UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Importancia de la alarmona (p)ppGpp en la regulación del ciclo del poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OPTAR PARA EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS.

PRESENTA:
M. en C. CRISTIAN CAMILO ORTIZ VASCO

TUTORA:
Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. OTTO GEIGHER- Centro de Ciencias Genómicas.
Dr. EDMUNDO CALVA MERCADO- Instituto de Biotecnología.

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi pequeña familia, sin ustedes, su apoyo y cariño en la distancia nada de esto hubiera sido posible. A Haydee, gracias por alentarme a dar lo mejor y confiar siempre en mí.

“El aspecto más triste de la vida en este preciso momento es que la ciencia reúne el conocimiento más rápido de lo que la sociedad reúne la sabiduría”.

Isaac Asimov (Bioquímico, divulgador y escritor de ciencia ficción)

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis padres quienes siempre me alentaron a trabajar por mis metas, aunque ellas implicaran distanciarnos físicamente. Siempre tuvieron y tienen confianza en mí y eso me ha permitido alcanzar los objetivos de vida que me he propuesto.

A mi hermano, quien ha llevado la responsabilidad de la compañía y el apoyo a toda mi familia, se ha convertido en un soporte para todos, siendo el más chico.

A Haydee, gracias por tu amor, comprensión y apoyo. Gracias por hacerme mejor persona y enseñarme el valor de confiar en mí y en mi trabajo.

A la doctora Guadalupe Espín, quien me acepto en su grupo, apoyo mi trabajo y me brindo la oportunidad de aprender e involucrarme en el mundo científico.

A Solecito, fuiste mi primera maestra en México, y siempre agradeceré tu paciencia y tu disposición a compartir toda tu experiencia, y agradezco conocer la gran persona que eres.

Quisiera agradecer a cada persona que estuvo conmigo desde el inicio de este camino académico, pero me resultaría muy extenso. Sin embargo, quiero agradecer a cada miembro del grupo Espín/Merino pasado y presente, quienes me brindaron su conocimiento, su ayuda y su amistad. Doña Jose, Dr. Daniel, Dra. Cinthia, Pepe, Doña Mago, Leo, en fin, muchas personas con las que compartí mi tiempo y mi vida en el laboratorio y fuera de él, simplemente muchas gracias a todos y todas.

Agradecer el apoyo económico de CONAHCyT y el apoyo PAPIIT IN224223.

Soy un hijo de la Universidad Pública.

PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

"Importancia de la alarmona (p)ppGpp en la regulación del ciclo del poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*"

que presenté para obtener el grado de Doctor en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con
el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Cristian Camilo Ortiz V.

Cristian Camilo Ortiz Vasco

Cuenta UNAM 517494343

Tabla de contenido

1. RESUMEN 9
2. INTRODUCCIÓN 13
3. ANTECEDENTES 15
   3.1 SÍNTESIS DE POLI-β-HIDROXIBUTIRATO PHB 16
   3.2 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE PHB 18
   3.3 RESPUESTA ESTRICTA 21
   3.4 PROTEÍNA DksA 23
   3.5 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE (p)ppGpp 26
   3.6 PROTEÍNAS RelA Y SpoT EN ORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAs 27
   3.7 PROTEÍNAS RelA Y SpoT en *A. vinelandii* 28
4. JUSTIFICACIÓN 30
5. HIPÓTESIS 30
6. OBJETIVO GENERAL 30
   6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
   7.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS EFECTORES DE LA RESPUESTA ESTRICTA EN *A. vinelandii*. 31
   7.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ESTRICTA EN LA SÍNTESIS DE PHB. 32
   7.3 DksA REGULA LA EXPRESIÓN DE RpoS en *A. vinelandii.* 36
   7.4 DksA regula la expresión de *rpoS* a nivel transcripcional 39
   7.5 La complementación con una copia adicional de *rpoS* no restaura la síntesis de PHB en la cepa UW*dksA.* 43
   7.6 DksA es un regulador pleiotrópico en *A. vinelandii.* 46
   7.7 Modelo de regulación de la síntesis de PHB dependiente de los efectores de la respuesta estricta. 56
8. MATERIALES Y MÉTODOS 58
   8.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo 58
   8.2 Construcción de plásmidos y cepas mutantes. 63
   8.3 Transformación de células de *A. vinelandii*. 65
   8.4 Medición de actividad de β-glucoronidasa. 66
   8.5 Ensayo de Western-blot. 66
   8.6 Análisis *in silico.* 66

8.7 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real RT-qPCR. 67
8.8 Ensayo de ARN-seq. 68
8.9 Cuantificación de PHB. 69
9. CONCLUSIONES 70
10. PERSPECTIVAS 71
11. REFERENCIAS 72

Tabla de Figuras

Figura 1. Quiste de *A. vinelandii*. 16

Figura 2. Ciclo del PHB en *A. vinelandii*. 17

Figura 3. Contexto genético de los genes que codifican para el activador transcripcional PhbR y las enzimas necesarias para la síntesis de PHB. 19

Figura 4. Mecanismos de regulación de la síntesis de PHB descritos en *A. vinelandii.* 21

Figura 5. Sitios de unión de (p)ppGpp en la ARN polimerasa. 24

Figura 6. Acumulación de PHB en las cepas de *A. vinelandii* con mutaciones en los genes *relA* y *relA/spoT*. 29

Figura 7. Los genes *rpoZ* y *spoT* forman un operón y la mutación en *rpoZ* no afecta la transcripción de *spoT.* 33

Figura 8. Los efectores de la respuesta estricta regulan la síntesis de PHB. 36

Figura 9. La cantidad de proteína RpoS esta disminuida en la cepa UW*dksA*, pero no en la cepa UW*relA*. 38

Figura 10. Promotores de *rpoS* en *A. vinelandii.* 40

Figura 11. DksA afecta la transcripción y la actividad de los promotores de *rpoS.* .. 41

Figura 12. Efecto de la mutación en *dksA* sobre los promotores P2 y P3 de *rpoS.* ... 42

Figura 13. DksA regula la síntesis de PHB a través de un mecanismo adicional independiente de *rpoS.* 44

Figura 14. Expresión diferencial de genes en la cepa UW*dksA* con respecto a la cepa silvestre. 48

Figura 15. Las vías denominadas como "Metabolismo" y "Procesamiento de información genética" presentaron mayor variabilidad en la cepa UW*dksA.* 50

Figura 16. DksA regula la transcripción de genes que codifican enzimas del metabolismo central de *A. vinelandii* las cuales producen algunos de los metabolitos necesarios para la síntesis de PHB 53

Figura 17. DksA regula la expresión de las principales enzimas que producen los precursores necesarios para la síntesis de PHB. 55

Figura 18. DksA es un represor de los genes que codifican para las proteínas ribosomales. 55

Figura 19. Modelo propuesto de regulación de la síntesis de PHB por (p)ppGpp y DksA. 57

1. RESUMEN

La respuesta estricta se describió inicialmente como el mecanismo por el cual las bacterias responden a diferentes tipos de estreses nutricionales; esta respuesta depende del segundo mensajero (p)ppGpp y de la proteína DksA. Estos dos efectores alteran el perfil transcripcional de la célula por su interacción directa con la ARN polimerasa lo cual modifica su afinidad hacia promotores diferentes de sigma 70.

La importancia de estos efectores en fenotipos independientes de la respuesta a estrés ha sido estudiada recientemente en diferentes especies, demostrando que este sistema de regulación transcripcional no está únicamente relacionado con la deprivación de nutrientes como se proponía anteriormente. En este estudio decidimos analizar la importancia de los efectores (p)ppGpp y DksA sobre la síntesis del biopolímero poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii.*

Se determinó que la reducción de los niveles de (p)ppGpp reducen la síntesis de PHB. Así mismo, demostramos que la mutación en el gen *dksA* reduce aún más la síntesis de PHB y que el efecto de reducir los niveles de (p)ppGpp en esta mutante es acumulativo y abate la síntesis del polímero. Demostramos que DksA regula la expresión del factor sigma RpoS a nivel transcripcional, el cual es regulador positivo de la síntesis de PHB, sin embargo, reducir los niveles de (p)ppGpp no modifica los niveles de RpoS, por tanto, se propone la existencia de al menos un mecanismo alternativo regulado por (p)ppGpp independiente de RpoS que regula la producción de PHB en *A. vinelandii*.

La complementación de la mutante en *dksA* con una copia adicional de *rpoS* bajo un promotor independiente y constitutivo restauró los niveles de RpoS pero no así la síntesis de PHB, por lo cual se decidió evaluar el perfil transcripcional de la cepa UW*dksA* con el fin de describir rutas alternas que regulen la producción de PHB en *A. vinelandii*. Interesantemente, al igual que en otras especies, DksA actúa como un regulador pleiotrópico de la transcripción y regula aproximadamente el 17% de los genes descritos en *A. vinelandii*.

La síntesis de PHB depende de la acumulación de metabolitos que reflejan el estado metabólico de la célula y estimulan o reprimen la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis o degradación del polímero. El análisis de las rutas metabólicas de *A. vinelandii* nos permitió concluir que, DksA activa la transcripción de enzimas del metabolismo central asociadas a vías metabólicas como la glicolisis y el ciclo del piruvato, las cuales catalizan las reacciones que producen estos metabolitos, por tanto, la mutación en *dksA* disminuye la expresión de estos genes, lo cual podría constituir un mecanismo indirecto de regulación de la síntesis de PHB.

En conjunto nuestros resultados muestran la importancia de (p)ppGpp y DksA en la síntesis de PHB bajo condiciones que no favorecen la respuesta estricta, así mismo demostramos que pueden regular este proceso por vías independientes pero que existe un efecto acumulativo entre estos dos efectores. Este estudio abre la posibilidad de nuevas líneas de investigación que lleven a describir el papel de estos reguladores en la síntesis de PHB y mejore el entendimiento de este proceso metabólico en *A. vinelandii*.

ABSTRACT

The stringent response is a bacterial mechanism by which microorganisms respond to different nutritional stresses; the second messenger (p)ppGpp and DksA protein orchestrate it. Due to the direct interaction with RNA polymerase, these effectors modify the specific affinity of the polymerase and promote the expression of promoters different from sigma 70.

The relevance of these effectors in phenotypes that are not dependent on stringent response has been elucidated in some species; these represent a new transcriptional regulation level. In this study, we analyzed the relevance of (p)ppGpp and DksA on the poli-β-hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Azotobacter vinelandii.*

We described that reducing the (p)ppGpp levels decreases the PHB synthesis. In the same way, we observed that a *dksA* mutation diminished the PHB accumulation more than in the (p)ppGpp mutants, these mutations had an accumulative effect on PHB synthesis, and a double mutant took down the PHB synthesis. We showed that the DksA protein regulates the expression of stationary sigma factor RpoS at the transcriptional level, which is a positive PHB regulator. However, the RpoS protein levels did not change with the reduction of (p)ppGpp levels, this suggests that at least one mechanism, independent of RpoS, is regulated by (p)ppGpp and controls the PHB synthesis in *A. vinelandii*.

An additional copy of the *rpoS* gene under an independent and constitutive promoter in the *dksA* mutant restored the RpoS levels but not the PHB synthesis. Due to that, we decided to evaluate the transcriptional profile in the *dksA* mutant as compared to the wild-type strain to describe alternative mechanisms regulated by DksA that affect the PHB synthesis. Interestingly, DksA acts as a pleiotropic regulator of gene transcription and regulates approximately 17% of *A. vinelandii* genes.

The PHB accumulation depends on the accumulation of metabolites that activate or repress the enzymatic activity of proteins involved in the synthesis or degradation of this polymer. The transcriptomic analysis of the UWdksA strain showed that DksA is an activator of genes that encode enzymes from the central metabolism like

glycolysis and pyruvate metabolism, these metabolic pathways produce the necessary metabolites to PHB synthesis, then we propose that the reduction in gene expression of these enzymes can be an indirect regulation mechanism of PHB synthesis.

In summary, our results show the relevance of (p)ppGpp and DksA on PHB synthesis under conditions that did not promote the stringent response, moreover, we demonstrated that these effectors could regulate the PHB synthesis by independent pathways but had an accumulative effect. This study is the first step in describing the role of these regulators in the PHB synthesis.

2. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos están constantemente expuestos a desafíos medioambientales contra los cuales deben generar respuestas adaptativas rápidas y precisas, lo cual, les permite sobrevivir y proliferar dentro de las condiciones presentes en el medio que los rodea. El segundo mensajero (p)ppGpp en conjunto con la proteína DksA son los encargados de dirigir la denominada respuesta estricta, la cual, regula y modula la expresión de genes en bacterias durante la privación de diferentes nutrientes como aminoácidos, fosfatos, fuente de carbono o como respuesta al shock térmico, entre otros. Los niveles de (p)ppGpp y su interacción con la ARN polimerasa son los determinantes de la regulación génica ejercida por la respuesta estricta. Las proteínas encargadas de la síntesis y degradación de (p)ppGpp son conocidas como proteínas de tipo RSH (Rel-Spo Homologous) por su similitud a las proteínas RelA y SpoT de *Escherichia coli*, donde tienen función de sintetasa y sintetasa/hidrolasa respectivamente. La mayoría de las proteobacterias poseen una copia de los genes que codifican para homólogos de estas dos proteínas. El principal mecanismo de acción de (p)ppGpp es a través de la interacción directa con la ARN polimerasa, lo cual modifica la afinidad de esta por factores sigma alternativos y promueve la expresión de genes independientes de sigma 70. La unión a la ARN polimerasa se da en dos sitios específicos, el primero entre la subunidad β´ y ω y el segundo en el canal secundario de la polimerasa, este último es dependiente de la proteína DksA.

Azotobacter vinelandii es una γ-proteobacteria de la familia *Pseudomonadaceae*; habitante del suelo y capaz de fijar nitrógeno atmosférico. Su capacidad de sintetizar biopolímeros como el poli-β-hídroxibutirato (PHB) y el alginato le han convertido en un modelo de estudio para diferentes aplicaciones industriales. El PHB es un compuesto biocompatible y biodegradable por ello tiene una gran importancia en el campo biomédico, ambiental e industrial; siendo empleado, entre otras aplicaciones, en válvulas cardiacas, andamios óseos, micro perlas para la administración controlada de fármacos, remplazo de plásticos derivados de petróleo y en compuestos más amigables con el medio ambiente (Espin Ocampo, 2003).

El PHB es un polihídroxialcanoato (PHA) de cadena corta, almacenado en forma de gránulos intracelulares que fisiológicamente funcionan como reserva de carbono y energía para el metabolismo celular. La síntesis de PHB ha sido ampliamente estudiada y los mecanismos que regulan este proceso son aún objeto de estudio. Se ha demostrado la presencia de diferentes mecanismos que regulan tanto la expresión del operón biosintético *phbBAC* como la de su regulador transcripcional *phbR,* entre ellos, el factor sigma RpoS, la proteína RsmA o el sistema de dos componentes GacS/GacA (Velázquez-Sánchez et al., 2020).

La importancia de la respuesta estricta y de los niveles de (p)ppGpp en la síntesis de PHAs ha sido estudiada en diferentes especies como *Cupriavidus necator, Rhizobium etli* y algunas especies de *Pseudomonadaceae*. En *A. vinelandii* se describió la presencia de dos genes que codifican para proteínas tipo RSH, los genes *avin37060* (*relA*) y *avin02810* (*spoT*) los cuales recientemente se asociaron con el ciclo del PHB. Se demostró que una cepa mutante en el gen *relA* y una doble mutante *relA/spoT* disminuyen la síntesis de PHB en comparación con la cepa silvestre (Ortiz, 2019).

Lo anterior conllevó a que nos propusiéramos estudiar la importancia de los efectores de la respuesta estricta en la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

3. ANTECEDENTES

A. vinelandii es una *proteobacteria* de la subdivisión γ perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* género *Azotobacter*, es pleomórfica; motil gracias a flagelos perítricos, Gram negativa, habitante común del suelo, aerobia estricta, aunque puede desarrollarse en concentraciones bajas de oxígeno. Es una bacteria capaz de fijar el nitrógeno ambiental de forma aerobia dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y de materia orgánica a través de un sistema de tres nitrogenasas; además, posee un complejo sistema que protege dichas nitrogenasas de la inactivación por oxígeno (Espin Ocampo, 2003).

A. vinelandii es capaz de formar quistes resistentes a desecación (ver Figura 1), lo cual le permite soportar condiciones ambientales adversas y proliferar nuevamente cuando las condiciones sean más favorables. La síntesis de compuestos de interés industrial como el alginato (Alg) y el polihidroxibutirato (PHB) por *A. vinelandii,* despiertan gran interés industrial debido a sus aplicaciones como agentes gelificantes y/o espesantes y como plástico biodegradable respectivamente, además, pueden ser producidos de manera sustentable y amigable con el medio ambiente.

El polihidroxibutirato (PHB) es un polihidroxialcanoato (PHA), que se ha convertido en un compuesto atractivo a nivel industrial debido a sus propiedades bioquímicas, similares a las presentadas por plásticos derivados del petróleo, pero sin todas las consecuencias medioambientales que ha desencadenado el uso desmedido de estos materiales. Este tipo de biopolímeros son amigables con el medioambiente gracias a su fácil y relativamente rápida degradación; sus características de biocompatibilidad los hacen atractivos a la industria biomédica y su producción en bacterias posibilita su escalamiento industrial de manera renovable y con poco impacto ambiental.

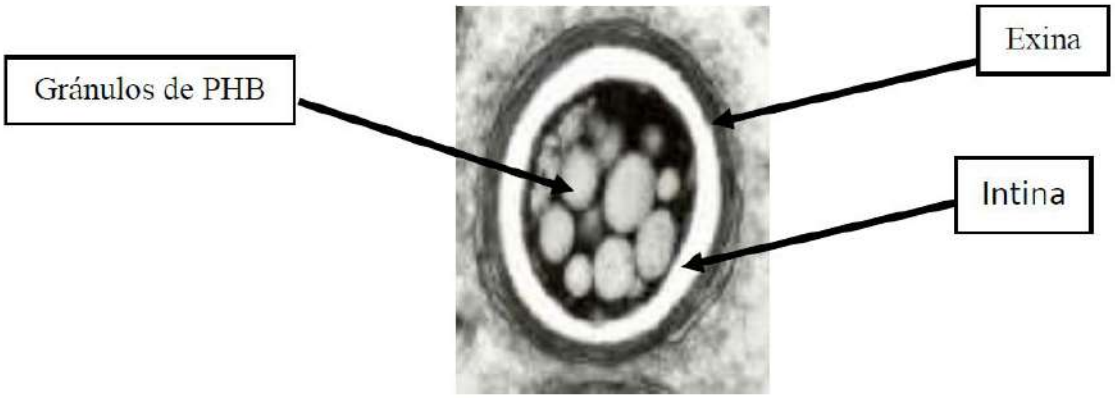


Figura 1. **Quiste de A. vinelandii**. Se señalan los gránulos intracelulares de PHB y las dos capas que componen el quiste.

3.1 SÍNTESIS DE POLI-β-HIDROXIBUTIRATO PHB

En *A. vinelandii* la síntesis de PHB se realiza principalmente durante la fase estacionaria temprana y está directamente relacionada con la disponibilidad de carbono, el estado de oxigenación y el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA). Este proceso inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la acción de la enzima β-cetotiolasa produciendo acetoacetil-CoA, seguido a ello, la enzima acetoacetil reductasa (dependiente de NADPH) lo reduce hasta β- hidroxibutiril-CoA, este es el monómero sobre el cual actúa la enzima PHB sintasa, quien polimeriza las cadenas de monómeros (Peralta-Gil et al., 2002; Senior & Dawes, 1973). El ciclo del PHB en *A. vinelandii* es un constante equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación y depende en gran medida de las condiciones metabólicas de la célula (Figura 2).

