen interrumpido. Sin embargo, la secuenciación de mutantes supresoras puede generar información interesante que nos permita entender la función de estos genes.

Se obtuvieron un total de 4 mutantes supresivas para el gen RHE\_PE00001 y 2 para *rdsA*. Las mutantes supresivas en los genes RHE\_PE00001 y *rdsA* crecieron de manera similar a la cepa silvestre, y no mostraron alteraciones en su forma celular.

En colaboración con Patricia Bustos y Víctor González, se realizó la secuenciación del genoma completo de las 6 mutantes y 2 cepas más pertenecientes a la cepa silvestre CE3.

La secuenciación fue de una alta cobertura, con rangos que van de 57X a 210X. Al agrupar las 6 mutantes supresivas, se obtuvieron un total de 13 SNPs ubicados en el cromosoma y 9 que se encontraron repartidos en los plásmidos p42a, p42c y p42f. Vale la pena aclarar que ninguno de estos SNPs se presentaron en las cepas silvestres que se secuenciaron en conjunto con las mutantes supresivas.

Algo que resultó especialmente interesante de este análisis, es que dentro de los 13 SNPs cromosomales, 2 se encuentran compartidos en las mutantes supresivas del gen RHE\_PE00001 y esos mismos 2 SNPs son compartidos en conjunto con las 2 mutantes supresivas del gen *rdsA*.

El primer SNP compartido en las 6 mutantes cae dentro de la secuencia que codifica el gen RHE\_CH03804. RHE\_CH03804 es un gen que se encuentra río abajo del operón FtsEX. RHE\_CH03804 se encuentra anotada como una probable aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada. Contiene un único dominio que pertenece a la superfamilia de proteínas YdcF-like. YdcF está involucrada a la resistencia de vancomicina y podría estar involucrada en la biogénesis de pared celular (Chao et al., 2008).

Los SNPs que encontramos en RHE\_CH03804 realizaron dos tipos de cambios de codón V101F y C124Stop. Ambos cambios pueden significar una pérdida total o parcial de la actividad del gen RHE\_CH03804 en las mutantes supresivas de RHE\_PE00001 y *rdsA*.

El segundo SNP compartido por las mutantes supresivas para ambos genes, se encuentra en la región intergénica entre los genes *rne*, codificado en la cadena negativa, y *amiC*, codificado en la cadena positiva. Rne es una ribonucleasa E con actividad de degradación de mRNA y sRNA de manera dependiente. Por otro lado, AmiC es una amidasa que participa en la síntesis de PG. El cambio en la zona intergénica es A-C. Este cambio se presentó en las todas las mutantes supresivas para ambos genes. Al ser un cambio en una región intergénica podría significar un cambio la expresión de *rne* o *amiC*.

Para clarificar si RHE\_CH03804 puede ser un gen relacionado en las vías de regulación de *rdsA* y/o de RHE\_PE00001, realizamos mutaciones por interrupción en RHE\_CH03804.

Las mutantes por interrupción en RHE\_CH03804 se obtuvieron a una baja frecuencia en un rango que va de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ . Esto sugiere que RHE\_CH03804 podría ser un gen esencial en *R. etli* CE3. Debido a esto, se construyó una mutante condicional para el gen RHE\_CH03804 bajo el sistema de cumato. La mutante condicional en RHE\_CH03804, en ausencia de cumato, presentó crecimiento similar a la cepa silvestre CE3. No obstante, la sobreexpresión en RHE\_CH03804 presentó problemas de crecimiento, y un cambio en su forma celular. La mayoría de las células que mantienen sobreexpresión en RHE\_CH03804 presentaron células bacilares con un claro engrosamiento en la parte media, este tipo de forma fue nombrada como pseudo-redonda. La sobreexpresión de RHE\_CH03804 generaron células pseudoredondas en un 54%. Además, también fue posible observar células con una clara forma redonda en un 22.4%. Con esto podemos proponer que RHE\_CH03804 es un gen esencial que podría participar en la biogénesis de pared celular.

RdsA y RHE\_P00001 son genes conservados en Rhizobiales. Ambos, están conservados en *R. etli* y especies cercanas, como *Rhizobium leguminosarum*. RdsA contiene un posible homólogo en *A. tumefaciens* con la HK-híbrida Atu5509, con un porcentaje de identidad de 48%. Mientras que, en *S. meliloti*, RdsA no parece tener homólogos claros. Por otro lado, RHE\_PE00001 presentó posibles homólogos en *A. tumefaciens* (Atu6047 con una identidad del 48%) y en *S. meliloti* (SM\_b20042 con una identidad del 59%). Araceli Davalos revisó la

posible esencialidad de Atu5509. Para lo cual, realizó mutantes por interrupción de secuencia. El gen Atu5509 pudo ser interrumpido a frecuencias altas, mayores de  $10^{-6}$ . Sin embargo, fue posible observar que Atu5509 parece tener una copia en el genoma de *A. tumefaciens*. Esto se atribuye debido a que las cepas mutantes en Atu5509, mostraron amplificación por PCR del mismo producto Atu5509. En todos estos casos la inserción del plásmido que interrumpió la secuencia de una de las copias de Atu5509 fue debidamente corroborada por PCR.