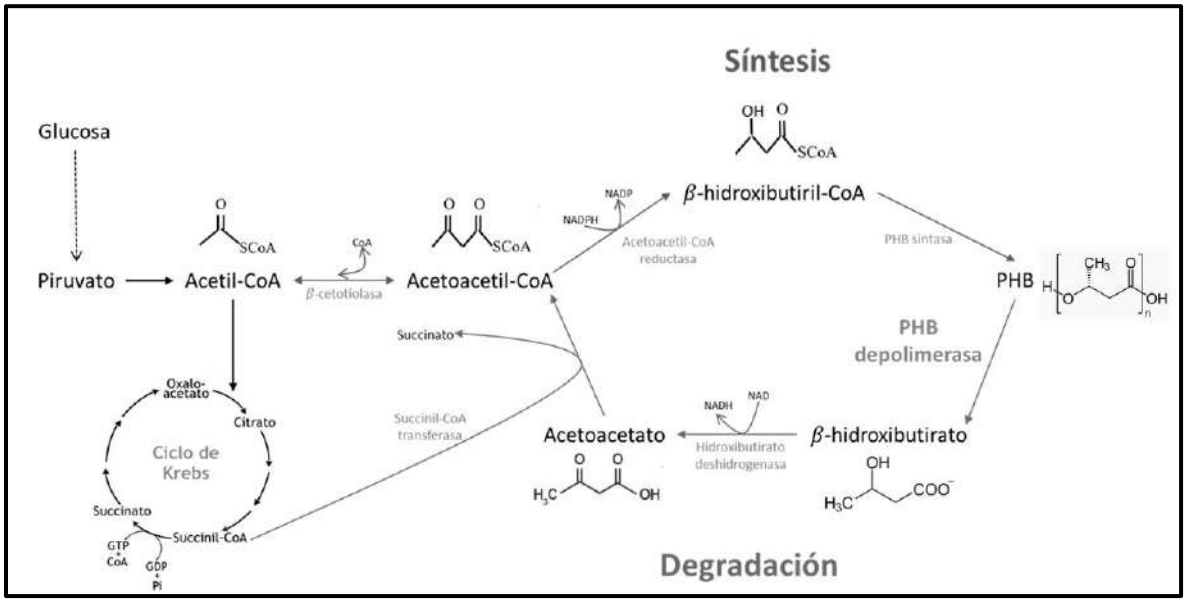


Figura 2.**Ciclo del PHB en *A. vinelandii***. Se muestran los principales precursores de la síntesis de PHB así como las enzimas necesarias para la síntesis y degradación del polímero.

El proceso de síntesis de PHB está estrechamente relacionado con la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA o ciclo de Krebs) y con la acumulación de acetil-CoA. Durante el crecimiento en medios balanceados, las moléculas de acetil-CoA son principalmente dirigidas al TCA, para continuar con la fosforilación oxidativa y la obtención de ATP. Bajo ciertas condiciones de cultivo, como la limitación de oxígeno y el exceso de carbono, se produce un aumento en el poder reductor celular, esto como consecuencia de la acumulación de NAD(P)H, lo cual inhibe la actividad de las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa (del TCA). Lo anterior provoca una acumulación de acetil-CoA en la célula, disminuyendo la cantidad de coenzima A (CoA) libre, liberando así la represión que esta molécula ejerce sobre la enzima β-cetotiolasa (necesaria para la síntesis de PHB) promoviendo así la síntesis de PHB (Segura & Espín, 2004; Senior & Dawes, 1973).

Los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de PHB están ordenados en el operón *phbBAC: phbB* (acetoacetil reductasa), *phbA* (β-cetotiolasa) y *phbC* (PHB sintasa). Corriente arriba del operón *phbBAC,* y en sentido divergente,

se encuentra el gen *phbR,* el cual codifica para un regulador positivo de la transcripción del operón y que pertenece a la familia de reguladores de tipo AraC/XylS (Peralta-Gil et al., 2002). Este regulador reconoce al menos dos secuencias idénticas y específicas de 18pb dentro de la región promotora de *phbB* promoviendo su transcripción (Hernandez-Eligio et al., 2011).

3.2 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE PHB

La regulación de la síntesis de PHB es objeto de estudio en diferentes especies bacterianas con el fin de describir y manipular los mecanismos implicados en la acumulación del polímero, y así, obtener cepas genéticamente modificadas en las cuales se mejore la cantidad y la calidad obtenida.

En *A. vinelandii*, la regulación de la síntesis de PHB ha sido ampliamente estudiada y diversos mecanismos son encargados de regular finamente este proceso. A nivel genético sabemos que la expresión del operón biosintético *phbBAC* es dependiente tanto del factor sigma de fase estacionaria RpoS como del regulador transcripcional PhbR (Hernandez-Eligio et al., 2011), estas proteínas reconocen sitios específicos dentro de la región promotora del operón y promueven su transcripción.

El factor sigma RpoS es un regulador maestro de la expresión de genes durante la fase estacionaria de crecimiento, en respuesta a diferentes tipos de estrés y bajo condiciones de privación de nutrientes. Similar a otros factores sigma alternativos, RpoS es capaz de unirse al core de la ARN polimerasa y competir con el factor sigma 70 (RpoD) por el sitio de unión, lo cual favorece la transcripción de un set diferente de genes denominados regulón de RpoS (en *E. coli* se ha demostrado que al menos el 10% del total de genes responden a RpoS, directa o indirectamente) (Battesti et al., 2011).

La transcripción del gen *phbR* inicia a partir de dos promotores: pR1 y pR2, los cuales son dependientes de PhbR y RpoS respectivamente, lo cual implica un mecanismo de autorregulación positiva (Hernandez-Eligio et al., 2011). La unión de

PhbR a la región promotora del operón *phbBAC* oculta el sitio de reconocimiento de RpoS, por consiguiente, la transcripción es dirigida principalmente por PhbR.

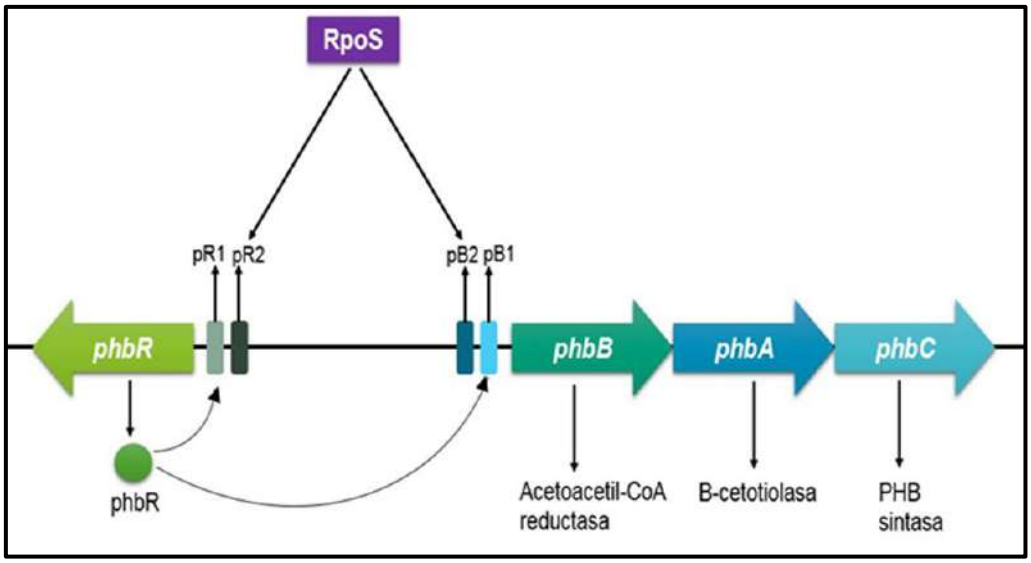


Figura 3. **Contexto genético de los genes que codifican para el activador transcripcional PhbR y las enzimas necesarias para la síntesis de PHB.** La expresión del operón biosintético *phbBAC* es dependiente de RpoS y del activador transcripcional PhbR. La región reguladora de *phbR* contiene sitios de reconocimiento de RpoS y de PhbR constituyendo un mecanismo de autorregulación.

Tanto *rpoS* como *phbR* son regulados por diferentes vías. En *A. vinelandii*, RpoS es regulado a nivel transcripcional por la proteína PsrA, la cual pertenece a la familia de reguladores TetR, esta proteína actúa como activador de la transcripción de *rpoS* durante la fase estacionaria por unión directa a su promotor (Cocotl-Yañez et al., 2011). A nivel postranscripcional, RpoS es regulado en *A. vinelandii* y en otras especies a través de degradación proteica mediante el complejo chaperona/proteasa ClpX/P. En *E. coli*, RssB actúa como adaptador para el reconocimiento de RpoS por ClpX, en *A. vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa* se propone que un complejo formado por RssB/RssC reconoce a RpoS y así puede ser presentado a la chaperona ClpX para ser degradado por la proteasa ClpP (Muffler et al., 1996; Rodríguez-Martínez et al., 2023).

Diferentes mecanismos de regulación sobre *rpoS* han sido descritos en especies de *Pseudomonas* y en *E. coli.* Por ejemplo, en *E. coli* la presencia de los pequeños ARNs DsrA y RprA regulan la estructura de la región 5'UTR del transcrito *rpoS*, facilitando su traducción durante diferentes condiciones de crecimiento (Sledjeski et al., 1996; Majdalani et al., 2001). En especies de *Pseudomonas*, RpoS se ha especializado y se ha asociado a la expresión de diferentes fenotipos, como la expresión de factores de virulencia, y parece no ser esencial para algunas condiciones de estrés como lo es en *E. coli* (Venturi, 2003).

En *A. vinelandii* el sistema de dos componentes GacS/GacA, el sistema de fosforelevo PTS^{Ntr} y la proteína PsrA regulan la expresión de RpoS y por consiguiente la síntesis de PHB (Castañeda et al., 2001; Muriel-Millán et al., 2015 Cocotl-Yañez et al., 2011).

La síntesis de PHB en *A. vinelandii* es un proceso celular ampliamente regulado, no solo a nivel genético, sino que también involucra una fina regulación metabólica que brinda las condiciones necesarias para la acumulación del polímero y su posterior uso por parte de la célula (Senior & Dawes, 1973).

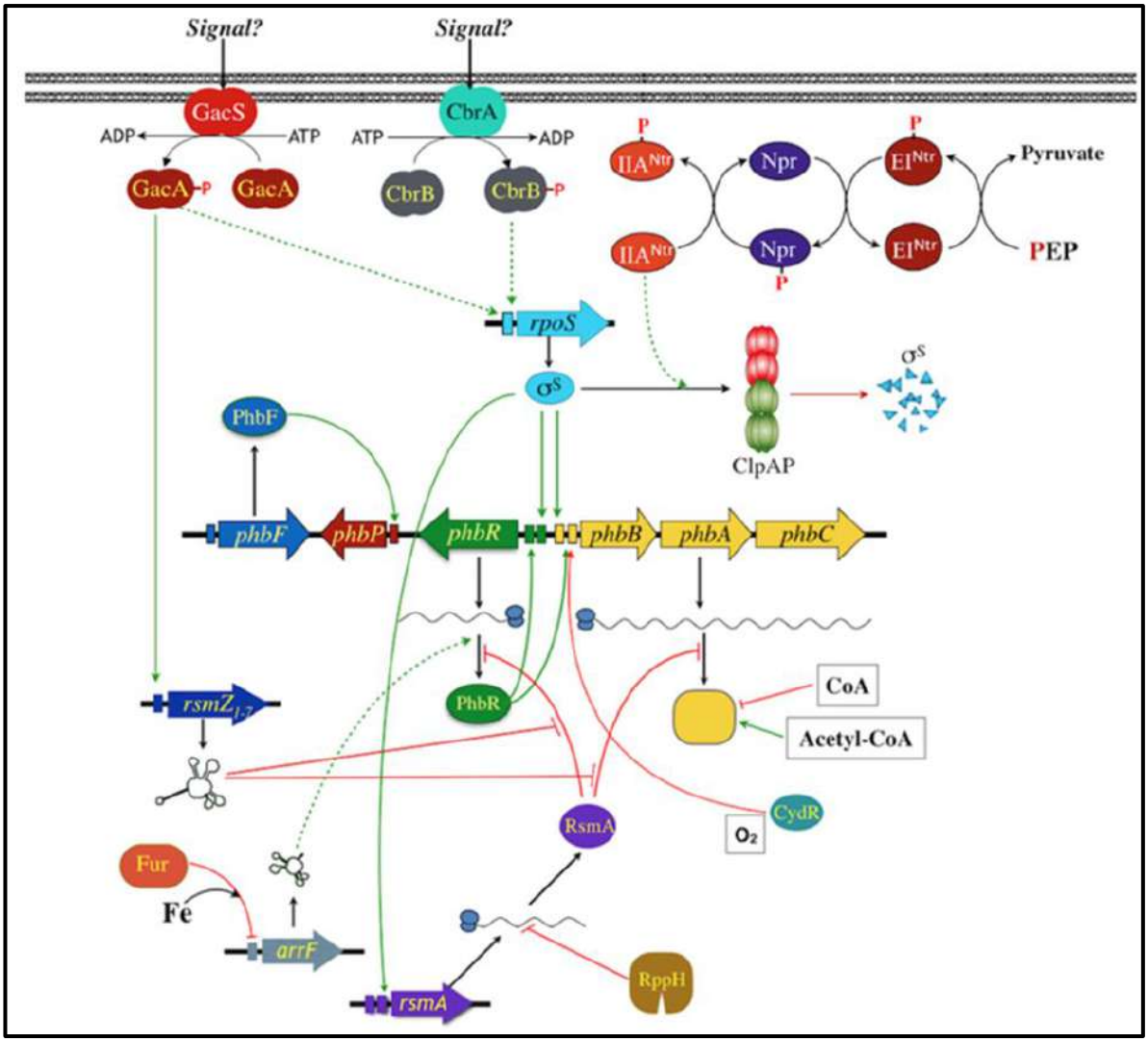


Figura 4. **Mecanismos de regulación de la síntesis de PHB descritos en *A. vinelandii.***
Tomado de (Velázquez-Sánchez et al., 2020).

3.3 RESPUESTA ESTRICTA

La respuesta estricta es uno de los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de responder a la privación de algunos nutrientes, como carbono, nitrógeno, fosfatos, aminoácidos, entre otros. El segundo mensajero (p)ppGpp (Guanosina tetra o pentafosfato) y la proteína DksA son los dos principales efectores de este tipo de respuesta en las proteobacterias (Dworkin, 2023; Gourse et al., 2018).

El segundo mensajero (p)ppGpp fue descrito inicialmente en cepas de *E. coli* expuestas a condiciones de privación de aminoácidos, las cuales, mostraban una disminución en la síntesis de ARNs estables, como los ribosomales o los de transferencia (Cashel, 1969). El creciente estudio del papel de este efector en la respuesta a condiciones nutricionales adversas tanto en bacterias como en cloroplastos ha revelado que (p)ppGpp regula una amplia variedad de procesos celulares como la replicación del ADN, la transcripción, traducción, el ensamble de ribosomas y rutas del metabolismo celular. El principal mecanismo de acción descrito para este segundo mensajero, es la interacción directa con la ARN polimerasa y/o facilitado por diferentes reguladores transcripcionales como DksA (Figura 5); aunque también, se han descrito proteínas capaces de unir (p)ppGpp y regular su actividad (Ross et al., 2016; Steinchen & Bange, 2016).

No se ha descrito una secuencia nucleotídica consenso común en los promotores que permita predecir *in silico* si estos genes serian blancos de regulación en respuesta a los niveles de (p)ppGpp; en cambio, el amplio espectro de blancos se atribuye a la capacidad de interactuar directamente con la ARN polimerasa y modificar su afinidad. Se plantea que las propiedades cinéticas de cada promotor determinan la susceptibilidad a ser regulado por (p)ppGpp; la interacción de (p)ppGpp en la ARN polimerasa reduce el tiempo de vida del complejo abierto en la interacción promotor-ARNpol, lo cual favorece la expresión de genes cuyo complejo es muy inestable, además, se ha demostrado que la interacción de pppGpp-DksA-ARNpol aumenta la afinidad por el ADN y favorece la represión o activación de genes. Aunque el contenido de A-T y G-C en las regiones promotoras se ha asociado con la activación y represión de la transcripción respectivamente, esto solo es cierto para un cierto número de genes, y no puede extrapolarse como regla general para predecir regulones de la respuesta estricta (Haugen et al., 2008; Lemke et al., 2011).

La disminución en la transcripción de ARNs estables como los rARNs y tARNs durante la respuesta estricta permite una mayor disponibilidad de core libre de la

ARN polimerasa, lo cual favorece la unión de factores sigma alternativos (Haugen et al., 2008; Gourse et al., 2019).

3.4 PROTEÍNA DksA

La proteína DksA fue inicialmente descrita en *E. coli* como una proteína que revertía el fenotipo observado en cepas mutantes en el gen *dnaK* (involucrado en la respuesta a choque térmico) (Kang & Craig, 1990). Sin embargo, estudios posteriores no encontraron una actividad de chaperona en DksA como se propuso inicialmente, por el contrario, se demostró que en los niveles de expresión basal, DksA es capaz de unirse directamente a la ARN polimerasa, reprimir la actividad de los promotores de los rARNs y potenciar el efecto ejercido por (p)ppGpp; por tanto, se propuso que DksA actúa como un regulador transcripcional sinérgico con (p)ppGpp (Paul et al., 2004; Perron et al., 2005). Homólogos de DksA han sido descritos en la mayoría de las proteobacterias, pero no se han encontrado homólogos en otros filos, como en *Firmicutes* o *Thermophiles*; sin embargo, es posible que existan proteínas homólogas estructurales en estos filos ya que constituyen un nuevo tipo de proteínas de unión ARN polimerasa-ADN (Huang et al., 2023)

Para la identificación del sitio de unión de (p)ppGpp a la ARN polimerasa se empleó una técnica de cross-linking usando ^{32}P-(p)ppGpp y se definió molecularmente mediante mutaciones puntuales en los residuos cercanos; esta estrategia demostró que existe un sitio de unión que se encuentra en el canal principal de la ARN polimerasa, y que está mediado por la interacción entre dos partes de la subunidad β´ y la región N-terminal de la subunidad ω, y fue denominado como sitio de unión 1 (Ross et al., 2013). Sin embargo, mutaciones puntuales en el *core* de unión o la falta de la subunidad ω (mutación en *rpoZ*), presentaban fenotipos débiles *in vivo* en comparación con los resultados *in vitro*, lo cual hacía suponer que existía otro componente celular que regulaba la unión de (p)ppGpp a la ARN polimerasa (Gourse et al., 2018).

La inclusión de la proteína DksA en estos experimentos de cross-linking, en conjunto con unidades de ARN polimerasas que carecían de la subunidad ω, permitió identificar un segundo sitio de unión, dependiente de DksA, el cual regula la respuesta de los promotores en dependencia de los niveles de (p)ppGpp (Ross et al., 2016). Se propone que la presencia de estos dos sitios de unión permite regular finamente la saturación de la ARN polimerasa, y así, generar una respuesta controlada en dependencia de los niveles intracelulares de (p)ppGpp. Interesantemente, en algunos promotores de *E. coli* evaluados *in vitro*, se demostró que la represión de la transcripción ocurre en presencia de cualquiera de los dos sitios de unión; por el contrario, para la activación de promotores, es indispensable la presencia del sitio 2, es decir, la presencia de la proteína DksA; en ambos casos, el efecto sobre la transcripción se ve potenciado cuando la polimerasa presenta ambos sitios de unión (Ross et al., 2016).

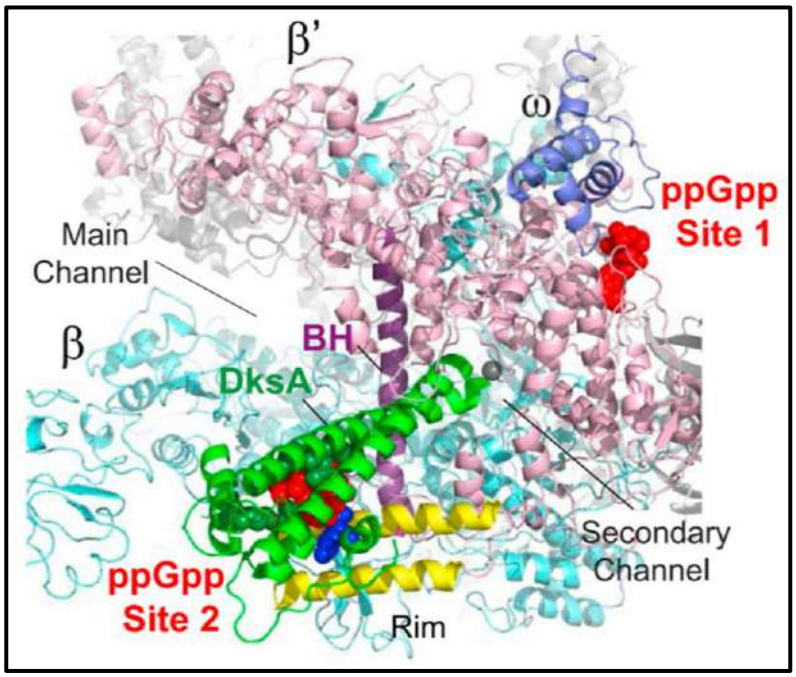


Figura 5. **Sitios de unión de (p)ppGpp en la ARN polimerasa.** Se describen los dos sitios de unión, el primero entre la subunidad β´ y ω, el segundo dependiente de la proteína DksA (señalada en verde). Tomado de (Ross et al., 2016).

La estructura de la proteína DksA asemeja a los factores de elongación de la transcripción GreA y GreB, con un dominio globular y una región "*coil-coil"* que facilita su unión al canal secundario de la ARN polimerasa entre las subunidades β y β´ (Perederina et al., 2004). La inclusión de DksA en las reacciones de transcripción *in vitro*, permitió solucionar la discrepancia que se presentaba entre los resultados observados *in vivo* e *in vitro* en la regulación por (p)ppGpp, por ejemplo, se demostró que la presencia de DksA y (p)ppGpp reducía en 20 veces la transcripción de promotores de rARNs comparado a cuando solo se utilizaba (p)ppGpp donde se observaba una reducción de 3 veces de actividad (Paul et al., 2004). Así mismo, se demostró que (p)ppGpp regula positivamente la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos únicamente en presencia de DksA. Interesantemente, este regulador transcripcional influye en la regulación de sus genes blanco sin unión directa al ADN a diferencia de los reguladores transcripcionales canónicos (Paul et al., 2005).

La importancia de la proteína DksA como regulador transcripcional, incluso de manera independiente a (p)ppGpp ha sido evaluada en diferentes proteobacterias. En *E. coli*, la mayoría de los genes son co-regulados por (p)ppGpp y DksA, sin embargo, algunos de estos genes son regulados independientemente y/o diferencialmente por cada uno de ellos; por ejemplo, todos los genes relacionados con la quimiotaxis y la síntesis del flagelo se encuentran reprimidos por DksA, pero aproximadamente un 60% de estos genes son activados por (p)ppGpp (Åberg et al., 2009).

La respuesta transcripcional regulada por DksA puede variar entre especies y se ha especializado en algunas de ellas. Una comparación del transcriptoma de cepas mutantes en *dksA* de *E. coli, S. typhimurium* y *S. bongori* demostró que, incluso bajo condiciones no estrictas (sin sobreproducción de (p)ppGpp), DksA regula la expresión del 25%, 20% y 15% del total de genes en cada especie respectivamente, indicando que, DksA es un regulador pleiotrópico y no únicamente un regulador asociado a la respuesta estricta (Cohen et al., 2022). Interesantemente, en este mismo estudio se demostró que el regulón de DksA involucra genes metabólicos

centrales implicados en la glicolisis, el ciclo TCA (ácidos tricarboxilicos), la biosíntesis de pirimidinas y el *quorum sensing* en todas las especies estudiadas, lo cual permite hipotetizar una serie de genes en común regulados entre especies cercanas (proteobacterias). Tambien se evidenció que los genes de virulencia en las especies de *Salmonella* son parte del regulón de DksA y fenotipos como la motilidad y la quimiotaxis son regulados diferencialmente entre especies: en *Salmonella,* estos genes son activados por DksA mientras que en *E. coli* son reprimidos (Cohen et al., 2022).

3.5 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE (p)ppGpp

La disponibilidad de genomas bacterianos ha permitido describir la presencia altamente conservada de uno o más genes que codifican para proteínas de tipo sintetasas/hidrolasas de (p)ppGpp, denominadas en general como proteínas RSH (*Rel/Spo Homolog*) por su similitud con las proteínas RelA y SpoT de *E. coli* (Potrykus & Cashel, 2008).

La actividad sintetasa de las proteínas RSH está definida por la presencia de un dominio de síntesis (*Syn*) con regiones estructurales muy conservadas entre distintas especies (Steinchen & Bange, 2016) las cuales se encargan de la fosfotransferencia desde el ATP hacia el GDP y GTP para la síntesis de ppGpp y pppGpp, respectivamente. Las proteínas de tipo RelA presentan exclusivamente actividad sintetasa, forman parte del grupo de sintetasas tipo RSH largas y constan de dos dominios definidos que las diferencian de las sintetasas cortas (SAS); dichos dominios se dividen en catalítico (RSH-NTD) y carboxilo terminal (RSH-CTD), el primero está conformado por dos diferentes regiones, la región con actividad hidrolasa (HD) y la región con actividad sintetasa (Syn). Sin embargo, en las proteínas RelA, se ha observado que el dominio HD ha perdido su actividad catalítica por mutaciones en los residuos claves para la hidrolisis de (p)ppGpp (Steinchen & Bange, 2016). El extremo carboxilo por su parte presenta una serie de dominios relacionados con la interacción y la unión a otras proteínas. Se ha demostrado que la actividad de RelA es estimulada en respuesta a la presencia de

tARNs no cargados en el sitio A del ribosoma, la interacción RelA-ribosoma esta mediada por el extremo carboxilo (Agirrezabala et al., 2013).

Por otra parte, las proteínas de tipo SpoT tienen activos los dos sitios catalíticos del extremo N-terminal, por lo tanto, presentan actividad de sintetasa e hidrolasa de (p)ppGpp. Se ha demostrado *in vitro*, que estas proteínas presentan una menor actividad de síntesis en comparación con las proteínas de tipo RelA y que pueden responder a diversos estímulos, mediados aparentemente por su interacción con otras proteínas (Mechold et al., 2002). La actividad hidrolítica de SpoT es dependiente de manganeso y el mecanismo más aceptado por el cual realiza su actividad es la remoción de los fosfatos unidos al extremo 3´ de la ribosa. A partir de la estructura obtenida por cristalografía se estableció que existe una distancia de aproximadamente 30 Ǻ entre las dos dominios (HD y *Syn*), por lo cual se propuso que la regulación entre la síntesis e hidrólisis involucra la unión específica del ligando a uno de los dominios inhibiendo alostéricamente la actividad del otro (Steinchen & Bange, 2016).

El reconocimiento de señales a través de estas proteínas y las interacciones que estas desarrollan son claves para generar la respuesta estricta en condiciones de estrés. Aunque el mecanismo más estudiado es la detección de tARNs sin cargar a través de la proteína RelA, se ha demostrado que algunos tipos de estrés como la falta de ácidos grasos, limitación de fosfatos, carbono y hierro, el choque térmico o la presencia de detergentes son reconocidos por las proteínas SpoT e inducen la acumulación de (p)ppGpp (Potrykus & Cashel, 2008).

3.6 PROTEÍNAS RelA Y SpoT EN ORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAs

En algunas bacterias productoras de PHAs se ha demostrado que el ciclo de estos biopolímeros está relacionado con los niveles intracelulares de (p)ppGpp. En *Pseudomonas oleovorans* se demostró que un aumento en la concentración intracelular de (p)ppGpp coincidía con la degradación de PHAs (Ruiz et al., 2001). Así mismo, cepas mutantes en los genes *relA/spoT* de *Pseudomonas putida*

KT2440 acumularon menor cantidad de PHA en comparación con la cepa silvestre. El transcriptoma comparativo de esta mutante demostró que *rpoS* es regulado positivamente por (p)ppGpp (Mozejko-Ciesielska, et. al., 2017).

En *Cupriavidus necator* (anteriormente llamado *Ralstonia eutropha* H16) se demostró que mutantes (p)ppGpp^0 (Δ*spoT1*/Δ*spoT2*) sintetizan menor cantidad de PHB en comparación a la cepa silvestre y además presentan una aumentada actividad de degradación del polímero. La complementación de la doble mutante con una copia de *spoT2* (sintetasa de tipo *relA*) acumuló mayor cantidad de PHB que la cepa silvestre y la actividad de degradación era similar a la cepa silvestre. Los autores proponen que altas concentraciones de (p)ppGpp favorecen la acumulación de PHB y disminuyen la degradación; además, proponen que la actividad de las depolimerasas de PHB pueden estar reguladas por los niveles de (p)ppGpp (Juenger et al., 2017).

3.7 PROTEÍNAS RelA Y SpoT en *A. vinelandii*

Anteriormente describimos la presencia de dos genes en *A. vinelandii*: *avin02810* (*spoT*) y *avin37060* (*relA*), que codifican para proteínas de tipo SpoT y RelA las cuales tienen un 54% y un 48% de homología con las proteínas de *E. coli* respectivamente y un 86% y 82% con respecto a *P. aeruginosa*. Así mismo, se confirmó la presencia de dominios comunes a las proteínas tipo RSH en ambas secuencias de aminoácidos, lo que nos permitió distinguir entre la posible sintetasa gen *relA* (*avin03910*) y la proteína con dominios sintetasa/hidrolasa gen *spoT* (*avin02810*) aunque su actividad aún no se ha determinado experimentalmente (Ortiz-Vasco, 2019).

Basados en los antecedentes presentados se construyeron cepas mutantes en los genes *relA* y una doble mutante *relA/spoT* en *A. vinelandii* y se evaluó la producción de PHB en dichas cepas (ver figura 6). Los resultados obtenidos demostraron que una mutante en *relA* y una doble mutante *relA/spoT* presentaron menor síntesis de

PHB en comparación con la cepa silvestre, lo que permitió plantear una relación entre los niveles de (p)ppGpp y la síntesis de PHB (Ortiz-Vasco, 2019).

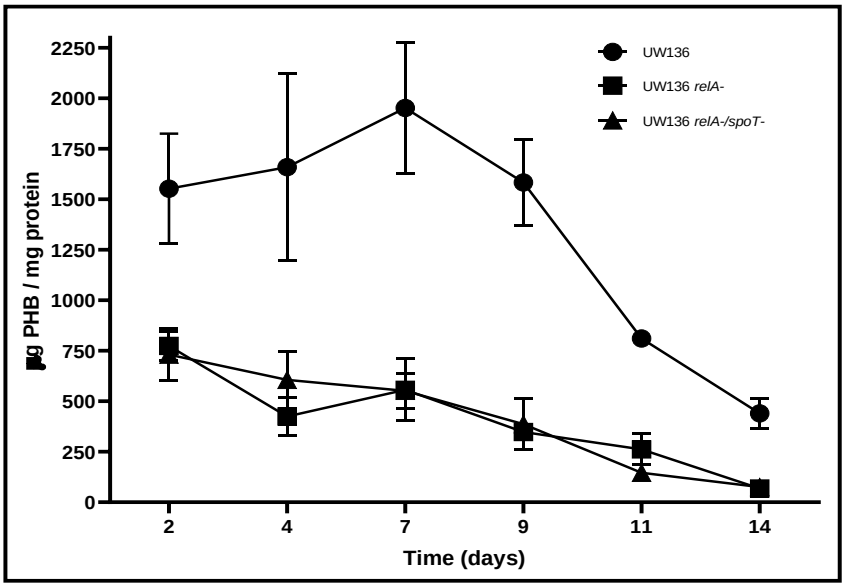


Figura 6. **Acumulación de PHB en las cepas de *A. vinelandii* con mutaciones en los genes *relA* y *relA/spoT.***

4. JUSTIFICACIÓN

La respuesta estricta, a través de (p)ppGpp y DksA, regula diversos fenotipos que no están directamente relacionados con la respuesta a condiciones de estrés nutricional. Describir el papel de estos efectores en la síntesis de PHB en *A. vinelandii* permitirá comprender mejor las rutas y condiciones que promueven la acumulación del polímero, lo cual contribuirá posteriormente en sus aplicaciones.

5. HIPÓTESIS

La respuesta estricta regula la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii* modulando la expresión de genes que participan en este proceso.

6. OBJETIVO GENERAL

Describir el papel de la respuesta estricta sobre la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii*.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los genes efectores de la respuesta estricta en *A. vinelandii.*

2. Identificar los genes de la síntesis de PHB regulados por la respuesta estricta.

3. Integrar el mecanismo de regulación ejercido por (p)ppGpp y DksA con los demás mecanismos de regulación descritos del ciclo de PHB en *A. vinelandii*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS EFECTORES DE LA RESPUESTA ESTRICTA EN *A. vinelandii*.

En *A. vinelandii* se describió la presencia de dos genes que codifican para proteínas de tipo RSH, similar a otras especies de proteobacterias (Ortiz-Vasco, 2019), la mutación en *relA* y una doble mutante *relA/spoT* presentaron un fenotipo similar, una disminución en la síntesis de PHB en el transcurso de un periodo de incubación de 14 días en medio sólido PY sacarosa 2% (Figura 6).

La importancia de la unión de (p)ppGpp en dos sitios dentro de la ARN polimerasa puede ser estudiado individualmente por mutaciones en las proteínas que facilitan su unión (RpoZ y DksA). Como se describió en la sección de antecedentes, el sitio de unión 1 es dependiente de la subunidad ω (codificada por el gen *rpoZ*) de la ARN polimerasa, mientras que el sitio 2 es dependiente de la proteína DksA.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos propusimos determinar la importancia de la regulación a nivel transcripcional ejercida por la respuesta estricta en la síntesis de PHB sin alterar los niveles de (p)ppGpp, a través de evaluar individualmente el efecto de mutaciones en los dos sitios de unión a la ARN polimerasa. Para ello, realizamos la búsqueda de los genes homólogos de *rpoZ* y *dksA* en *A. vinelandii* mediante la herramienta *Nucleotide BLAST* del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando como referencia los genes *dksA* y *rpoZ* de *E. coli*. Como resultado encontramos el gen *avin42650* que codifica para una proteína con una identidad de 72% con respecto a la proteína DksA de *E. coli*, así mismo, un homólogo del *rpoZ* (avin02820) producto RpoZ que comparte con un 78% de identidad con la proteína de *E. coli*.

El contexto genético y la homología de secuencia con otras especies cercanas como *P. aeruginosa* (88% y 77% para DksA y RpoZ respectivamente), nos permiten

proponer que estos genes son los homólogos de los efectores de la respuesta estricta en *A. vinelandii*.

7.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ESTRICTA EN LA SÍNTESIS DE PHB.

La respuesta celular generada por la acumulación de (p)ppGpp se ha descrito principalmente en cepas expuestas a privación de aminoácidos mediante diferentes metodologías como el uso de cepas auxótrofas, limitando la concentración de aminoácidos en el medio o por la adición de análogos de aminoácidos que compiten con el tARN correspondiente, como por ejemplo el hidroxamato de serina (Dworkin, 2023). Sin embargo, la importancia de los efectores de la respuesta estricta en condiciones de estrés diferentes a la privación de aminoácidos o incluso en condiciones de no privación de nutrientes, tambien ha sido estudiada (Calderón-Flores et al., 2005; Cohen et al., 2022; Schafhauser et al., 2014; Wu et al., 2020).

Teniendo en cuenta la importancia a nivel transcripcional de estos efectores, se decidió evaluar la importancia de los dos sitios de unión de (p)ppGpp en la ARN polimerasa y descartar algún efecto secundario derivado de la reducción de los niveles de (p)ppGpp como los esperados en las mutantes *relA* y *relA/spoT*. Para ello se construyeron cepas mutantes UW*dksA* y UW*rpoZ* las cuales contenían un casete de resistencia a espectinomicina y gentamicina respectivamente. Las construcciones se realizaron en sentido no polar con la transcripción del gen, con el fin de no afectar la expresión de los genes rio abajo.

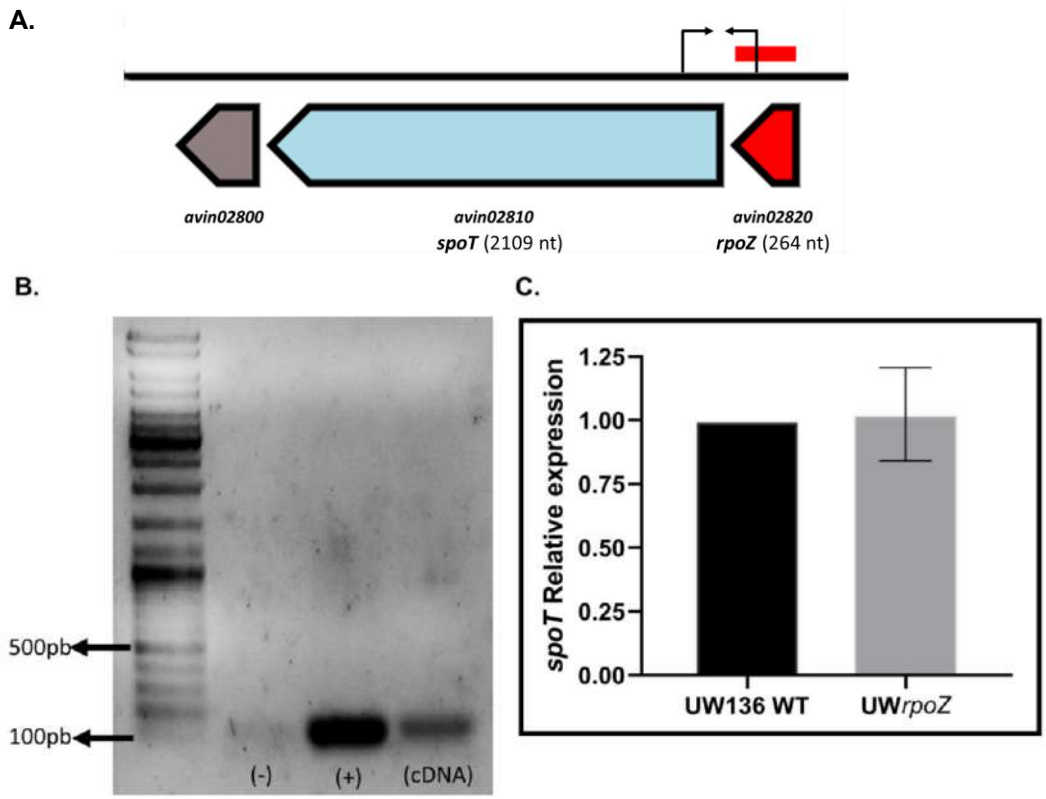


***Figura 7*. Los genes *rpoZ* y *spoT* forman un operón y la mutación en *rpoZ* no afecta la transcripción de *spoT.* A.** Contexto genético del gen *rpoZ* (subunidad ω). Las flechas indican la región amplificada utilizando los oligonucleótidos rpoZ-InterFw y rpoZ-InterRv. El rectángulo rojo indica la región codificante de *rpoZ*. El sitio de restricción SalI fue empleado para introducir un casette de resistencia a gentamicina. **B.** RT-PCR a partir de ARN total extraído de la cepa silvestre UW136 empleando los oligonucleótidos rpoZ-InterFw y rpoZ-InterRv. Como control positivo se empleó ADN total de la misma cepa UW136. **C.** Expresión relativa mediante RT-qPCR para el gen *spoT* a partir de ARN total proveniente de la cepa UW*rpoZ* con respecto a la cepa silvestre.