Además, para revisar la posible esencialidad de los homólogos de RHE\_PE00001 en *A. tumefaciens* y en *S. meliloti*, (Atu6047 y SM\_b20042 respectivamente) Araceli Davalos realizó mutantes por inserción en ambos genes y obtuvo mutantes con frecuencias altas (mayores a  $10^{-6}$ ).

De esta manera, podemos sugerir que RdsA y RHE\_PE00001 son genes esenciales para un taxón determinado (*R. etli* y especies cercanas). Existen varios genes que son esenciales únicamente para un taxón en específico. Un ejemplo claro, es el factor de terminación de traducción RF1 (*prfA*), el cual es esencial solo en *E. coli* K12. El resto de las cepas de esta especie pueden prescindir de RF1. *E. coli* K12 contiene una mutación en RF2, que ocasiona una actividad ineficiente en RF2, por lo que RF1 resulta esencial como factor de terminación de traducción en *E. coli* K12 (Johnson et al., 2012). En una circunstancia similar, la inactivación de *rluD* (que codifica para una pseudouridina sintasa) en *E. coli* K12 provoca un crecimiento extremadamente lento, un mal reconocimiento en codones de término y defectos en el ensamble de la subunidad 50S del ribosoma, así como en la asociación de las subunidades 50S y 30S en el ribosoma. En contraste, la inactivación de *rluD* en *E. coli* B ó en *Salmonella enterica* tuvo efectos prácticamente indetectables en crecimiento, reconocimiento de codones de término ó ensamble de subunidades ribosomales. Estas diferencias entre cepas y especies se deben a cambios específicos en el gene para RF2 en *E. coli* K12 (O'Connor y Gregory, 2011).

Un ejemplo particularmente interesante es el del complejo elongasoma, que es esencial y se conserva ampliamente en Bacterias con forma bacilar, tanto en Gram positivas como en Gram negativas. Sin embargo, existen algunos taxones con forma bacilar, que presentan ausencia de gran parte de las proteínas que conforman el elongasoma. Como es el caso concreto de Rhizobiales, y algunas Actinobacterias (*Streptomyces* y *Mycobacteria*) (Yulo y Hendrickson, 2019; Daniel y Errington, 2003). Claramente, en estos grupos se han desarrollado formas alternativas capaces de participar en este proceso.

La readaptación de genes regulatorios puede generar también esencialidad específica para un taxón determinado. El sistema de dos componentes PhoP-PhoQ es no esencial en prácticamente todas las bacterias analizadas, Este sistema se activa en respuesta a modificaciones en la concentración de magnesio, calcio ó presencia de péptidos catiónicos antimicrobianos, activando la expresión de una serie de genes que permiten adaptación a su nicho, incluyendo el control de algunos genes relevantes para virulencia. El sistema PhoP-PhoQ resultó ser esencial en la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. En esta bacteria, la reducción en la expresión de *phoP* ó *phoQ* provocó la detención en crecimiento, así como problemas en división celular. Estos efectos se deben a que ahora varios genes esenciales para crecimiento y división celular, incluyendo *ftsA*, están en *X. campestris* pv *campestris* bajo el control de sistema PhoP-PhoQ (Peng et al., 2017). Este es un ejemplo

particularmente interesante, donde la recomposición de una red regulatoria origina una esencialidad específica para un taxón.

Estos ejemplos nos permiten comprender que las bacterias generan mecanismos alternativos para contrarrestar la pérdida de uno o varios genes esenciales. Esto tiene como resultado, la generación de vías y mecanismos alternativos, que pueden resarcir la pérdida de alguna función esencial. Por tanto, existen multiplicidad de genes que son esenciales solo en un taxón determinado. Alternativamente, es posible que el gen esencial específico, sea resultado de mutaciones adquiridas, en el gen, lo que permitiría suplantar la esencialidad de otros genes.

Un aspecto interesante a desarrollar a futuro, es poder comprender cuáles son los mecanismos evolutivos y adaptativos que dieron paso a la esencialidad específica de RdsA y RHE\_PE00001.

## Conclusiones

RdsA y RHE\_PE00001 son genes que se encuentran codificados dentro del cromosoma secundario p42e de *R. etli*. *rdsA* y RHE\_PE00001 son genes esenciales que le confieren alta estabilidad al cromosoma secundario p42e.

RdsA es un regulador global que está involucrado en la determinación de forma celular, y división celular en *R. etli*.

RHE\_PE00001 es un posible regulador esencial de *R. etli*, que también afecta forma y división celular.

## Perspectivas

Para adquirir mayor información sobre la actividad del gen RHE\_PE00001 se propone realizar un análisis de RNAseq, en la cepa mutante cKD01, en condición de depleción (ausencia de inducción) en comparación con la cepa silvestre CE3. Dicho análisis podría generar información inicial sobre una vía o función en la que el gen RHE\_PE00001 pueda estar involucrado. Adicionalmente, podría brindar información sobre posibles genes que interactúen con RHE\_PE00001.

Localización por microscopía de fluorescencia de RdsA, a través de la fusión con una proteína fluorescente. Localizar RdsA a lo largo del ciclo celular de *R. etli*, nos permitirá establecer su participación en la polarización de *R. etli*.

## Localización de posibles RR de RdsA

Con la finalidad de encontrar proteínas que interaccionen directamente con RdsA. Se propone realizar ensayos tipo pull-down con la proteína purificada RdsA, y anticuerpos específicos para RdsA. Este análisis puede brindar información sobre cuáles son las proteínas con las que RdsA interacciona directamente y así poder localizar posibles elementos del sistema de dos componentes de RdsA como su RR o Hpt.

Ensayos de Fosforelevo entre posibles RR interactuando con RdsA y de posibles elementos HPT.

No obstante, para facilitar esta oportunidad se propone:

Análisis bioinformático que nos permita localizar posibles RR de RdsA.

Los RR candidatos deberán cumplir con bajas frecuencias de conjugación al realizar mutantes por inserción. Esto nos permitirá identificar posibles RR esenciales.

Construir mutantes condicionales en estos posibles RR esenciales. Analizar si mutantes condicionales en RR muestran fenotipos similares a la mutante cKD24.

Complementación de la mutante cKD24 con el o los posibles blancos de RdsA. La complementación también podría buscarse con posibles genes blancos de la vía de regulación de RdsA.

Realizar análisis *in vitro* de fosforelevo, con posibles elementos que puedan formar parte del sistema de dos componentes de RdsA. Ya sean, elementos HPT y/o posibles RR esenciales.

## Efecto de la mutante cKD24 en la fisiología de *R. etli*.

Analizar la composición de pared celular en cKD24 en comparación a la cepa silvestre CE3. Para lo cual se propone marcar D-aminoácidos, ya sea con un marcaje fluorescente o radiactivo. Lo que nos permitirá medir la cantidad y el tipo de D-aminoácidos que son incorporados por las diferentes cepas. Adicionalmente, es posible obtener el tipo y cantidad de D-aminoácidos por medio de un análisis por cromatografía líquida por HPLC.

Analizar la capacidad de Respiración en la cepa cKD24 en comparación la cepa silvestre CE3. Por medio de la comparación de la capacidad de crecimiento de las cepas en condiciones anoxigénicas ó microoxigénicas.

Analizar la capacidad de motilidad en la cepa cKD24 en comparación a la cepa silvestre CE3.

Localización de proteínas esenciales para división celular y de biogénesis de pared celular, en las diferentes mutantes condicionales de los genes esenciales, por medio de proteínas fluorescentes

Analizar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno en la cepa cKD24 en comparación a la cepa silvestre CE3.

## **Materiales y Métodos**

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en los resultados adicionales, se encuentran en listados en la tabla 1 y los oligos utilizados para su construcción en la tabla 2. Los oligos utilizados para el análisis de RT-qPCR en tabla 3.

### **Construcción de cepas**

#### **Construcción de cepas de expresión condicional con genes reporteros**

Con la finalidad de evaluar la capacidad de depleción y sobreexpresión de sistemas de expresión condicional en *R. etli*. Se generaron plásmidos replicativos de expresión condicional, utilizando sistemas de regulación positiva. Para rastrear adecuadamente la actividad de cada sistema se utilizaron los genes reporteros mCherry y *uidA*. Debido a que no existen sistemas de inducción previamente probados en *R. etli*, se seleccionaron cuatro sistemas de inducción exitosos en especies cercanas a *R. etli* (Tabla 1; Chubiz et al., 2013; Khan et al., 2008; Mostafavi et al., 2014).

#### **Sistema replicativo inducible por *lac***

Se colocó el gen reportero *uidA* bajo el control del sistema de inducción *lac*. Para ello, se construyó el plásmido replicativo pSRKKmgus. El gen *uidA* se amplificó utilizando como templado el plásmido pWM5 (Metcalf y Wanner 1993) y se clonó en el plásmido replicativo pSRKKm (Khan et al., 2008) con las enzimas NdeI y NheI.

#### **Sistemas replicativos inducibles por de Q y Ant**

Se utilizaron las construcciones pJP18T y pJP22T realizados por Chubiz et al. (2013). Ambos plásmidos son replicativos en Rhizobiales. Contienen el gen reportero mCherry bajo el control de los sistemas inducibles por Q y Ant respectivamente.

#### **Sistema replicativo inducible por tau**

El plásmido pBBMCS53 se generó como herramienta para rastrear la actividad de promotores (Girard et al., 2000). Es por ello que contiene el gen *uidA* como gen reportero en ausencia de promotor. Por lo que, utilizamos el plásmido pBBMCS53 para medir la actividad del sistema de inducción por tau. Para lo cual se amplificó el promotor P<sub>tauA</sub> y el represor. TauR usando como templado el genoma de *Sinorhizobium fredii* GR64. El producto de PCR se clonó en el plásmido pBBMCS53 con las enzimas EcoRI-KpnI.