Se evaluó la síntesis de PHB en todas las cepas construidas; en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, las mutaciones que reducen los niveles intracelulares de (p)ppGpp (*relA* y *relA/spoT*) disminuyen en aproximadamente un 50% la síntesis de PHB. Sin embargo, las mutaciones que afectan directamente la unión de (p)ppGpp a la ARN polimerasa presentan fenotipos diferentes; mientras que la mutación en *rpoZ*, que elimina la unión al sitio 1 no tuvo efecto en la síntesis de PHB, la cepa mutante UW*dksA* (sitio 2) afecto en mayor medida la síntesis de

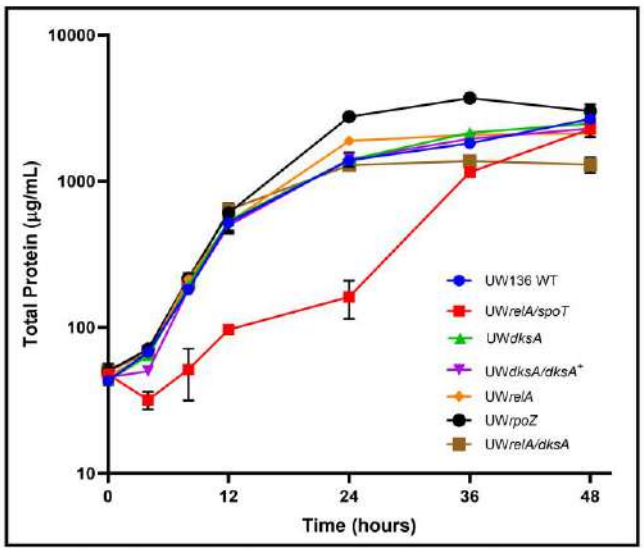
PHB (80% aproximadamente) en comparación con la cepa silvestre y un 30% más con respecto a la cepa UW*relA/spoT* (Figura 8).

Estos resultados nos permitieron concluir que al disminuir los niveles de (p)ppGpp la síntesis de PHB se disminuye, sin embargo, cuando se elimina la proteína DksA, sitio de unión 2, la síntesis es aún menor lo cual nos permite hipotetizar que, aunque en esta cepa los niveles de (p)ppGpp no han sido modificados, la imposibilidad de unirse a este sitio en la ARN polimerasa afecta marcadamente la síntesis de PHB y/o que DksA es capaz de regular la síntesis de PHB independientemente de (p)ppGpp.

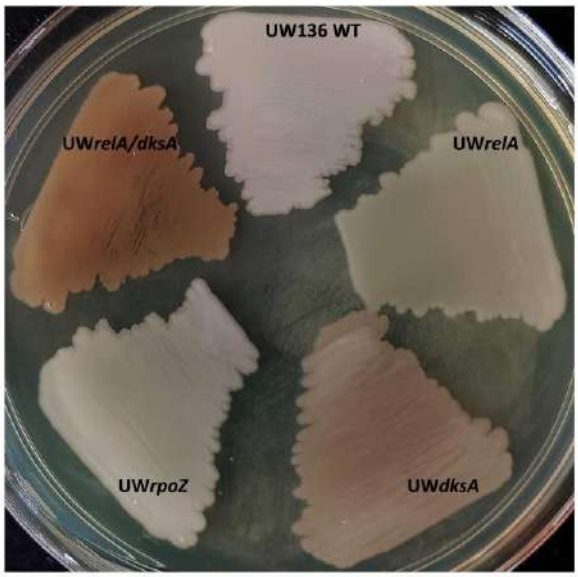
Interesantemente la cepa UW*relA/dksA* abate la síntesis de PHB, lo cual nos muestra un efecto acumulativo de estas mutaciones. Esto nos sugiere que, (p)ppGpp no solo regula a nivel transcripcional la síntesis de PHB, sino que puede estar regulando por otros mecanismos la producción de PHB en *A. vinelandii*, lo cual es un tema abierto a investigación. El fenotipo observado en la cepa UW*rpoZ* nos permite proponer que la unión de (p)ppGpp al sitio 1 no es relevante para la síntesis de PHB bajo las condiciones estudiadas.

La importancia de la proteína DksA como regulador independiente e inclusive en algunos genes, opuesto a (p)ppGpp, y el claro fenotipo presentado en la mutante UW*dksA*, nos hizo preguntarnos cual pudiera ser el mecanismo por el cual DksA regula la síntesis de PHB incluso en presencia de niveles normales de (p)ppGpp. Además de ello, la complementación en la cepa UW*dksA* con una copia silvestre de *dksA* (cepa UW*dksA/dksA*+) restauró la síntesis de PHB (Figura 8), confirmando así que la reducción en la síntesis del polímero es causada por la ausencia de DksA.

A.


10000
1000
100
10
Total Protein (µg/mL)
0
12
24
36
48
Time (hours)
UW136 WT
UWrelA/spoT
UWdksA
UWdksA/dksA+
UWrelA
UWrpoZ
UWrelA/dksA

B.


UW136 WT
UWrelA/dksA
UWrelA
UWrpoZ
UWdksA

C.

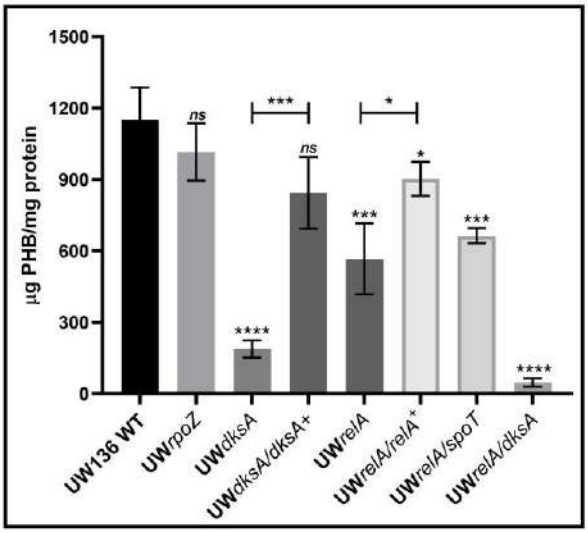

1500
1200
900
600
300
0
µg PHB/mg protein
ns
***
*
ns
****
***
*
***
****
UW136 WT
UWrpoZ
UWdksA
UWdksA/dksA+
UWrelA
UWrelA/relA+
UWrelA/spoT
UWrelA/dksA

Figura 8. **Los efectores de la respuesta estricta regulan la síntesis de PHB. A.** Curva de crecimiento de las cepas construidas en medio PY líquido a 30°C. **B.** Fenotipo de síntesis de PHB en las diferentes cepas construidas. El color blanco indica una acumulación del polímero, menor producción, menor coloración blanca. Agar PY 2% sacarosa 36h de incubación a 30°C. **C.** Cuantificación de PHB a las 36h de incubación en medio PY líquido. El análisis estadístico se realizó en comparación con la cepa silvestre y en el caso de las complementaciones con sus respectivas cepas mutantes.

7.3 DksA REGULA LA EXPRESIÓN DE RpoS en *A. vinelandii.*

Como se describió anteriormente, el factor sigma de fase estacionaria RpoS activa la transcripción del operón biosintético *phbBAC* y el regulador transcripcional *phbR* (Peralta-Gil et al., 2002) durante la síntesis de PHB en *A. vinelandii.* La importancia de DksA como regulador de la expresión de RpoS en diferentes bacterias ha sido descrita. En *E. coli*, la cantidad de RpoS y la actividad transcripcional de su promotor se encuentra disminuida en una mutante Δ*dksA,* incluso en condiciones en las cuales se estimula la síntesis de (p)ppGpp (lo cual favorece la acumulación de RpoS) (Brown et al., 2002). En *Salmonella enterica* serotipo typhimurium, mutaciones en *dksA* disminuyen la expresión de RpoS en diferentes fases de crecimiento celular; sin embargo, una cepa doble mutante *relA/spoT* no presenta este mismo efecto. En conjunto, *rpoS, dksA* y *relA/spoT* regulan la expresión de las islas de virulencia SPI1 y SPI2 en esta bacteria (Rice et al., 2015).

Se decidió evaluar si la respuesta estricta regula los niveles de RpoS en *A. vinelandii*. Inicialmente se evaluó la cantidad de RpoS en fase estacionaria (36h de incubación) en las cepas UW136, UW*dksA* y UW*relA* empleando los anticuerpos policlonales anti-RpoS reportados por Muriel-Millán (Muriel-Millán et al., 2017). En la figura 9 se observan los resultados de un ensayo de tipo Western Blot en donde se evidencia que la mutación en *relA*, no afecta la acumulación de RpoS; sin embargo, la cepa UW*dksA* presenta una disminución en la cantidad de RpoS en fase estacionaria, lo cual correlaciona con la disminución en la síntesis de PHB.

Se evaluó la estabilidad de la proteína RpoS en la cepa UW*dksA*; para ello se empleó un estudio para determinar la estabilidad de proteínas después de la adición

de kanamicina a una concentración de 0.5 mg/mL lo cual detiene la síntesis proteica y permite determinar modificaciones en los tiempos de vida media. Como se observa en la figura 9, la proteína RpoS en la cepa UW*dksA* presenta una estabilidad similar a la cepa silvestre UW136, como control se utilizó la cepa UW*ptsP*, la cual contiene una mutación en el gen *ptsP* del sistema PTS^{Ntr} la cual genera una disminución en la estabilidad de RpoS (Muriel-Millán et al., 2017). Este resultado nos permitió proponer que la disminución de los niveles de RpoS en la cepa UW*dksA* no se asocia a una disminución en la estabilidad de la proteína.

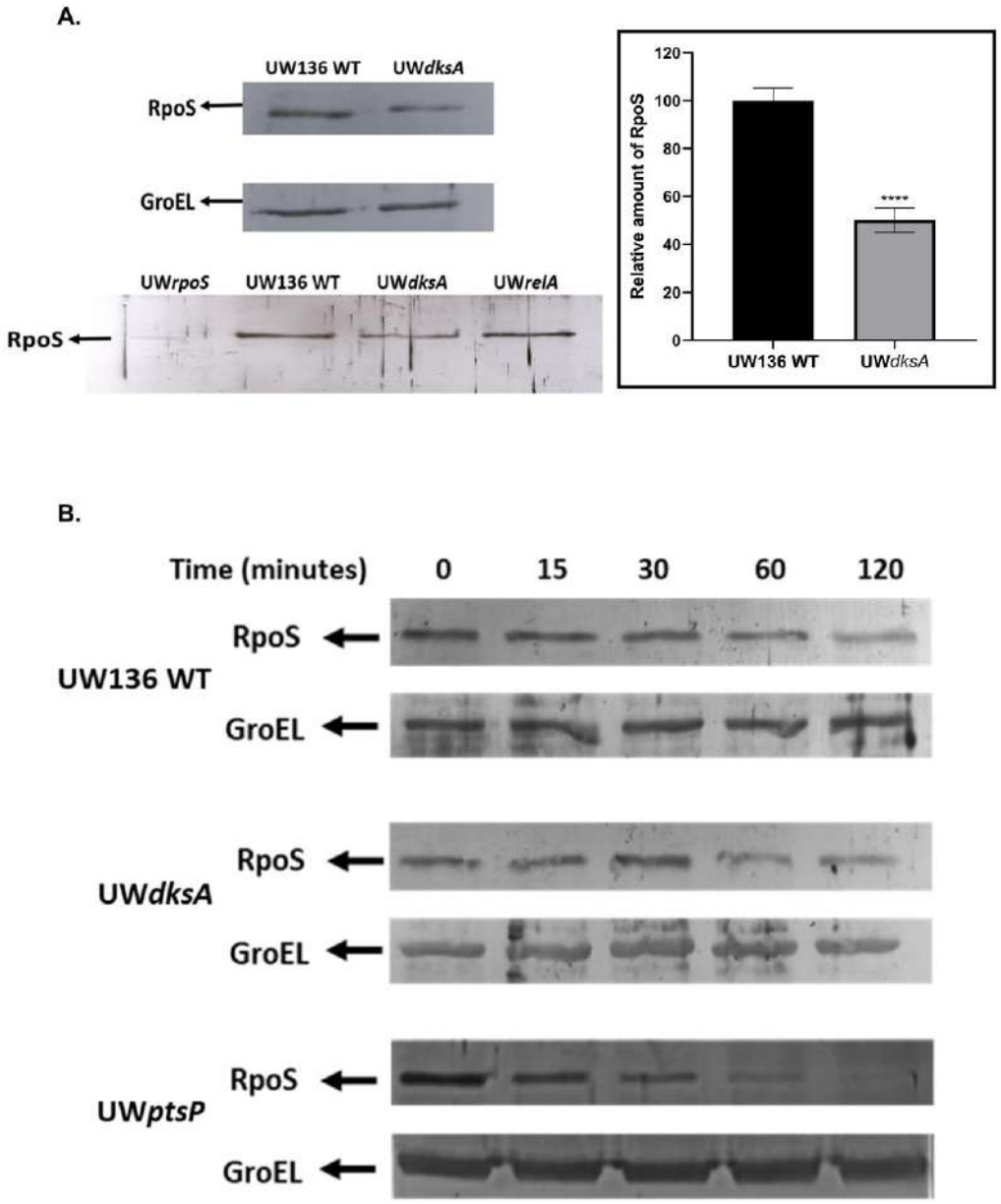


Figura 9. **La cantidad de proteína RpoS esta disminuida en la cepa UW*dksA*, pero no en la cepa UW*relA*. A.** (Izquierda) Western blot para RpoS en las cepas UW*rpoS*, UW136, UW*dksA* y UW*relA* en fase estacionaria. (Derecha) Cuantificación de la cantidad de RpoS relativa a la cepa silvestre en la cepa UW*dksA*. **B.** Estabilidad de la proteína RpoS después de la adición de 0.5mg/mL de Kanamicina. La cepa UW*ptsP* se empleó como control con un tiempo de vida medio disminuido.

7.4 DksA regula la expresión de *rpoS* a nivel transcripcional

La expresión de *rpoS* esta finamente regulada en diferentes especies bacterianas; en *A. vinelandii*, la regulación de *rpoS* sigue siendo objeto de estudio y debido a los resultados obtenidos anteriormente en la cepa UW*dksA* se decidió evaluar el efecto transcripcional que tiene DksA sobre *rpoS*.

La transcripción de *rpoS* inicia en dos promotores determinados experimentalmente por Cocotl-Yañez (Cocotl-Yañez et al., 2011), uno de ellos dentro de la región codificante del gen rio arriba (*nlpD*) y el segundo promotor inmediatamente después del codón de paro de *nlpD*. Evaluamos la secuencia codificante de *nlpD* y la región intergénica entre *rpoS* y *nlpD* mediante el software *Softberry (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb),* con el fin de identificar la presencia de algún otro promotor sigma 70. Como se esperaba, los dos promotores descritos fueron detectados por el análisis *in silico*, además de ello, un tercer posible promotor con secuencias -10 y -35 conservadas fue detectado dentro de la región codificante de *nlpD* rio abajo del primer promotor descrito (ahora denominado P1). Teniendo en cuenta esto, se denominaron los tres promotores como P1, P2 y P3 teniendo en cuenta su ubicación, siendo P1 el promotor más alejado del ATG de *rpoS,* en la región codificante de *nlpD* y P3 el promotor más cercano (Figura 10).

En la cepa UW*dksA* la transcripción de *rpoS* se encuentra disminuida en un 60% aproximadamente (Figura 11) con relación a la cepa silvestre UW136. La regulación transcripcional de DksA sobre *rpoS* en condiciones en las cuales los niveles de (p)ppGpp no se modifican ha sido descrita en especies de proteobacterias. Los resultados obtenidos en este estudio en *A. vinelandii* correlaciona con la disminución en la transcripción de *rpoS* en mutantes Δ*dksA* en cepas de *E. coli, Borrelia burgdorferi* y *Vibrio cholerae* (Basu et al., 2017; Boyle et al., 2021; Brown et al., 2002)

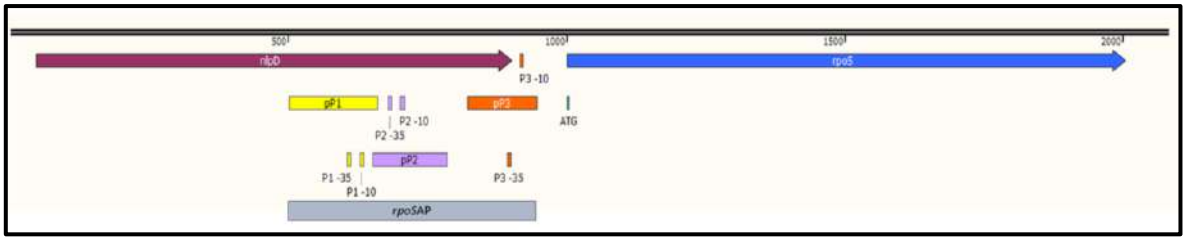


Figura 10. **Promotores de *rpoS* en *A. vinelandii.*** Las regiones señaladas como P1, P2 y P3 fueron utilizadas para la construcción de las fusiones transcripcionales. La región denominada *rpoS*AP integra toda la región reguladora.

Con el fin de evaluar la importancia de cada uno de los promotores para la transcripción de *rpoS* bajo las condiciones estudiadas, se construyeron fusiones transcripcionales de cada promotor fusionado al gen reportero *gusA*, obteniendo las cepas UW*rpoS::gusA*-P1, P2 y P3. Los resultados se resumen en la figura 11 en la cual se observa que el promotor P1 es el principal promotor de la transcripción de *rpoS* en la cepa silvestre, mientras que la actividad de los otros dos promotores es considerablemente menor (Figura 11 y 12).

Se utilizaron las construcciones anteriores para evaluar el efecto de la mutación en *dksA* sobre la actividad de estos promotores, para lo cual se construyeron las cepas UW*dksA/rpoS::gusA*-P1, P2 y P3 y se compararon con la actividad de la cepa silvestre. El promotor P1 en la cepa UW*dksA* presenta una menor actividad transcripcional durante los diferentes estadios de crecimiento (Figura 11). La actividad de los promotores P2 y P3 tambien fue determinada en la cepa UW*dksA*, se observó que estos dos promotores tenían un aumento en la actividad transcripcional en esta cepa; sin embargo, debido a la poca actividad de estos dos promotores en las condiciones estudiadas no se consideró relevante dicho incremento (Figura 12).

Así mismo, se construyeron las cepas UW*rpoS::gusA*-AP y UW*dksA*/*rpoS::gusA*-AP, las cuales contenían toda la región promotora de *rpoS*. Como se observa en la figura 11, la actividad de esta construcción en la cepa UW*dksA* disminuye hasta en un 80% con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados concuerdan con la cantidad de transcrito determinado por RT-qPCR en esta cepa, lo cual nos lleva a

proponer que la presencia de toda la región 5´UTR del transcrito de *rpoS* podría ser blanco de regulación de otros mecanismos como se ha descrito en otras especies y que debido a esto existe una diferencia en evaluar la región promotora completa y cada promotor individualmente.

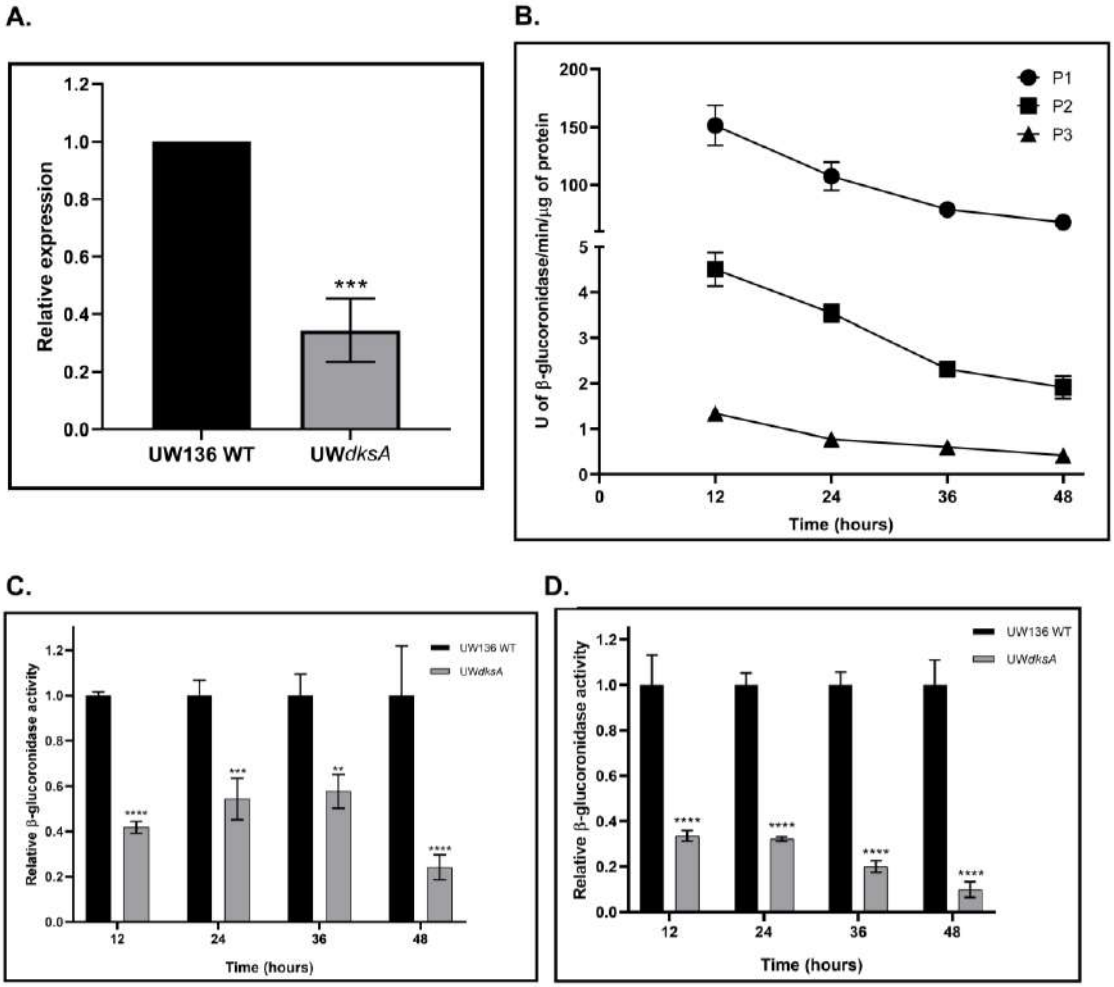


Figura 11. **DksA afecta la transcripción y la actividad de los promotores de *rpoS*. A.** Expresión relativa de *rpoS* con respecto a la cepa UW136 determinado a partir de ensayos de RT-qPCR. **B.** Actividad transcripcional de los tres promotores de *rpoS* individualmente en la cepa silvestre UW136. **C.** Actividad relativa del promotor P1 en la cepa UW*dksA* en comparación con la cepa UW136. **D.** Actividad relativa de toda la región promotora de *rpoS*AP::gusA en la cepa UW*dksA* en comparación con la cepa UW136.

La regulación de la expresión de *rpoS* en especies como *E. coli* y *Pseudomonas sp*., involucra sistemas complejos tanto a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. En especies de *Pseudomonas* la especialización del regulón RpoS se ha asociado a la expresión de factores de virulencia, colonización

y regulación en respuesta a densidad celular, teniendo un papel menos importante en la respuesta a estreses ambientales (Venturi, 2003).

En *E. coli*, el transcrito de *rpoS* presenta un fragmento 5´UTR de 567pb, el cual es blanco de regulación de diferentes factores como las proteínas Hfq y H-NS y los pequeños ARNs DsrA, RprA y OxyS. Estas moléculas regulan la estabilidad del transcrito, por consiguiente, regulan la cantidad de RpoS durante diferentes estadios de crecimiento o condiciones de estrés (Venturi, 2003). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la actividad del promotor P1 y el inicio de transcripción de *rpoS* reportado por Cocotl-Yañez (Cocotl-Yañez et al., 2011), el transcrito de *rpoS* en *A. vinelandii* presentaría, bajo las condiciones evaluadas, una región 5´UTR de 367pb, la presencia de esta región en las fusiones transcripcionales en la cepa UW*dksA* disminuyó marcadamente la transcripción del gen reportero en comparación con la cepa silvestre y con las construcciones de los promotores individuales, lo cual nos sugiere que, en ausencia de DksA, la estabilidad de este transcrito disminuye, por tanto su expresión. Si alguno de los mecanismos descritos en *E. coli* están presentes en *A. vinelandii* y si estos pueden ser regulados por DksA es un interesante campo de estudio.

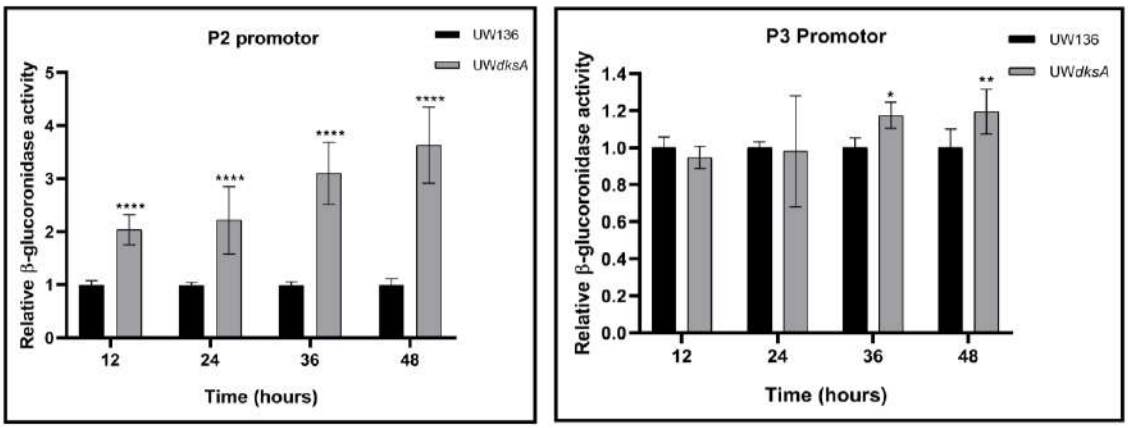


Figura 12. **Efecto de la mutación en *dksA* sobre los promotores P2 y P3 de *rpoS*.**

7.5 La complementación con una copia adicional de *rpoS* no restaura la síntesis de PHB en la cepa UW*dksA.*

El efecto de la mutación en *dksA* sobre la expresión de *rpoS* fue demostrado en los experimentos anteriores y nos permitió preguntarnos si el fenotipo sobre la síntesis de PHB depende principalmente del efecto de DksA sobre la expresión de RpoS; se decidió entonces evaluar si la complementación de la cepa UW*dksA* con una copia del gen *rpoS* bajo un promotor constitutivo (promotor del gen *gyrA*) restauraría la síntesis de PHB.

Para comprobar esta hipótesis se construyó la cepa UW*dksA/rpoS*$^{+}$ y se evaluó la cantidad de transcrito de *rpoS, phbR* y *phbB* en comparación con la cepa mutante UW*dksA* y la cepa silvestre, como era de esperar, el transcrito y la proteína RpoS se restauraron a niveles similares de la cepa silvestre. Interesantemente, la complementación con *rpoS* restauró la expresión de *phbR* pero solo parcialmente la expresión de *phbB* y la producción de PHB con respecto a la cepa UW*dksA* (Figura 13).

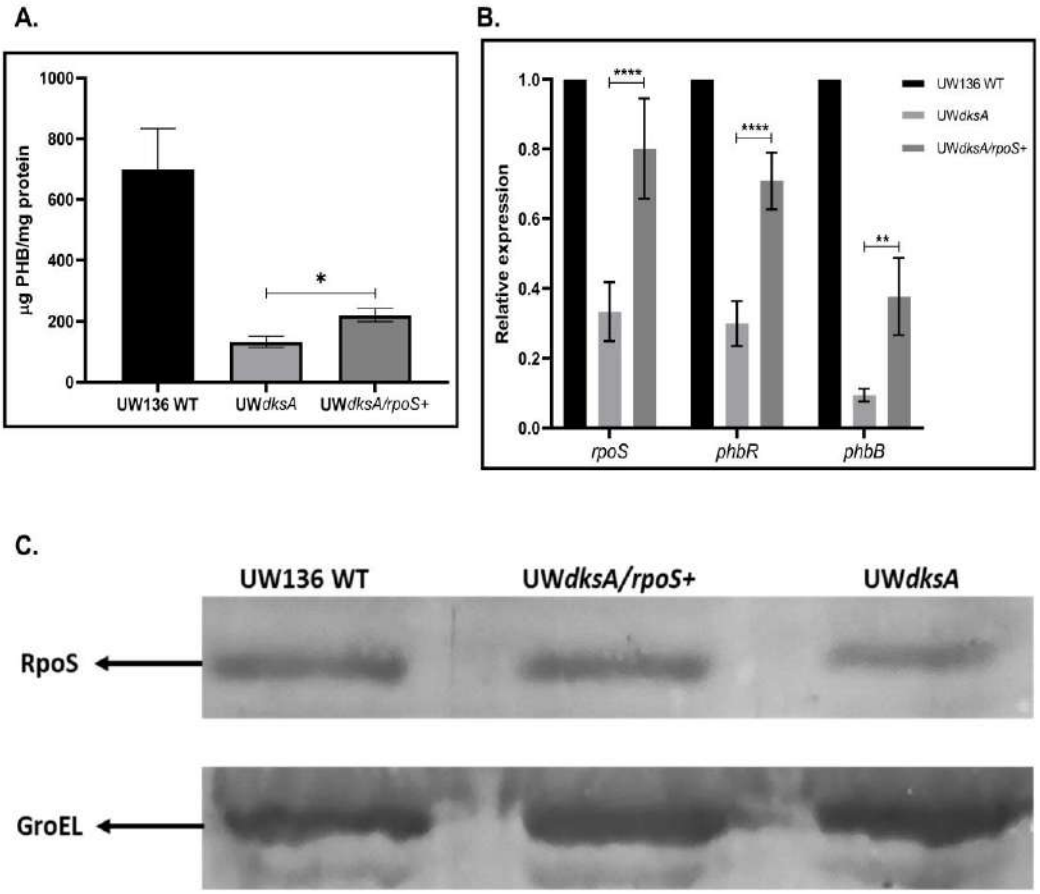


Figura 13. **DksA regula la síntesis de PHB a través de un mecanismo adicional independiente de *rpoS*. A.** Cuantificación de PHB. **B.** Expresión relativa en las cepas construidas con respecto a la cepa silvestre. **C.** Ensayo de Western blot anti-RpoS. Todos los experimentos fueron realizados a las 36h de incubación en medio PY.

La complementación de la cepa UW*dksA* con una copia adicional de *rpoS* no restauró la producción de PHB, la expresión de los genes *phbR* y *phbB* aumento, sin embargo, la expresión de *phbB* tan solo alcanzó un 40% de expresión en comparación con la cepa silvestre, lo cual nos lleva a proponer que DksA regula la síntesis de PHB a través de algún mecanismo independiente de RpoS y que puede estar actuando a nivel postranscripcional sobre estos genes y/o que afecta alguna otra ruta metabólica necesaria para la síntesis de PHB.

El papel pleiotrópico de la proteína DksA como regulador transcripcional ha sido ampliamente descrito en diferentes especies de gamma-proteobacterias. En *P.*

aeruginosa, DksA actúa como un regulador global de la transcripción de genes; es un represor de la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas ribosomales, rARNs y de genes del metabolismo de las poliaminas, mientras que activa la expresión de genes de *quorum sensing*, pilis, flagelo y de genes necesarios para el crecimiento en condiciones anaeróbicas, esto en presencia de niveles normales de (p)ppGpp (Min et al., 2020).

Se ha demostrado que DksA y (p)ppGpp modulan la expresión de algunos reguladores postranscripcionales; en *E. coli,* por ejemplo*,* se evidenció una correlación entre el sistema de regulación CsrA/CsrB-C y DksA/(p)ppGpp; este sistema se compone de la proteína (CsrA) que reconoce mARNs e impide su traducción y de los pequeños ARNs CsrB-C que reconocen esta proteína, la titulan y permiten la expresión de los transcritos a los cuales se une. Se demostró que DksA y (p)ppGpp regulan positivamente la transcripción de los pequeños ARNs CsrB-C, así mismo, CsrA reconoce el transcrito de *relA, dksA* y *rpoZ*, regulando su traducción; se plantea que, estos dos sistemas están interconectados y que regulan la actividad del otro, modificando la expresión de sus genes blanco bajo diferentes condiciones (Edwards et al., 2011). En *A. vinelandii* el homólogo del sistema CsrA-B-C, regula la síntesis de PHB a nivel postranscripcional (Hernandez-Eligio et al., 2012; Manzo et al., 2011); si existe una correlación entre este sistema y DksA/(p)ppGpp es un interesante campo de estudio que podría explicar el efecto postranscripcional observado en la mutante *dksA* sobre *phbR,* y que afectaría, por consiguiente la expresión de *phbB* y la síntesis de PHB.

Como se ha descrito, DksA es un regulador global de la transcripción de diversos genes dentro de las proteobacterias, por tanto, se decidió analizar el perfil transcripcional de la cepa UW*dksA* en comparación con la cepa silvestre, con el fin de encontrar blancos de regulación que pudieran ayudarnos a comprender mejor el mecanismo de regulación ejercido sobre la síntesis de PHB.

7.6 DksA es un regulador pleiotrópico en *A. vinelandii.*

La unión de la proteína DksA al canal secundario de la ARN polimerasa modifica estructuralmente el sitio activo de esta enzima, como consecuencia, DksA afecta el inicio de la transcripción de los genes que regula, más específicamente, DksA disminuye la estabilidad del complejo abierto necesario para el inicio de la transcripción, de esta manera, genes con complejos abiertos cortos e inestables, como los rARNs y las proteínas ribosomales, disminuyen su estabilidad en presencia de DksA unido a la ARN polimerasa, lo cual disminuye su expresión (Travis & Schumacher, 2022).

El efecto positivo o negativo de DksA sobre la transcripción de genes es difícil de predecir mediante análisis *in silico*, debido a que la regulación ejercida sobre los promotores es dependiente de la cinética del promotor y no de una secuencia o firma específica en el ADN como la mayoría de los factores transcripcionales. El uso de herramientas transcriptómicas como el ARN-seq, ha permitido identificar blancos de regulación de (p)ppGpp/DksA, lo cual ha facilitado establecer algunas características comunes en los promotores regulados por estos efectores; por ejemplo, la represión de promotores está asociada con una región discriminadora rica en residuos G+C, lo cual se asocia a un tiempo de vida corto del complejo abierto; sin embargo, aunque se observa que muchos de los genes promovidos contienen una región discriminadora rica en A+T, esto demostró no ser suficiente para predecir la activación de la transcripción y se propone que la regulación positiva puede ser estimulada por diferentes pasos durante la transcripción, como la estabilidad del complejo abierto, el escape de promotor y la disminución de los ARN abortivos (Gourse et al., 2018).

Se evaluó entonces el perfil transcripcional de la cepa UW*dksA* en comparación con la cepa silvestre a las 36 h de incubación bajo condiciones de síntesis de PHB (medio PY-sacarosa 2%). La secuenciación del ARN total fue comparado con el obtenido de la cepa silvestre UW136. Un total de 856 genes (aproximadamente 17% del total de genes de *A. vinelandii*) presentaron una expresión diferencial entre estas

dos cepas cuando se aplicó un punto de corte de ±1 *fold change, p-value* 0.05, lo cual se considera un cambio estadísticamente significativo entre una cepa y otra. Como se observa en la figura 14, un total de 389 genes son activados por DksA, mientras que actúa como represor de 467 genes bajo las condiciones estudiadas. Similar a otras gamma-proteobacterias, DksA es un regulador pleiotrópico de la transcripción en *A. vinelandii*, y su importancia no se limita únicamente a la expresión de genes durante la respuesta estricta; en cepas de *E. coli, Salmonella bongori* y *S. entérica* serovar Typhimurium, DksA regula un 25%, 15% y 20% del total de genes respectivamente, en condiciones en la cuales no hay inducción de la respuesta estricta (con un punto de corte de 2 veces la expresión de la cepa silvestre) (Cohen et al., 2022).

Se utilizó la base de datos KEEG-Pathway (*Kyoto Enciclopede of Genes and Genomes*) con el fin de observar los procesos celulares enriquecidos en la mutante *dksA* los cuales cambiaron diferencialmente su expresión. Los resultados se resumen en la figura 14. Interesantemente, la mayoría de los genes se agruparon en dos procesos celulares principalmente, uno denominado como “Procesamiento de Información Genética” y otro denominado como “Metabolismo”.

Un acercamiento de estas dos categorías permite observar que en ellas se agrupan una serie de rutas metabólicas centrales para el ciclo de vida de los microorganismos. La categoría de “Metabolismo” abarca procesos como la glicolisis, el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA), el ciclo de las pentosas, entre otros. Así mismo la categoría de “Procesamiento de información genética” está compuesta por procesos como la traducción, replicación y reparación del ADN, transcripción, entre otros (ver Figura 15). La importancia de la regulación génica por DksA bajo condiciones que no promueven la respuesta estricta ha sido descrita en varias especies de proteobacterias. Como se mencionó anteriormente, durante el crecimiento en un medio rico, DksA regula la expresión del 25% de los genes de *E. coli*, de estos, 589 genes son reprimidos y 517 son activados. De manera similar, en *S. bongori* se regulan positivamente 200 genes y se reprimen 409 genes y en *S.*

Typhimurium 558 genes son reprimidos por DksA y 359 son activados (Cohen et al., 2022).