#### **Construcción de sistemas de expresión condicional integrativos en Rhizobiales**

Con el objetivo de tener una herramienta que posiblemente nos permita controlar la expresión de un gen específico, se generaron plásmidos de expresión condicional integrativos, El objetivo de los plásmidos, es colocar la expresión del gen deseado, bajo el control de un promotor inducible, donde la capacidad del promotor, depende de la concentración del inductor. Esto se logra mediante un evento de recombinación homóloga, que logre desplazar el promotor nativo del gen a controlar. Esto genera como resultado la incorporación del promotor inducible río arriba del gen completo (Fig. 6). Para ello, se clonaron las regiones reguladoras (promotor-operador-represor) del sistema de expresión condicional Q en el plásmido integrativo pK18mob (Schäfer et al., 1994). pK18mob carece de un sistema de replicación en células Rhizobiales, por lo tanto, para que se lleve a cabo la

replicación del plásmido, es necesario su integración al genoma por medio de un evento de recombinación homóloga (Schäfer et al., 1994).

**Tabla 1. Cepas y plásmidos.**

Plásmido o Cepa	Descripción o genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169 $\phi$ 804lacZ $\Delta$ M15 hsdR171 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan 1983
S17-1	E. coli 294: [RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)] thi pro hsdR hsdM $\Delta$ recA, S $\phi$	Simon 1983
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
GR64	Cepa silvestre. Con el sistema nativo inducible por tau, Naf	Herrera-Cervera et al 1999
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	Derivada de la cepa silvestre CFN42, S $\phi$ r	Noel et al 1984
CE3lac	CE3 pSRKKm::uidA-Km $r$	Este trabajo
CE3Q	CE3 pJP18T-Km $r$	Este trabajo
CE3Ant	CE3 pJP22T-Km $r$	Este trabajo
CE3tau	CE3 pBBTau-Gm $r$	Este trabajo
cKDlac-nadABC	CE3-pMasLac::nadA-Km $r$ -P $_{lac}$ ::nadABC	Este trabajo
cKDlac01	CE3-pMasLac::01-Km $r$ -P $_{lac}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
cKD01	CE3-pMasQ::01-Km $r$ -P $_{R}$ / $_{cmO}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
cKDAnt01	CE3-pMasAnt::01-Km $r$ -P $_{R}$ / $_{tetO}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
cKDtau01	CE3-pMasTau::01-Km $r$ -P $_{tauA}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
cKDlac24	CE3-pMasLac::01-Km $r$ -P $_{lac}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
cKD24	CE3-pMasQ::01-Km $r$ -P $_{R}$ / $_{cmO}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
cKDAnt24	CE3-pMasAnt::01-Km $r$ -P $_{R}$ / $_{tetO}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
cKDtau24	CE3-pMasTau::24-Km $r$ -P $_{tauA}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
Plásmidos		
pBBR1MCS-5	Vector de clonación Gm $r$	Kovach et al. 1995
pWM5	Plásmido con el gen uidA	Metcalf et al 1993
pK18mob	Vector de mutagenesis por inserción Km $r$	Pridmore et al 1987
pSRKKm	Vector de expresión con el sistema de inducción lac, de amplio rango de hospedero Km $r$	Khan et al 2008
pBBMCS53	Derivado de pBBR1MCS-5 sin promotor. Con el gen uidA de pWM5 sin promotor	Girard et al 2000
pLC290	Vector de expresión con el sistema de inducción por Q, de amplio rango de hospedero	Chubiz et al 2013
pLC291	Vector de expresión con el sistema de inducción por Ant, de amplio rango de hospedero	Chubiz et al 2013
pSRKKmgus	pSRKKm::uidA	Este trabajo
pJP18T	pLC290::mCherry	Chubiz et al 2013
pJP22T	pLC291::mCherry	Chubiz et al 2013
pBBTau	pBBR1MCS-5::TauR-P $_{tauA}$	Este trabajo
pMASLac	pK18mob::LacI-P $_{lac}$	Este trabajo
pMasQ	pK18mob::CymR-P $_{R}$ / $_{cmO}$	Este trabajo
pMasAnt	pK18mob::TetR-P $_{R}$ / $_{tetO}$	Este trabajo
pMasTau	pK18mob::TauR-P $_{tauA}$	Este trabajo
pMasLac::Nad	pK18mob::LacI-P $_{lac}$ ::NadA	Este trabajo
pMasLac::01	pK18mob::LacI-P $_{lac}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
pMasLac::24	pK18mob::LacI-P $_{lac}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
pMasQ::01	pK18mob::CymR-P $_{R}$ / $_{cmO}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
pMasQ::24	pK18mob::CymR-P $_{R}$ / $_{cmO}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
pMasAnt::01	pK18mob::TetR-P $_{R}$ / $_{tetO}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
pMasAnt::24	pK18mob::TetR-P $_{R}$ / $_{tetO}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo
pMasTau::01	pK18mob::TauR-P $_{tauA}$ ::RHE_PE00001	Este trabajo
pMasTau::24	pK18mob::TauR-P $_{tauA}$ ::RHE_PE00024	Este trabajo