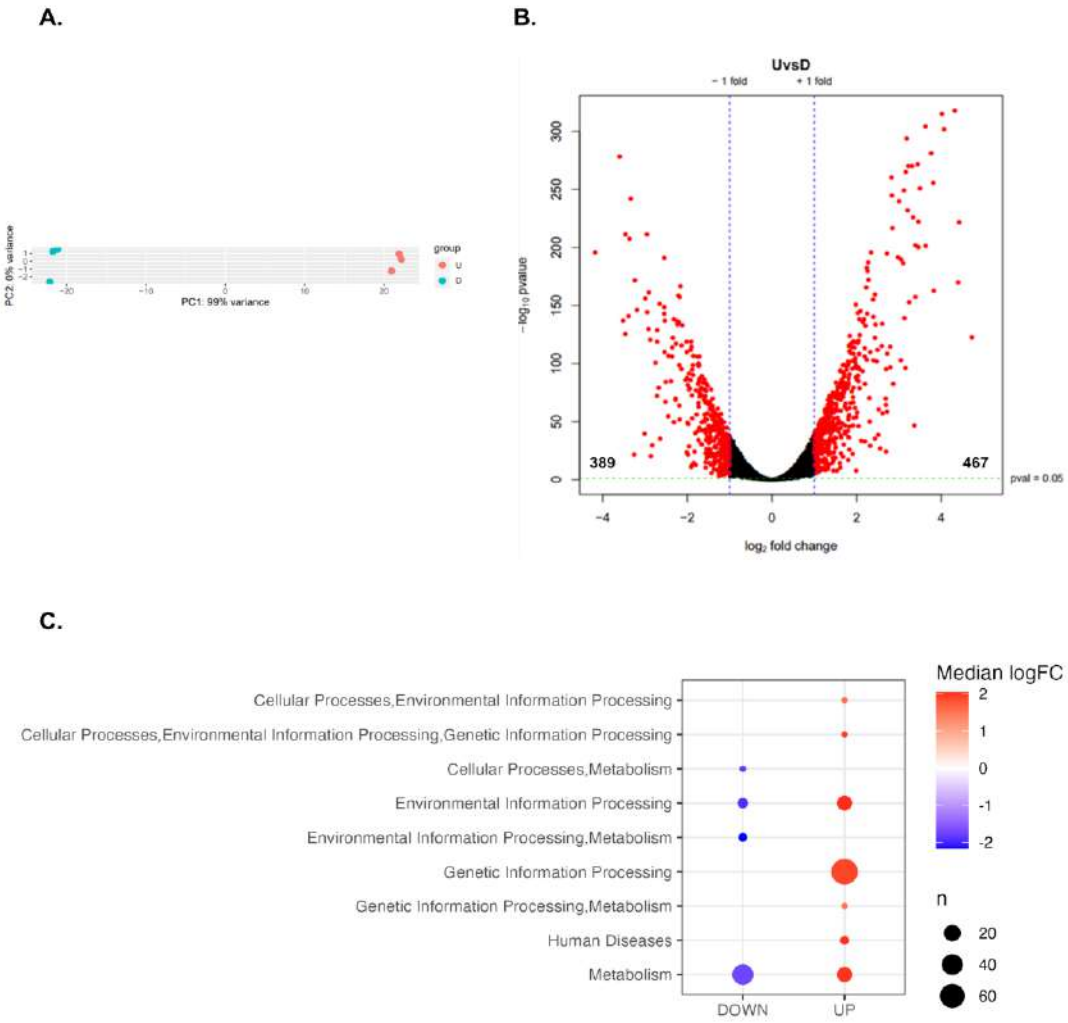
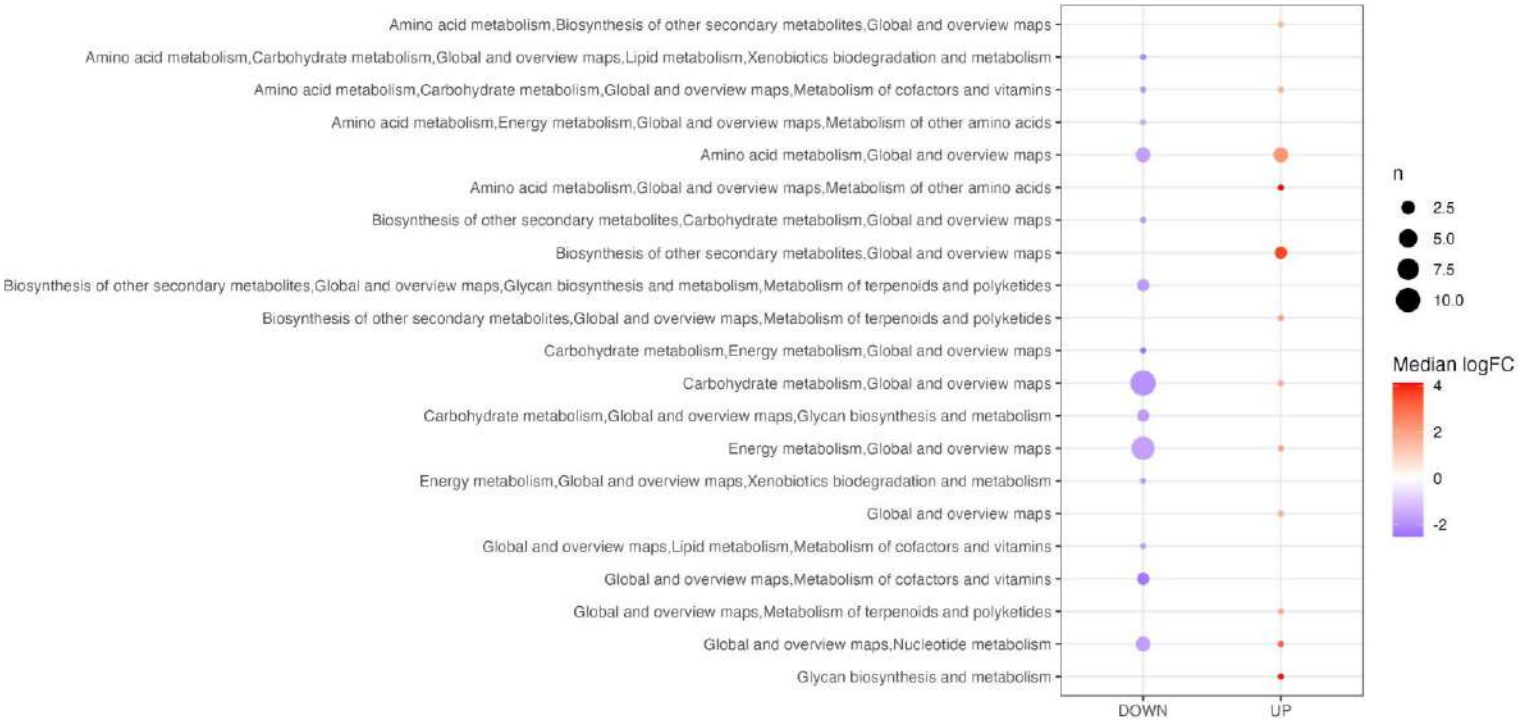


Figura 14. **Expresión diferencial de genes en la cepa UW*dksA* con respecto a la cepa silvestre. A.** Análisis de componentes principales que muestra una agrupación entre los triplicados biológicos y las dos cepas estudiadas. **B**. Volcano-plot de los genes expresados diferencialmente con respecto a la cepa UW136 con punto de corte *log_2 fold change* ±1 y p-value de 0.05. 389 genes disminuyeron su expresión y 467 la aumentaron. **C.** Procesos celulares de *A. vinelandii* donde se agruparon la mayoría de los genes que cambiaron su expresión en la cepa UW*dksA*. Los colores indican el cambio en la expresión mientras que el tamaño de la circunferencia indica el número de genes agrupados.


Amino acid metabolism,Biosynthesis of other secondary metabolites,Global and overview maps
Amino acid metabolism,Carbohydrate metabolism,Global and overview maps,Lipid metabolism,Xenobiotics biodegradation and metabolism
Amino acid metabolism,Carbohydrate metabolism,Global and overview maps,Metabolism of cofactors and vitamins
Amino acid metabolism,Energy metabolism,Global and overview maps,Metabolism of other amino acids
Amino acid metabolism,Global and overview maps
Amino acid metabolism,Global and overview maps,Metabolism of other amino acids
Biosynthesis of other secondary metabolites,Carbohydrate metabolism,Global and overview maps
Biosynthesis of other secondary metabolites,Global and overview maps
Biosynthesis of other secondary metabolites,Global and overview maps,Glycan biosynthesis and metabolism,Metabolism of terpenoids and polyketides
Biosynthesis of other secondary metabolites,Global and overview maps,Metabolism of terpenoids and polyketides
Carbohydrate metabolism,Energy metabolism,Global and overview maps
Carbohydrate metabolism,Global and overview maps
Carbohydrate metabolism,Global and overview maps,Glycan biosynthesis and metabolism
Energy metabolism,Global and overview maps
Energy metabolism,Global and overview maps,Xenobiotics biodegradation and metabolism
Global and overview maps
Global and overview maps,Lipid metabolism,Metabolism of cofactors and vitamins
Global and overview maps,Metabolism of cofactors and vitamins
Global and overview maps,Metabolism of terpenoids and polyketides
Global and overview maps,Nucleotide metabolism
Glycan biosynthesis and metabolism
DOWN
UP
n
2.5
5.0
7.5
10.0
Median logFC
4
2
0
-2

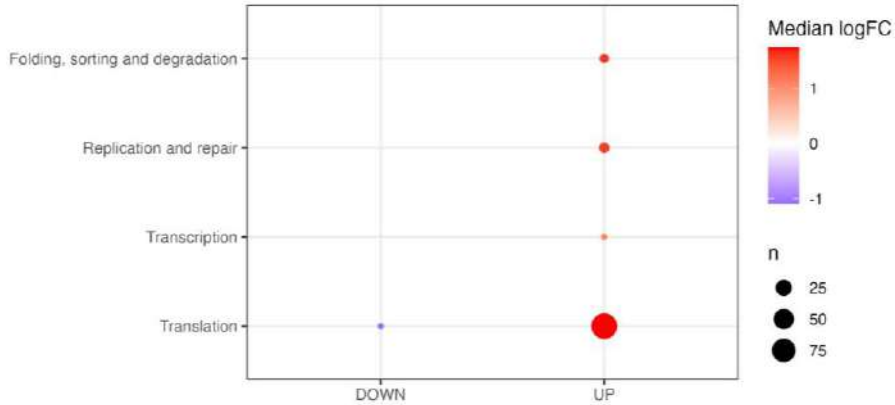

Folding, sorting and degradation
Replication and repair
Transcription
Translation
DOWN
UP
Median logFC
1
0
-1
n
25
50
75

Figura 15. Las vías denominadas como "Metabolismo" y "Procesamiento de información genética" presentaron mayor variabilidad en la cepa UW*dksA*. A. Rutas metabólicas contenidas en la categoría de "Metabolismo". Un mismo gen puede estar descrito en más de una ruta. **B.** Procesos celulares contenidos en la categoría "Procesamiento de información genética". Todos los genes presentaron *fold change de ±1 y p-value 0.05*. El color representa el cambio en la expresión comparado con la cepa silvestre y el tamaño de la circunferencia indica al número de genes que cambiaron su expresión dentro del mismo proceso celular.

Interesantemente, se describe un grupo común de 76 genes regulados en estas tres especies por DksA, de ellos 20 genes son regulados positivamente, 50 negativamente y 6 fueron regulados de manera opuesta entre *E. coli* y las especies de *Salmonella*; este grupo común está compuesto por genes involucrados en las vías KEGG de Metabolismo, Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de pirimidinas, *quorum sensing*, glicolisis, ensamble de flagelo y TCA (Cohen et al., 2022). Nuestros resultados demuestran que algunas de estas rutas metabólicas también son blanco de regulación de DksA en *A. vinelandii*, ya que varios genes de rutas como la glicólisis, la síntesis de metabolitos secundarios y el TCA son blanco de regulación por DksA. Esto nos lleva a proponer que puede existir un grupo de genes ancestralmente regulados por DksA que se ha conservado durante la divergencia de las especies.

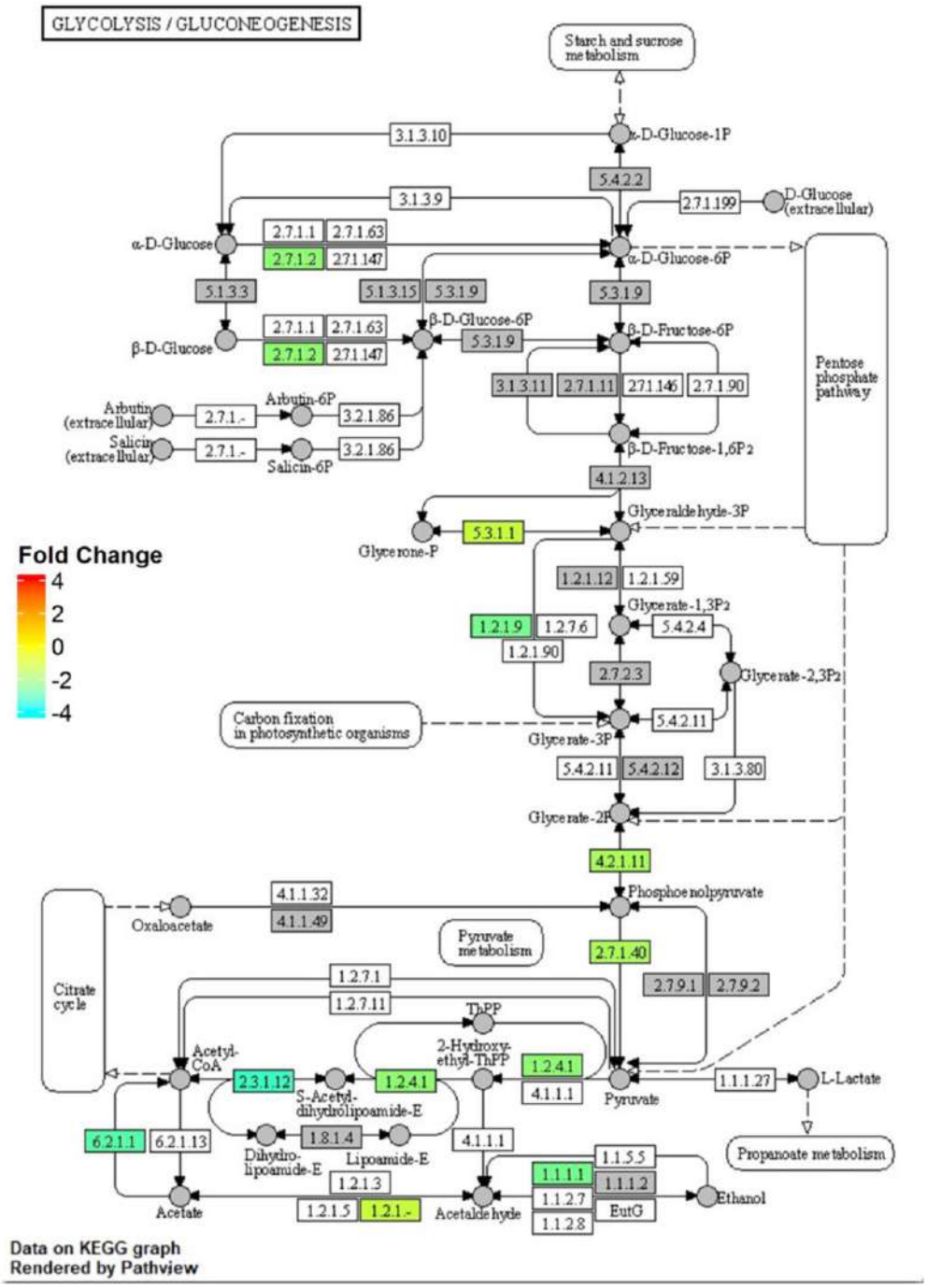
La especialización de DksA como regulador de la transcripción de cierto grupo de genes se ha descrito en diversas especies y fenotipos. Por ejemplo en *P. aeruginosa,* mediante el uso de microarreglos demostró que DksA tiene efectos pleiotrópicos ya que regula la expresión de genes involucrados en la síntesis de flagelo, pilis, *quorum sensing* y genes necesarios para la denitrificación un proceso vital para la respiración anaeróbica (Min et al., 2020). Además, en especies de *Salmonella*, se demostró que DksA es un activador de las islas de patogenicidad, en especial de la isla SPI-1 (Cohen et al., 2022). Estos resultados, en conjunto con nuestras observaciones, sugieren que DksA juega un papel importante como regulador de la transcripción en condiciones no estrictas, que es capaz de regular

genes y vías de metabolismo central y que además de manera directa y/o indirecta regula una variedad de fenotipos especializados en diferentes especies.

El ciclo del PHB en *A. vinelandii* es un proceso finamente regulado tanto a nivel genético como a nivel metabólico. El flujo de nutrientes y el estado metabólico de la célula determinan la dirección del ciclo entre la síntesis y la degradación. Como se describió anteriormente, cofactores como fosfoenolpiruvato, piruvato, Acetil-CoA, NADPH, entre otros, son necesarios para promover o reprimir la actividad de las enzimas involucradas en este ciclo. Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar cómo se encontraban los genes en las rutas metabólicas donde se agrupan las enzimas importantes para la acumulación de estos precursores en la cepa UW*dksA*, como se observa en la figura 16.

La glicolisis y el metabolismo del piruvato son las rutas que facilitan la acumulación de precursores como el fosfoenolpiruvato, piruvato y Acetil-CoA, por lo tanto, se utilizó el mapa metabólico disponible en KEGG Pathway para evaluar el perfil de expresión de los genes que hacen parte de estas rutas en la cepa UW*dksA*. Como se observa en la figura 17, el 60% y el 46% de los genes de la glicolisis y del metabolismo del piruvato respectivamente cambiaron su expresión en la cepa UW*dksA*. La mayoría de los genes se encuentran disminuidos (50% y 35% de la glicolisis y piruvato respectivamente) mientras que otro gran porcentaje no cambia su expresión (Figura 17).

A.


GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS
Starch and sucrose metabolism
α-D-Glucose-1P
3.1.3.10
5.4.2.2
3.1.3.9
2.7.1.199
D-Glucose (extracellular)
α-D-Glucose
2.7.1.1
2.7.1.63
2.7.1.2
2.7.1.147
α-D-Glucose-6P
5.1.3.3
5.1.3.15
5.3.1.9
β-D-Glucose
β-D-Glucose-6P
β-D-Fructose-6P
Pentose phosphate pathway
3.1.3.11
2.7.1.11
2.7.1.146
2.7.1.90
Arbutin (extracellular)
2.7.1.-
Arbutin-6P
3.2.1.86
Salicin (extracellular)
Salicin-6P
β-D-Fructose-1,6P2
4.1.2.13
Glyceraldehyde-3P
Glycerone-P
5.3.1.1
Fold Change
4
2
0
-2
-4
1.2.1.12
1.2.1.59
Glycerate-1,3P2
1.2.1.9
1.2.7.6
5.4.2.4
1.2.1.90
2.7.2.3
Glycerate-2,3P2
Carbon fixation in photosynthetic organisms
5.4.2.11
Glycerate-3P
5.4.2.11
5.4.2.12
3.1.3.80
Glycerate-2P
4.2.1.11
Phosphoenolpyruvate
4.1.1.32
4.1.1.49
Oxaloacetate
Pyruvate metabolism
2.7.1.40
Citrate cycle
1.2.7.1
1.2.7.11
2.7.9.1
2.7.9.2
ThPP
Acetyl-CoA
2-Hydroxy-ethyl-ThPP
2.3.1.12
1.2.4.1
1.2.4.1
4.1.1.1
Pyruvate
1.1.1.27
L-Lactate
S-Acetyl-dihydrolipoamide-E
6.2.1.1
6.2.1.13
1.8.1.4
4.1.1.1
Dihydro-lipoamide-E
Lipoamide-E
Propanoate metabolism
1.1.5.5
1.2.1.3
1.1.1.1
1.1.1.2
1.1.2.7
EutG
Ethanol
Acetate
1.2.1.5
1.2.1.-
Acetaldehyde
1.1.2.8
Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

B.