**Tabla 2. Oligos usados para la construcción de cepas.**

Oligos utilizados para la construcción de cepas							
Gene o region amplificada	Primer	Secuencia	Sitio de restricción incorporado	Templado	Posición de inicio	Referencia	Tamaño de amplicon (bp)
uidA	uidA F	CCGCATATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA	NdeI	pWM5	1000		1854
	uidA R	AGGCTGGCTAGCCGACGATGGTGCG	NheI		2854		
TauR - P <sub>TauA</sub>	TuaR-P <sub>TauA</sub> F	CGAACGAATTCGCAAGGCTCATCTAACCC	EcoRI	Sinorizobium meliloti 1021	1049309	AL591985.1	1643
	TuaR-P <sub>TauA</sub> R	GAGGTACCCGT TACCCTCTTTGGTTATGTC	KpnI		1050951		
CmyR/TetR - P <sub>R/cmtO</sub> /P <sub>R/TetO</sub>	Q/Ant F	GCTGAATTCCTACTATTAGGCACCCAGG	EcoRI	pLC290/pLC291	1996	KC296704.1/ KC296705.1	1456
	Q/Ant R	ACCGTCGACGGTGAGCTCGCATGCTACTA	Sall		3415		
RHE_PE00024	24-Q/Ant F	AGGGTAC CAGATGGAAGTCTGGATCGAC	KpnI	CE3 (p42e)	31785	NC_007765.1	343
	24-Q/Ant R	ATCGTCGACATGACGACATGCGCCCAA	Sall		32091		
RHE_PE00001	01 Q/Ant F	AAGGTAC CAGCTTAACAATGCGCTACGA	KpnI	CE3 (p42e)	167	NC_007765.3	305
	01 Q/Ant R	GCCGTCGACGGTTCGCCGGTCCAGATG	Sall		471		

**Tabla 3. Oligos usados para el análisis por RT-qPCR.**

Oligos utilizados para el análisis por RT-qPCR						
Nombre del gen	Oligo	Secuencia	Templado	Referencia	Posición de inicio	Tamaño de amplicon (bp)
rpoA RHE_CH01699	rpoA-F	CCGATCGGCCTTATCCC	CE3-Chr	NC_007761.1	1781850	312
	rpoA-R	GTTTGCCGAACGGACCGACAG			1782141	
rdsA RHE_PE00024	orf24-F	GCAGGATCTCTCGCTGACAT	CE3-p42e	NC_007765.1	32722	198
	orf24-R	GAGGTTTCGATCGTGGTGAG			32900	
ofr01 RHE_PE00001	01F	ACGAGGAATGGGATGAGGAG	CE3-p42e	NC_007765.1	756	200
	01R	GAGATGCGAAGCGACCTTAC			936	

### Sistemas integrativo indubles por Q

La construcción de los sistemas integrativos inducibles por Q (pMASQ) se realizó por medio de la amplificación del fragmento represor-promotor-operador de los plásmidos pLC290 (Chubiz et al., 2013). El fragmento se clonó en pK18mob con las enzimas EcoRI-Sall.

**Tabla 4. Sistemas inducibles de expresión diseñados para Alfabroteobacterias. Cada sistema genera fenotipos consecuentes a la depleción en la expresión del gen.**

Sistema de Inducción	Promotor	Represor	Especie	Gene	Fenotipo	Referencia
IPTG	lac	LacI	<i>A. tumefaciens</i>	TraR	Transferencia del plásmido Ti	Khan et al. (2008)
Cumato	Pr 16-3	CymR	<i>M. extorquens</i>	FtfL	Crecimiento en metanol	Chubiz et al. (2013)
Anhidrotriaciclina	Pr 16-3	TetR	<i>M. extorquens</i>	FtfL	Crecimiento en metanol	Chubiz et al. (2013)
Taurina	PtauA	TauR	<i>S. meliloti</i>	PleC	Viabilidad celular	Mostafavi et al. (2014)

### Construcción de mutantes condicionales (cKD) en los genes RHE\_PE00001, RHE\_PE00024.

Los plásmidos integrativos inducibles por Q pueden ser una herramienta para regular la expresión de un gen deseado. Para ello es necesario clonar un fragmento del gen que se desea regular, en el plásmido integrativo inducible. Dicho fragmento corresponde al inicio de traducción más aproximadamente 300 bp río abajo. De esta manera se permitirá un evento de recombinación homóloga, que tendrá como resultado la integración del sistema inducible

río arriba del gen completo. Por lo tanto, se genera el desplazamiento del promotor nativo (Fig. 6).

Para la construcción de mutantes condicionales (cKD) en los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024, se realizaron con la amplificación de los fragmentos de cada gen correspondientes al inicio de traducción y aproximadamente 300 pb más, río abajo, utilizando como templado la cepa *R. etli* CE3. Los productos se clonaron individualmente en el sistema integrativo de expresión condicional por Q (pMASQ). Los fragmentos de los genes fueron ligados río abajo del promotor inducible del sistema inducible con los sitios previamente restringidos por las enzimas KpnI-Sall.

Cada plásmido construido se transformó en *E. coli* DH5 (Tabla 2). Los plásmidos purificados de dichas transformantes, se verificaron a través de PCR, empleando los mismos oligos que se usaron para su construcción (Tabla 3), y mediante digestión con las enzimas de restricción adecuadas.

Los plásmidos verificados fueron introducidos en *R. etli* CE3 por conjugación utilizando la cepa *E. coli* S17 (Tabla cepas), previamente transformada de manera individual con cada uno de plásmidos.