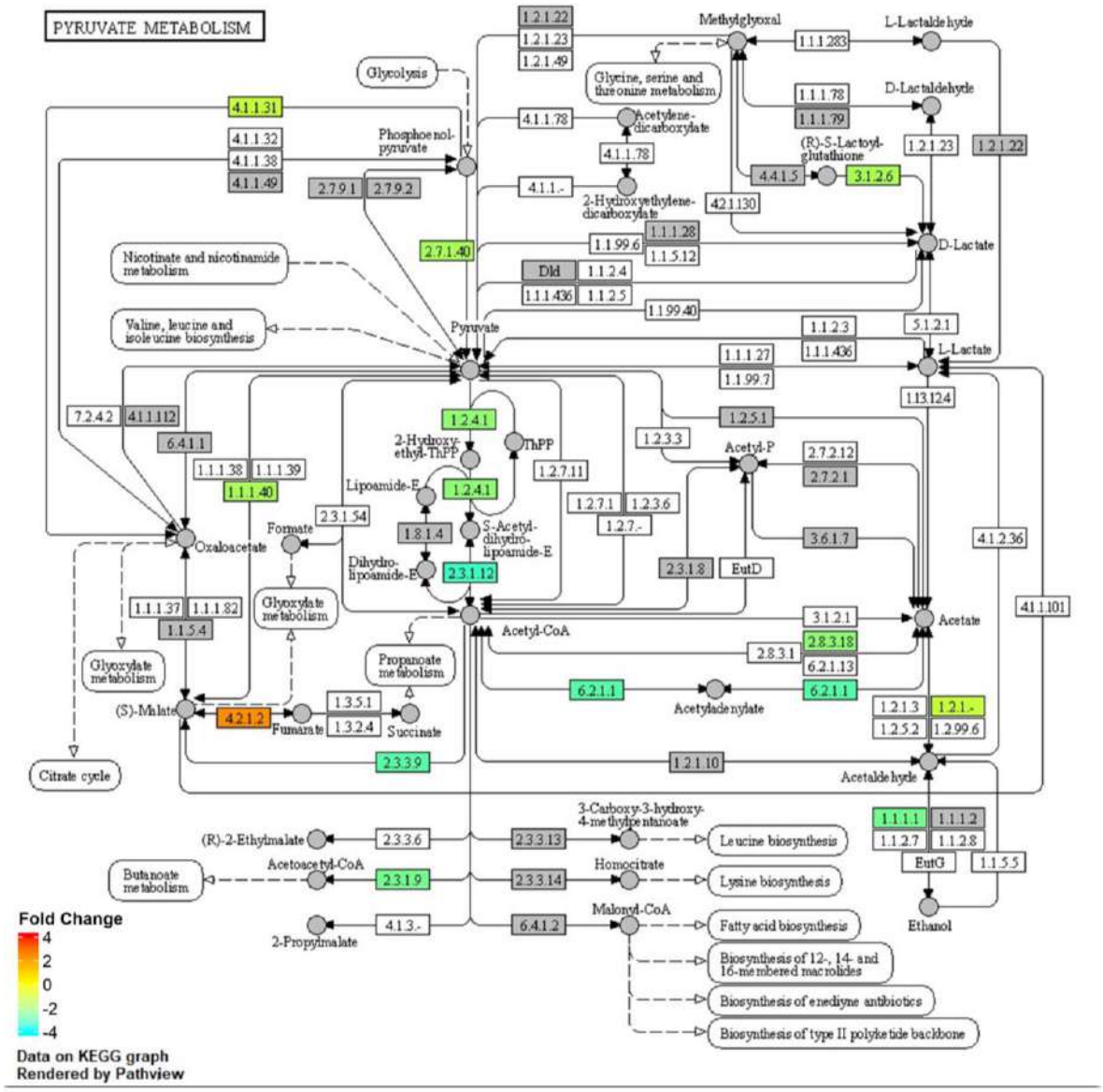


Figura 16. **DksA regula la transcripción de genes que codifican enzimas del metabolismo central de *A. vinelandii* las cuales producen algunos de los metabolitos necesarios para la síntesis de PHB. A.** Enzimas de la ruta de la glicolisis. **B.** Enzimas del ciclo del piruvato. La escala de colores demuestra la variación en los niveles de expresión en comparación con la cepa silvestre. Las enzimas marcadas en gris no cambiaron su expresión en la cepa UW*dksA*. Las enzimas marcadas en blanco no están descritas en *A. vinelandii,* pero se asocian a estas rutas en otros microorganismos.

Utilizando como referencia los mapas construidos, se confirmó mediante RT-qPCR la expresión de algunos de los genes que codifican para estas enzimas, que son

claves para la síntesis de estos precursores. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 17, en la cual se observa que, similar a los resultados de transcriptómica, la expresión de estas enzimas disminuye en comparación con la cepa silvestre bajo condiciones de síntesis de PHB (fase estacionaria en medio enriquecido).

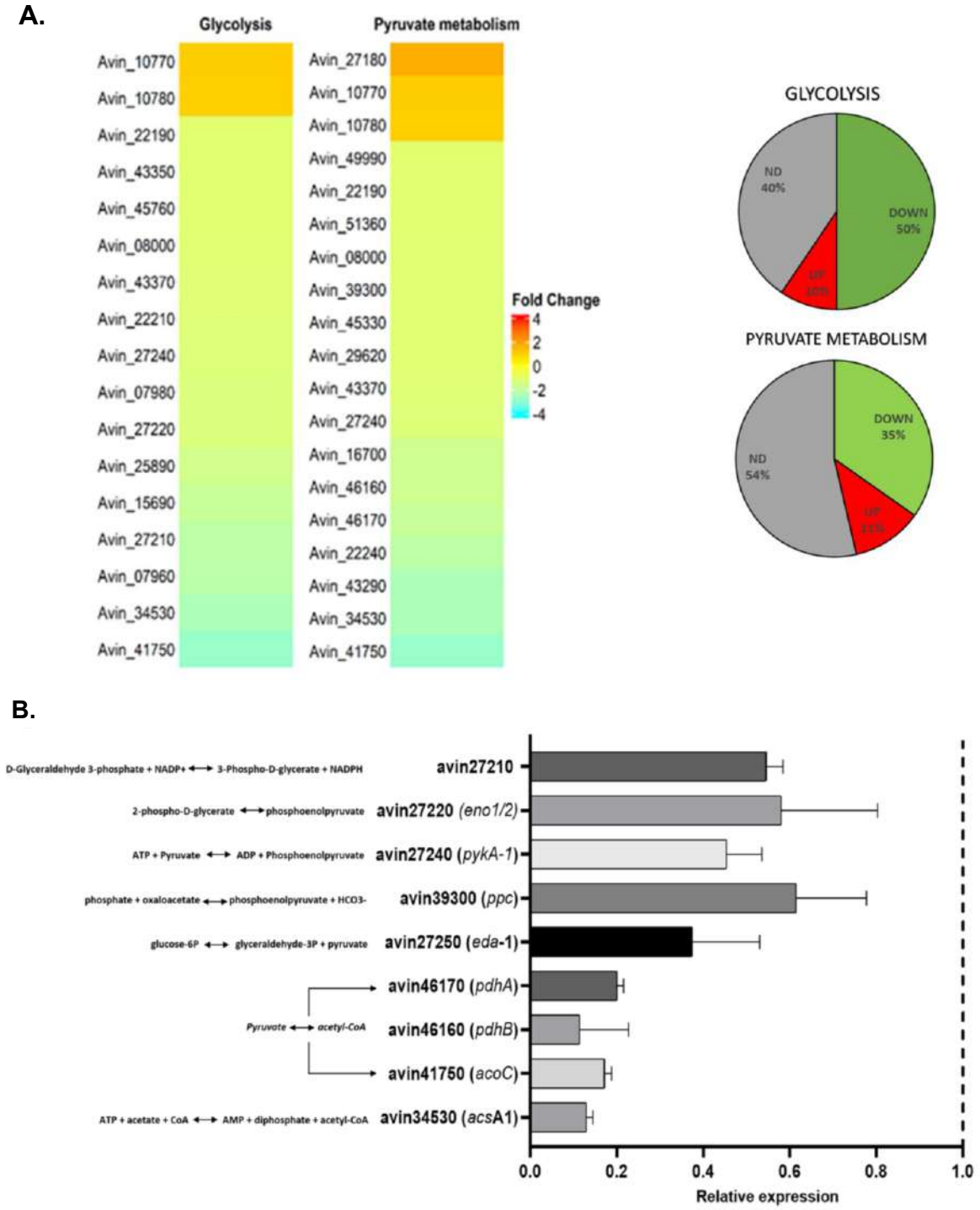


Figura 17. **DksA regula la expresión de las principales enzimas que producen los precursores necesarios para la síntesis de PHB. A.** Izquierda: Mapa de calor de los genes regulados por DksA dentro de la glicolisis y el metabolismo del piruvato. Derecha: Porcentaje del total de genes de cada ruta que variaron su expresión en la cepa UW*dksA*. **B.** RT-qPCR de los genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de los precursores de PHB. Los datos son el resultado de tres experimentos independientes.

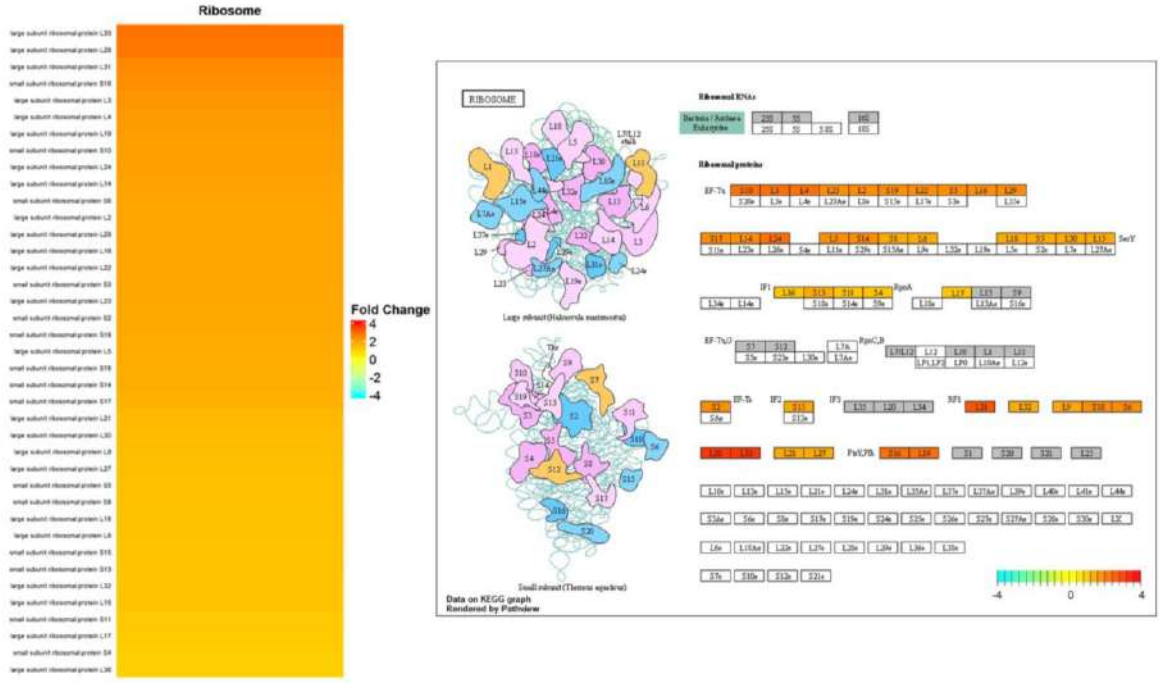


Figura 18. **DksA es un represor de los genes que codifican para las proteínas ribosomales.**

La ruta denominada “traducción” dentro de la base de datos KEGG involucra una serie de genes que codifican para las proteínas que hacen parte del ribosoma. Los resultados obtenidos en el transcriptoma de la cepa UW*dksA* demuestran que DksA actúa como represor de la expresión de las proteínas relacionadas con la biogénesis del ribosoma (Figura 18). En concordancia con este resultado, en *E. coli* y *P. aeruginosa* DksA actúa como represor de la transcripción de proteínas ribosomales en diferentes estadios de crecimiento e incluso en ausencia de condiciones de respuesta estricta; se demostró que existe sinergismo entre (p)ppGpp y DksA, lo cual aumentaba la afinidad de la unión a los promotores ribosomales (incluyendo

los rARNs) reprimiendo drásticamente su expresión durante la respuesta estricta (Lemke et al., 2011; Paul et al., 2004; Perron et al., 2005). Nuestros resultados sugieren un mecanismo similar de regulación por DksA aunque no podemos evaluar el efecto sobre los rARNs debido a que durante el proceso de preparación de la muestra para el ensayo de ARN-seq estos ARNs son depletados de la muestra.

7.7 Modelo de regulación de la síntesis de PHB dependiente de los efectores de la respuesta estricta.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el presente estudio, se construyó un modelo de regulación de la síntesis de PHB por los efectores de la respuesta estricta en *A. vinelandii*. DksA y (p)ppGpp son los efectores de la respuesta a privación de nutrientes; sin embargo, están involucrados en la regulación de algunos fenotipos incluso en ausencia de los detonantes conocidos para la respuesta estricta. En este estudio se demostró que, bajo condiciones no limitantes de nutrientes (condiciones de síntesis de PHB: exceso de carbono en un medio rico), los niveles de (p)ppGpp regulan la síntesis de PHB, a través principalmente de la actividad de la proteína RelA; la disminución de los niveles de este segundo mensajero (mutaciones en *relA* y *relA/spoT*) conlleva una reducción de la síntesis de PHB de manera independiente de RpoS, lo cual abre un nuevo campo de estudio sobre la relación que pudiera tener (p)ppGpp con otros mecanismos de regulación de la síntesis de PHB independientes de RpoS, algunos de los cuales han sido descritos en otras especies de bacterias.

Interesantemente, nuestros resultados demostraron que, la proteína de DksA actúa como un regulador global de la transcripción en *A. vinelandii*. La ausencia de esta proteína conllevó a una disminución en la expresión de RpoS por lo tanto a una disminución en la síntesis de PHB; sin embargo, el papel de DksA durante la síntesis de PHB parece no ser únicamente a través de RpoS. Adicionalmente, nuestros resultados de ARN-seq sugieren que, como en otros microorganismos, DksA regula directa o indirectamente la expresión de una gran cantidad de genes, incluso en

presencia de niveles normales de (p)ppGpp. Aquí nosotros demostramos que algunos de estos genes están involucrados en procesos celulares centrales como son la traducción, glicólisis, TCA y ciclo del piruvato, estos últimos necesarios para la síntesis de los precursores que anteceden y permiten la síntesis del biopolímero.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone que la disminución en la expresión de los genes del operón biosintético *phbBAC* (independiente de RpoS), la disminución en la expresión de RpoS y de las enzimas que sintetizan precursores necesarios para la síntesis de PHB, generan un efecto acumulativo que puede explicar la baja síntesis de este polímero en la cepa UWdksA,

La figura 19 resume nuestros hallazgos y deja entrever que la regulación de la síntesis de PHB es un proceso dependiente de la respuesta estricta y que los efectos de esta aún quedan por ser dilucidados en su totalidad.

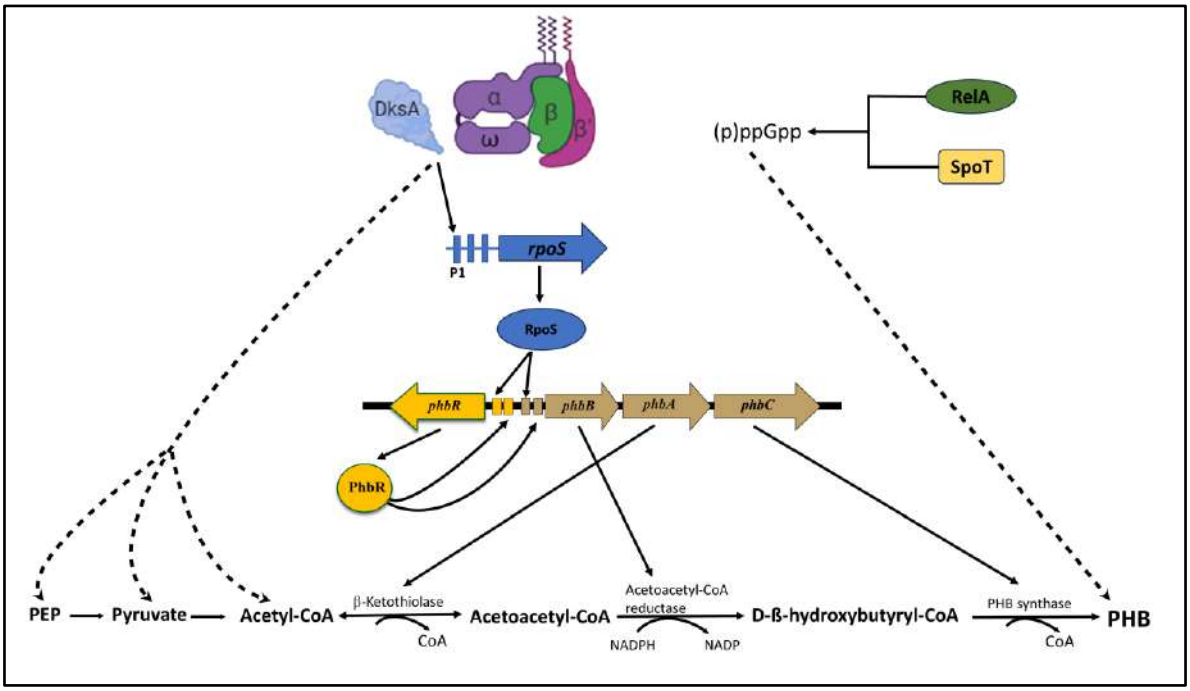


Figura 19. **Modelo propuesto de regulación de la síntesis de PHB por (p)ppGpp y DksA.** Niveles basales de (p)ppGpp son necesarios para la producción de PHB, cuando se reducen estos niveles, la síntesis del polímero disminuye de manera independiente de RpoS. DksA regula la síntesis de PHB en presencia de (p)ppGpp a través de al menos dos mecanismos; regula la expresión de RpoS y por consiguiente de sus genes blanco y regula enzimas del metabolismo central que disminuyen la biodisponibilidad de los precursores necesarios para la síntesis de PHB.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla 2. Las condiciones de cultivo para *A. vinelandii* fue en medio Peptona-Extracto de levadura (medio PY) suplementado con 2% de sacarosa e incubado a 30°C. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (medio LB) a 37°C. Las concentraciones de antibiótico para la selección de las cepas de *A. vinelandii* fueron las siguientes: kanamicina (Km) 3µg/mL, gentamicina (Gm) 1µg/mL, tetraciclina (Tc) 30µg/mL y espectinomicina (Sp) 100µg/mL.

Table 1. Cepas y plásmidos usados durante este estudio.