Las transconjugantes fueron seleccionadas por su resistencia a los antibióticos Nal-Kan o Nal-Gm de acuerdo a los requerimientos de cada construcción. Las transconjugantes fueron corroboradas a través de su perfil de los plásmidos. Adicionalmente, en el caso de las transconjugantes en las cepas cKD, se verificó la correcta integración de los genes RHE\_PE00001 y RHE\_PE00024 junto con los sistemas de inducción, por PCR mediante la combinación de los oligos universales M13 (Invitrogene) y los propios utilizados para cada construcción integrativa.

### **Ensayos de actividad de los sistemas inducibles de Q y Ant utilizando como gen reportero mCherry**

La actividad de los sistemas inducibles Q y Ant en *R. etli* CE3 fue rastreada a través del gen reportero mCherry. A partir de los overnights de la cepa CE3 silvestre, CE3Q y CE3A, fueron colocados en placas de ELISA con cultivos iniciales a  $A_{620}$  de 0.05, en 150  $\mu$ l de medio PY líquido. La capacidad de los promotores inducibles por Q y Ant se midió colocando concentraciones de inducción crecientes desde 0 a 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de Q y de 0 a 25 ng ml<sup>-1</sup> de Ant, respectivamente. Los niveles de actividad de mCherry se midieron a una longitud de onda de emisión de  $645 \pm 40$  nm, y los niveles de crecimiento por  $A_{620}$ , utilizando Bio-Tek Synergy HT, un detector que permite leer fluorescencia y absorbancia, y controlar la temperatura y agitación para permitir crecimiento. La actividad de mCherry se midió a lo largo del crecimiento de las cepas por 18 h realizando lecturas de crecimiento y fluorescencia cada 3 h.

### **Ensayos de actividad de los sistemas inducibles tau y lac utilizando como gen reportero uidA**

Cultivos iniciales de 0.05  $A_{620}$ , en 5 ml de medio líquido PY de las cepas CE3 silvestre, CE3lac y CE3tau, con concentraciones crecientes de los inductores IPTG (0-750  $\mu$ M) y tau (0-5mM) respectivamente, crecidos durante 18 h fueron utilizados para medir el nivel de expresión del gen *uidA* utilizando p-nitrofenil glucurónido como sustrato (Corvera et al., 1999). La reacción colorimétrica de cada muestra, se dispensó en 200  $\mu$ l en placas de Elisa, se registró el cambio de coloración cada 2 min por 90 min empleando Bio-Tek Synergy HT. Los datos se normalizaron de acuerdo con la concentración de proteína celular total,

utilizando el método de Lowry (Ausubel et al., 1996) en un segundo conjunto de muestras de 1 ml.

### **Ensayos de microscopía**

Los ensayos de microscopía y time-lapse en la cepa cKD01 se realizaron siguiendo la metodología expuesta en los resultados publicados en Martínez-Absalón et al., 2022

## Referencias

- Addinall, S. G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in fts mutants. *J. Bacteriol.* 178:3877–3884. doi: 10.1128/jb.178.13.3877-3884.1996.
- Anderson-Furgeson, J. C., Zupan, J. R., Grangeon, R., and Zambryski, P. C. (2016). Loss of PodJ in *Agrobacterium tumefaciens* leads to ectopic polar growth, branching, and reduced cell division. *J. Bacteriol.* 198, 1883–1891. doi: 10.1128/JB.00198-16
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., et al. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174, 5183–5189. doi: 10.1128/jb.174.16.5183-5189.1992
- Brom, S., García de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid.* 44, 34–43. doi: 10.1006/plas.2000.1469
- Brown, P. J. B., de Pedro, M. A., Kysela, D. T., Van der Henst, C., Kim, J., De Bolle, X., et al. (2012). Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1697–1701. doi: 10.1073/pnas.1114476109
- Brown, P. J. B., Kysela, D. T., and Brun, Y. V. (2011). Polarity and the diversity of growth mechanisms in bacteria. *Semin. Cell. Develop. Biol.* 22, 790–798. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.06.006
- Bloodworth, R. A. M., Zlitni, S., Brown, E. D., and Cardona, S. T. (2015) An electron transfer flavoprotein is essential for viability and its depletion causes a rod-to-sphere change in *Burkholderia cenocepacia*. *Microbiology* (2015), 161, 1909–1920. doi: 10.1099/mic.0.000156
- Cameron, T. A., Anderson-Furgeson, J., Zupan, J. R., Zik, J. J., and Zambryski, P. C. (2014). Peptidoglycan synthesis machinery in *Agrobacterium tumefaciens* during unipolar growth and cell division. *mBio.* 5:e01219-14. doi: 10.1128/mBio.01219-14
- Cameron, T. A., Zupan, J. R., and Zambryski, P. C. (2015). The essential features and modes of bacterial polar growth. *Trends Microbiol.* 23, 347–353. doi: 10.1016/j.tim.2015.01.003
- Chao, K. L., Lim, K., Lehmann, C., Doseeva, V., Howard, A. J., Schwarz, F. P., et al. (2008). The *Escherichia coli* YdcF binds S-adenosyl-L-methionine and adopts an alpha/beta-fold characteristic of nucleotide-utilizing enzymes. *Proteins.* 72, 506–509. doi: 10.1002/prot.22046
- Cheng, J., Sibley, C. D., Zaheer, R., and Finan, T. M. (2007). A *Sinorhizobium meliloti* minE mutant has an altered morphology and exhibits defects in legume symbiosis. *Microbiol. Read Engl.* 153, 375–387. doi: 10.1099/mic.0.2006/001362-0
- Chubiz, L. M., Purswani, J., Carroll, S. M., and Marx, C. J. (2013). A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens*. *BMC Res. Notes.* 6:183. doi: 10.1186/1756-0500-6-183

- Corvera, A., Promé, D., Promé, J. C., Martínez-Romero E., and Romero, D. (1999). The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant. Microbe.* 12, 236–246 doi: 10.1094/MPMI.1999.12.3.236
- Curtis, P. D., and Brun, Y. V. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 13–41. doi:10.1128/mmmbr.00040-09
- Daniel, R. A., and Errington, J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell.* 113, 767–776. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00421-5
- De Nisco, N. J., Abo, R. P., Wu, C. M., Penterman, J., and Walker, G. C. (2014). Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 3217–3224. doi.org/10.1073/pnas.1400421111
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., and Granger-Schnarr, M. (1998). A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257, 205–212. doi: 10.1007/s004380050640.
- Du, S., Henke, W., Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2019) How FtsEX localizes to the Z ring and interacts with FtsA to regulate cell division. *Mol. Microbiol.* 112, 881–895. doi: 10.1111/mmi.14324.
- Egan, A. J. F., Errington, J., and Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 446–460. doi: 10.1038/s41579-020-0366-3
- Ehrle, H. M., Guidry, J. T., Iacovetto, R., Salisbury, A. K., Sandidge, D. J., and Bowman, G. R. (2017). Polar Organizing Protein PopZ Is Required for Chromosome Segregation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 199:e00111-17. doi: 10.1128/JB.00111-17
- Errington, J., and Wu, L. J. (2017). Cell Cycle Machinery in *Bacillus subtilis*. *Subcell. Biochem.* 84, 67–101. doi: 10.1007/978-3-319-53047-5\_3
- Fields, A. T., Navarrete, C. S., Zare, A. Z., Huang, Z., Mostafavi, M., Lewis, J. C., et al. (2012). The conserved polarity factor podJ1 impacts multiple cell envelope-associated functions in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 84, 892–920. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08064.x
- Flores, S. A., Howell, M., Daniel, J. J., Piccolo, R., and Brown, P. J. B. (2018). Absence of the Min System Does Not Cause Major Cell Division Defects in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Microbiol.* 9;9:681. doi: 10.3389/fmicb.2018.00681
- Gao, R., and Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 133–154. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214

- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. (2000) Differential regulation of fixN-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel fixL-fixK cascade. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 1283–92. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1283
- Gonzalez, D., Kozdon, J. B., McAdams, H. H., Shapiro, L., and Collier, J. (2014). The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach. *Nucleic acids research*, 42, 3720–3735. doi: 10.1093/nar/gkt1352
- Grangeon, R., Zupan, J. R., Anderson-Furgeson, J., and Zambryski, P. C. (2015). PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11666–11671. doi: 10.1073/pnas.1515544112
- Hinz, A. J., Larson, D. E., Smith, C. S., and Brun, Y. V. (2003). The *Caulobacter crescentus* polar organelle development protein PodJ is differentially localized and is required for polar targeting of the PleC development regulator. *Mol. Microbiol.* 47, 929–941. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03349.x
- Howell, M., Aliashkevich, A., Sundararajan, K., Daniel, J. J., Lariviere, P. J., Goley, E. D., et al. (2019). *Agrobacterium tumefaciens* divisome proteins regulate the transition from polar growth to cell division. *Molec Microbiol.* 111, 1074–1092
- Iniesta, A. A., McGrath, P. T., Reisenauer, A., McAdams, H. H., and Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 10935–10940. doi: 10.1073/pnas.0604554103
- Ji, Q., Chen, P., Qin, G., Deng, X., Hao, Z., Wawrzak, Z., et al. (2016). Structure and mechanism of the essential two-component signal-transduction system WalkR in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun.* 7: 11000. doi: 10.1038/ncomms11000
- Johnson, D. B., Wang, C., Xu, J., Schultz, M. D., Schmitz, R. J., Ecker, J. R., and Wang, L. (2012) Release factor one is nonessential in *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol.* 7, 1337–44. doi: 10.1021/cb300229q
- Kahng, L. S., and Shapiro, L. (2001)- The CcrM DNA methyltransferase of *Agrobacterium tumefaciens* is essential, and its activity is cell cycle regulated. *J. Bacteriol.* 183, 3065–75. doi: 10.1128/JB.183.10.3065-3075.2001
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop II, R. M., and Farrand, S. K. (2008). Broad-Host-Range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5053–5062. doi: 10.1128/AEM.01098-08
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M. 2nd, Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques.* 16, 800–802

- Krol, E., Yau, H. C. L., Lechner, M., Schäper, S., Bange, G., Vollmer, W., et al. (2020). Tol-Pal system and Rgs proteins interact to promote unipolar growth and cell division in *Sinorhizobium meliloti*. *mBio*. 11:e00306-20. doi: 10.1128/mBio.00306-20
- Kysela, D. T., Randich, A. M., Caccamo, P. D., and Brun, Y. V. (2016). Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology. *PLoS biology*. 14:e1002565. doi: 10.1371/journal.pbio.1002565
- Landeta, C., Dávalos, A., Cevallos, M. Á., Geiger, O., Brom, S., and Romero, D. (2011). Plasmids with a Chromosome-Like Role in Rhizobia. *J. Bacteriol.* 193, 1317–1326. doi: 10.1128/JB.01184-10
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L., and McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4632–4637. doi: 10.1073/pnas.062065699
- Magnet, S., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M., and Gutmann, L. (2008) Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 4782–4785. doi: 10.1128/JB.00084-07
- Mann, T. H., Seth Childers, W., Blair, J. A., Eckart, M. R., and Shapiro, L. (2016). A cell cycle kinase with tandem sensory PAS domains integrates cell fate cues. *Nat. Commun.* 7:11454. doi: 10.1038/ncomms11454
- Metcalf, W. W., and Wanner, B. L. (1993). Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene*. 129, 17–25. doi: 10.1016/0378-1119(93)90691-u
- Mostafavi, M., Lewis, J. C., Saini, T., Bustamante, J. A., Gao, I. T., Tran, T. T., et al. (2014). Analysis of a taurine-dependent promoter in *Sinorhizobium meliloti* that offers tight modulation of gene expression. *BMC Microbiol.* 14:295. doi: 10.1186/s12866-014-0295-2
- Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155. doi: 10.1128/jb.158.1.148-155.1984
- O'Connor, M., and Gregory, S. T. (2010). Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 193, 154–62. doi:10.1128/jb.00970-10.
- Peng, B.-Y., Pan, Y., Li, R.-J., Wei, J.-W., Liang, F., Wang, L., et al. (2017). An Essential Regulatory System Originating from Polygenic Transcriptional Rewiring of PhoP-PhoQ of *Xanthomonas campestris*. *Genetics* 206, 2207–2223. doi:10.1534/genetics.117.200204.

- Pini, F., De Nisco, N. J., Ferri, L., Penterman, J., Fioravanti, A., Brilli, M., Mengoni, A., et al. (2015). Cell cycle control by the master regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet.* 11: e1005232. doi: 10.1371/journal.pgen.1005232
- Poncin, K., Gillet, S., and De Bolle, X. (2018). Learning from the master: targets and functions of the CtrA response regulator in *Brucella abortus* and other alpha-proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 500–513. doi: 10.1093/femsre/fuy019
- Ptacin, J. L., Gahlmann, A., Bowman, G. R., Perez, A. M., von Diezmann, A. R., Eckart M. R., et al. (2014). Bacterial scaffold directs pole-specific centromere segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2046–E2055. doi: 10.1073/pnas.1405188111
- Radhakrishnan, S. K., Thanbichler, M., and Viollier, P. H. (2008) The dynamic interplay between a cell fate determinant and a lysozyme homolog drives the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. *Genes.* 22, 212–225.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y. L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 959–968. doi: 10.1038/nrmicro1290
- Ruiz, N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *roc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15553-15557. doi: 10.1073/pnas.0808352105
- Ryan, K. R., Judd, E. M., and Shapiro, L. (2002). The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J. Mol. Biol.* 324, 443–55. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01042-2
- Sadowski, C., Wilson, D., Schallies, K., Walker, G., and Gibson, K. E. (2013). The *Sinorhizobium meliloti* sensor histidine kinase CbrA contributes to free-living cell cycle regulation. *Microbiol.* 159, 1552-1563. doi: 10.1099/mic.0.067504-0
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145, 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schofield, W. B., Lim, H. C., and Jacobs-Wagner, C. (2010). Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J.* 29, 3068–3081. doi: 10.1038/emboj.2010.207.
- Viollier, P. H., Sternheim, N., and Shapiro, L. (2002). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13831–13836. doi: 10.1073/pnas.182411999
- Vollmer, W., and Höltje, J. V. (2001). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* 4, 625–633. doi: 10.1016/s1369-5274(01)00261-2

Wortinger, M., Sackett, M. J., Brun, Y. V. (2000). CtrA mediates a DNA replication checkpoint that prevents cell division in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* 19, 4503–4512. doi: 10.1093/emboj/19.17.4503

Yulo, P., and Hendrickson, H. L. (2019). The evolution of spherical cell shape; progress and perspective. *Biochemical Society transactions.* 47, 1621–1634. doi: 10.1042/BST20180634

Zupan, J. R., Cameron, T. A., Anderson-Furgeson, J., Zambryski, P. C. (2013). Dynamic FtsA and FtsZ localization and outer membrane alterations during polar growth and cell division in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9060–9065. doi: 10.1073/pnas.1307241110

Zupan, J. R., Grangeon, R., Robalino-Espinosa, J. S., Garnica, N. and Zambryski, P. (2019). GROWTH POLE RING protein forms a 200-nm-diameter ring structure essential for polar growth and rod shape in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 10962–10967. doi: 10.1073/pnas.1905900116