Cepa	Características	Referencia
E. coli DH5 **α**	endA1 hsdR17 supE44 thi-1λ-recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15).	Hanahan, 1983
UW136	*A. vinelandii* cepa silvestre.	Bishop & Brill, 1977
UW*relA*	UW136 con una mutación *relA*::Km en sentido no polar.	Ortiz-Vasco, 2019
UW*relA/spoT*	UW136 con una mutación *relA*::Km y *spoT*::Gm en sentido no polar.	Ortiz-Vasco, 2019
UW*rpoZ*	UW136 con una mutación *rpoZ*::Gm en sentido no polar.	Este estudio
UW*dksA*	UW136 con una mutación *dksA*::Sp en sentido no polar.	Este estudio
UW*relA/dksA*	UW*relA* con una mutación *dksA*::Sp sentido no polar.	Este estudio
UW*dksA/dksA*$^{+}$	UW*dksA* con una copia cointegrada en el cromosoma del plásmido pJETdksAAC-Km	Este estudio

UW*relA/relA*$^{+}$	UW*relA* con una copia del gen *relA* transcrito a partir del promotor *gyrA.*	Este estudio
UW*rpoS::gusA-P1*	UW136 con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P1 de *rpoS.*	Este estudio
UW*rpoS::gusA-P2*	UW136 con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P2 de *rpoS.*	Este estudio
UW*rpoS::gusA-P3*	UW136 con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P3 de *rpoS.*	Este estudio
UW*rpoS::gusA-AP*	UW136 con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir de toda la región promotora de *rpoS*.	Este estudio
UW*dksA/rpoS::gusA -P1*	UW*dksA* con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P1 de *rpoS.*	Este estudio
UW*dksA/rpoS::gusA -P2*	UW*dksA* con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P2 de *rpoS.*	Este estudio
UW*dksA/rpoS::gusA -P3*	UW*dksA* con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir del promotor P3 de *rpoS*.	Este estudio
UW*dksA/rpoS::gusA -AP*	UW*dksA* con la fusión *rpoS::gusA* transcrita a partir de toda la región promotora de *rpoS.*	Este estudio
UW*dksA*/*rpoS*$^{+}$	UW*dksA* con una copia adicional del gen *rpoS* recombinada en el genoma, expresada a partir del promotor constitutivo del gen *gyrA*.	Este estudio
Plásmidos		
pJET1.2	Vector de clonación pJET1.2 blunt.	Thermo Scientific
pBSL97	Plásmido con el casete de Kanamicina.	Alexeyev et al., 1995
pBSL98	Plásmido con el casete de Gentamicina.	Alexeyev et al., 1995
pHP45Ω	Plásmido con el casete de Espectinomicina.	Fellay et al., 1987

pUMATc	Plásmido pUC19 que contiene un fragmento de 1kb correspondiente al gen *melA* y un casete de resistencia a tetraciclina.	Cocotl-Yañez et al., 2014
pUMATcgusAT	Vector con una copia del gen *gusA* utilizado para las fusiones transcripcionales.	Muriel-Millán et al., 2015
pJET-gyrA	pJET1.2 con la región promotora del gen *gyrA.*	Fellay et al., 1987
pJETdks*A*	pJET con una copia del gen *dksA*.	Este estudio
pJETrpoZ	pJET con una copia del gen *rpoZ*.	Este estudio
pJETrpoZ::Gm	pJET con la mutación *rpoZ*::Gm.	Este estudio
pJETdksA::Sp	pJET con la mutación *dksA*::Sp.	Este estudio
pJETdksAC	pJET con una copia del gen *dksA* bajo su propio promotor.	Este estudio
pJETdksAC-Km	pJETdksAC con el casete de Km.	Este estudio
pJETrelAC	pJET con una copia del gen *relA*.	Este estudio
pJETgyrA-relAC	pJET-gyrA con una copia del gen *relA* del pJETrelAC.	Este estudio
pUMAgyrA-relA	Plásmido pUMA con una copia del gen *relA* transcrito a partir del promotor de *gyrA* provenientel del plásmido pJETgyrA-relAC.	Este estudio
pJETP1rpoS	pJET con el fragmento del promotor P1 de *rpoS*.	Este estudio
pJETP2rpoS	pJET con el fragmento del promotor P2 de *rpoS.*	Este estudio
pJETP3rpoS	pJET con el fragmento del promotor P3 de *rpoS*.	Este estudio
pJETAPrpoS	pJET con la región que abarca los promotores P1, P2 y P3 de *rpoS.*	Este estudio

pUMAP1rpoS::gusA	Plásmido pUMATcgusAT con la construcción de la fusión transcripcional *rpoS::gusA*P1.	Este estudio
pUMAP2rpoS::gusA	Plásmido pUMATcgusAT con la construcción de la fusión transcripcional *rpoS::gusA*P2.	Este estudio
pUMAP3rpoS::gusA	Plásmido pUMATcgusAT con la construcción de la fusión transcripcional *rpoS::gusA*P3.	Este estudio
pUMAAPrpoS::gusA	Plásmido pUMATcgusAT con la construccion de la fusion transcripcional *rpoS::gusA*AP.	Este estudio
pJETrpoS	pJET 1.2 con una copia del gen *rpoS*.	Este estudio
pJETgyrA-rpoS	Plásmido pJETgyrA con una copia del gen *rpoS*.	Este estudio
pUMAgyrA-rpoS	Plásmido pUMA con una copia del gen *rpoS* transcrito a partir del promotor de *gyrA*.	Este estudio

Tabla 2. Oligonucleótidos.

Oligonucleótidos		
dksA-Fw	CTG TAG GGC ATG GGC CTT CC	Este estudio
dksA-Rv	CGC ACG CAG GAT CAA CTG C	Este estudio
rpoZ-Fw	ACGGCCATTTGGCCCTTC	Este estudio
rpoZ-Rv	ATGCTGGCCAAGGACGCTC	Este estudio
rpoZ-Inter-Fw	CAGGAGCCGATCGGCAAG	Este estudio
rpoZ-Inter-Rv	GGAAGATAGCAACGAGGCCC	Este estudio
dksAC-Fw	GGATCCCGCGCGTGATCA	Este estudio
dksAC-Rv	TCTAGAGCAGGATCAACTGCCGAT	Este estudio
relAC-Fw XbaI	GGATCCATGGTACAGGTGAGAGCG	Este estudio
relAC-Rv BamHI	TCTAGATCTAGACGGCGTCAGGAAACCG	Este estudio
rpoS P1 Fw	TCTAGAGTGCACAGCCGGCGGTGT	Este estudio
rpoS P1 Rv	GAATTCACCGACCCATCAGACGCAG	Este estudio
rpoS P2 Fw	TCTAGAGATGGGTCGGTTGTGTAC	Este estudio
rpoS P2 Rv	GAATTCTTCACCTGTTGTCCTTCC	Este estudio
rpoS P3 Fw	TCTAGAACCGATCGGGTGAAGC	Este estudio
rpoS P3 Rv	GAATTCTTGGACACCCGAGCCCTTA	Este estudio
rpoS-Fw BamHI	GGATCCGCTCTCAATATAAAAGCAAAAGA AG	Este estudio
rpoS-Rv XbaI	TCTAGACATCTTTTTCACTGGAACAGC	Este estudio
qRT-rpoS Up	AGG ATG TCC TGG ACG ATG AG	Este estudio
qRT-rpos Down	TCC AGC GCC CTA GTG TAG TC	Este estudio
qRT-gyrA Up	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	Este estudio
qRT-gyrA Down	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	Este estudio
qRT-phbR Fw	CCACATGCGTTTGGTTTCTTG	Este estudio
qRT-phbR RV	TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC	Este estudio
qRT-phbB Fw	TCCGCAATCCAAACGCAAAG	Este estudio
qRT-phbB Rv	GTGCTCTCCGAACGGTTAC	Este estudio
qRT-avin27210 Fw	CGGATAGCTTTCCGTTCAACGG	Este estudio
qRT-avin27210 Rv	ATCAGCCGCTTGTTGTCGT	Este estudio
qRT-eno Fw	AGGACACCACCATCGCCG	Este estudio
qRT-eno Rv	TTGCCCTGCAAGGCCTCC	Este estudio
qRT-avin27240 Fw	ATGCTGCGTAGAACCAAGATC	Este estudio
qRT-avin27240 Rv	TGGGAGAAGTTCAGGCGCA	Este estudio
qRT-avin27250 Fw	CCG TGC TCG ACG AAA GCA	Este estudio
qRT-avin27250 Rv	GCA CCG GGC AGT TCA TCC	Este estudio
qRT-avin34530 Fw	CCA TCA TCT GGG AGG GCG AC	Este estudio
qRT-avin34530 Rv	CGC GAT GCA CGT CCT GAC	Este estudio
qRT-avin39300 Fw	CCG CAG ACG CAT TGG CC	Este estudio

8.2 Construcción de plásmidos y cepas mutantes.

Fragmentos de ADN correspondientes a los genes dksA (663pb) y rpoZ (435pb) fueron amplificados usando los oligonucleótidos dksA-Fw/dksA-Rv y rpoZ-Fw/rpoZ-Rv respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados dentro del vector pJET 1.2Blunt para generar los plásmidos pJETdksA y pJETrpoZ. El sitio de restricción *Sal*I dentro de la región codificante de *rpoZ* fue utilizado para insertar un casete de Gm obtenido del plásmido pBSL98. Un casete de Km obtenido del plásmido pHP45W-Km fue insertado dentro del sitio *Sma*I en la región codificante del gen *dksA.*

En *A. vinelandii*, la inserción de los casetes de Gm, Km or Sp en la misma orientación de la transcripción de los genes produce mutaciones no polares que no afectan la transcripción de los genes rio abajo (Mejía-Ruiz et al., 1997). Los plásmidos resultantes pJETrpoZ::Gm y pJETdksA::Sp fueron confirmados por PCR que llevaran los casetes clonados en la misma dirección de la transcripción del gen mutado. Estos plásmidos fueron digeridos con la enzima *Sca*I para ser linealizados y transformar así células competentes de la cepa silvestre UW136. La linealización de los plásmidos se lleva a cabo para evitar su cointegración en el cromosoma.

Células transformantes de UW*rpoZ* y UW*dksA* resistentes a Gm y Sp respectivamente fueron seleccionadas a partir de cultivos en medio BS suplementados con los respectivos antibióticos. Para la construcción de la doble mutante UW*relA/dksA* se utilizó el plásmido pJETdksA::Sp para transformar células competentes de la cepa UW*relA*. La presencia de todas estas mutaciones fue confirmada mediante PCR (datos no mostrados).

Para la construcción de la complementación UW*dksA*/*dksA*$^{+}$, un fragmento que contenía el gen *dksA* incluyendo su propio promotor fue amplificado usando los oligonucleótidos dksAC-Fw y dksAC-Rev, y fue clonado en el vector pJET1.2 para generar el plásmido pJETdksAC. Un casete de resistencia a Km fue introducido en el sitio de restricción *Sca*I (localizado dentro del plásmido pJET1.2), para generar el plásmido pJETdksAC-Km. Este plásmido es incapaz de replicarse en *A. vinelandii*,

se cointregra en el genoma por un único evento de recombinación sencilla y fue utilizado para transformar células competentes de la cepa UW*dksA*. Se seleccionaron clonas resistentes a Sp/Km.

Para la construcción de la cepa UW*relA/relA*$^+$, un fragmento de 2273 pb fue amplificado usando lo oligonucleótidos relAC-Fw-XbaI y relAC-Rev-BamHI y fue clonado dentro del vector pJET1.2 para generar el plásmido pJETrelAC. El fragmento producido por la digestión con las enzimas *Xba*I-*BamH*I (de un único sitio de corte cada una) fue clonado dentro del plásmido pJETgyrA corriente abajo y en la misma dirección que el promotor p*gyrA* generando el plásmido pJETgyrA-relAC. Un fragmento correspondiente a la digestion de este plásmido con la enzima *Bgl*II contenia la fusion p*gyrA-relA* fue clonado dentro del plásmido PUMA-Tc el cual contiene un sitio de recombinación del gen *melA* de *A. vinelandii* que ha sido descrito y usado como un sitio neutral para insertar genes o fusiones de genes dentro del cromosoma de *A. vinelandii* (Bali et al., 1992; Brigham et al., 2012). El plásmido resultante PUMAgyrA-relA fue linealizado y transformado por un evento de doble recombinación homologa en el gen *melA*, dentro de células competentes de la cepa UW*relA* y seleccionadas por su resistencia a Tc, generando así la cepa UW*relA/relA*$^+$.

Para la construcción de la cepa UW*dksA/rpoS*$^+$ se emplearon los oligonucleótidos *rpoS-BamH*I Fw and *rpoS-Xba*I Rv los cuales amplificaban un fragmento de 1022 pb que contenía el gen *rpoS,* este fragmento fue clonado dentro del vector pJET1.2, generando el plásmido pJET*rpoS*. El fragmento correspondiente a la digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I que contenía el gen *rpoS* fue clonado corriente abajo y en la misma dirección del promotor *pgyrA* del vector pJET*gyrA* (Muriel-Millán et al., 2015), generando el plásmido pJET*gyrA-rpoS*. Un fragmento, producto de la digestión con la enzima *Bgl*II el cual contenía la fusión p*gyrA-rpoS* fue obtenido a partir del plásmido anterior y fue insertado en el plásmido pUMA-Tc y recombinado en el gen *melA* de *A. vinelandii* (Bali et al., 1992), produciendo el plásmido pUMA*gyrA-rpoS*. Este plásmido se linealizó con la enzima *Sca*I y se usó para transformar células competentes de la cepa UW*dksA*; se aislaron candidatas

resistentes a Tc obteniendo así la cepa UW*dksA/rpoS*$^{+}$, que expresa una copia adicional del gen *rpoS* transcrita a partir del promotor gy*rA*.

Para la construcción de las fusiones transcripcionales se utilizó como gen reportero el gen *gusA* para determinar actividad de glucoronidasa. Los promotores de rpoS P1 (171pb), P2 (145pb) y P3 (137pb) fueron obtenidos por PCR utilizando los oligonucleótidos rpoS-P1-Fw/rpoS-P1-Rv, rpoS-P2-Fw/rpoS-P2-Rv y rpoS-P3-Fw/rpoS-P3-Rv. Los oligonucleótidos rpoS-P1-Fw y rpoSP3-Rv se utilizaron para amplificar un fragmento de 457pb que contienen los tres promotores de rpos (*rpoS*AP). Estos fragmentos fueron clonados dentro del vector pJET 2.1 para generar los plásmidos pJETP1rpoS, pJETP2rpoS, pJETP3rpoS y pJETAPrpoS respectivamente. Estos fragmentos fueron secuenciados y posteriormente digeridos con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI con sitios únicos agregados en el oligonucleótido. Los productos de la digestión con *Xba*I-*Eco*RI fueron clonados dentro del vector pUMATc*gusA*T (Muriel-Millán et al., 2015) generando los plásmidos pUMAP1rpoS::*gusA*, pUMAP2rpoS::*gusA,* pUMAP3rpoS::*gusA*, y pUMAAPrpoS::*gusA,* estos plásmidos fueron linealizados en el sitio único de corte de la enzima *Sca*I y fueron usados para transformar las cepas de *A. vinelandii* UW136. Las candidatas fueron seleccionadas por resistencia a Tc obteniendo así las cepas UW*rpoS::gusA*-P1, UW*rpoS::gusA*-P2, UW*rpoS::gusA*-P3 y UW*rpoS::gusA*-AP. De la misma manera, estos plásmidos fueron usados para transformar células competentes de la cepa UW*dksA* para generar las cepas UW*dksA/rpoS::gusA*P1, UW*dksA/rpoS::gusA*P2, UW*dksA/rpoS::gusA*P3 y UW*dksA/rpoS::gusA*AP. La integración de estas construcciones por doble recombinación fue confirmada por PCR.

8.3 Transformación de células de *A. vinelandii*.

Para la transformación de cepas *A. vinelandii* con los diferentes plásmidos construidos se empleó la técnica descrita por Bali et al., 1992. En resumen, las células de *A. vinelandii* se crecen toda la noche en medio Burk sin la adición de las sales de hierro y molibdato, lo cual genera células competentes capaces de introducir ADN exógeno. Alícuotas de estas células son mezcladas con los

plásmidos correspondientes y son incubadas por otras 24 horas a 30°C en el mismo medio Burk modificado. Las transformantes obtenidas son entonces plateadas en medio selectivo con el antibiótico correspondiente.

8.4 Medición de actividad de β-glucoronidasa.

La actividad de β-glucoronidasa fue determinada según se describe en (Wilson et al., 1995). 1U de actividad se define como 1 nmol of *p-nitrofenil-β-D-glucoronido* hidrolizado por minuto por miligramo de proteína total y los resultados fueron representados en algunos experimentos como actividad relativa con respecto a los valores obtenidos de la cepa UW136. El valor de proteína fue determinado por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

8.5 Ensayo de Western-blot.

La detección de los niveles de RpoS se determinó en las diferentes cepas de *A. vinelandii* a las 36 horas de crecimiento en medio PY liquido a 30°C, el ensayo se llevó a cabo como se describe en Muriel-Millán et al., 2015. Para la determinación de la estabilidad de RpoS in vivo, las células crecieron como se describió, y seguidamente la síntesis de proteínas se bloqueó por la adición de Kanamicina a una concentración de 0.5 mg/mL. Los niveles relativos de proteína fueron determinados con respecto a la cepa silvestre y medidos por densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

8.6 Análisis *in silico.*

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos para los genes *dksA* y *rpoZ* de *A. vinelandii fueron obtenidos de la base de datos* KEGG. Los alineamientos de

secuencias de nucleótidos fueron realizados en el software NCBI-BLAST *(Basic Local Alignment Search tool)* usando como referencia el genoma de *A. vinelandii* (NCBI ID 322710) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Alineamientos y conservación de secuencias de proteínas fueron analizadas usando la herramienta Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

8.7 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real RT-qPCR.

Los experimentos de RT-qPCR fueron realizados a partir de ARN total extraído de las diferentes cepas de *A. vinelandii* crecidas en medio PY líquido a las 36 horas a 30°C. Las muestras de ARN fueron extraídas mediante el kit *TRIzol™ Max™ Bacterial RNA Isolation* (Thermo Scientific) según indicaciones del producto. La calidad y cantidad del material extraído fue determinado mediante *Nanodrop One*^{C} (Thermo Scientific). Un total de 2µg de ARN total fueron tratados con la enzima *DNAse* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del producto con el fin de eliminar el ADN contaminante proveniente de la extracción. Para la síntesis de cADN se empleó el kit *Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific) y los oligonucleótidos reversos de los genes correspondientes descritos en la tabla 2. Un experimento de PCR de tiempo final fue realizado para cada cADN con el fin de corroborar su correcta síntesis. Una vez obtenidos los cADN, se utilizó el equipo *LightCycler480 System* (Roche Diagnostics) y el reactivo SyBR-Green (fluorescencia) para medir la expresión diferencial de los genes estudiados con respecto a la cepa silvestre. Cada ensayo de q-PCR se realizó con las siguientes condiciones: 3 minutos de preincubación a 95°C, 40 ciclos de amplificación a 60°C cada uno de 1 minuto con intervalos de 15 segundos entre cada ciclo y lectura de la cantidad de fluorescencia emitida al final de cada ciclo. La expresión del gen *gyrA* fue utilizado como reportero *house keeping* sirviendo como control interno. Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por triplicado.

8.8 Ensayo de ARN-seq.

Para el análisis del transcriptoma de las cepas UW136 y UW*dksA*, el ARN total de las cepas fue extraído mediante el kit *Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience*) de acuerdo con las indicaciones del producto, de cepas obtenidas de un cultivo de 36h en medio PY liquido a 30°C por triplicado. El análisis de la calidad y cantidad de ARN fue determinado mediante *Agilent Bioanalyzer 2100 System*. Antes de la construcción de la biblioteca para la secuenciación, el ARN ribosomal fue depletado con el kit *RiboMinus rRNA depletion* para bacterias (Thermo Fisher Scientific). Las bibliotecas fueron construidas usando el kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation* (Illumina). La secuenciación de estas bibliotecas fue realizada mediante *NextSeq 500* (Illumina) con el kit *NexSeq 500 High Output kit v2.5*. Para el filtrado de los datos se utilizó el genoma de referencia *A. vinelandii* DJ mencionado anteriormente de NCBI Genomes. El alineamiento de las secuencias obtenidas fue realizado mediante el software *Smalt* y la profundidad de la lectura se determinó por el programa *CoverageBed* del software *Bamtools*. El analisis de expresión diferencial entre las cepas se realizó mediante el software IDEAMEX *(Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments)* el cual se vale de cuatro paquetes de analisis informatico para determinar el cambio en la expresión relativa de los transcritos (edgeR, DESeq2, lima y NOISeq). El conjunto de los genes detectados por estas cuatro herramientas analíticas fue determinado como los genes que tenían una expresión diferencial real y significativa entre las cepas UW136 y UW*dksA*.

Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron determinados a partir de un punto de corte log_2 *FC* ±1, *p-value* <0.05, y conteos por millón de al menos >1 (CPM>1). El agrupamiento de estos genes fue realizado utilizando las rutas metabólicas para *A. vinelandii* descritas en el KEGG a partir de los genes que cumplieron con el punto de corte log_2 *FC ±1* y FDR 0.05 (Gu, Z. et al., 2016; Luo & Brouwer, 2013)

8.9 Cuantificación de PHB.

El PHB fue extraído de células creciendo en medio PY liquido a 30°C en los tiempos indicados. La extracción e hidrolisis mediante H_2SO_2 concentrado fue descrito y reportado por Peña et al., 1997. El ácido crotónico producido por la hidrólisis del PHB fue medido usando el método descrito por Law & Slepecky, 1961.

9. CONCLUSIONES

1. Los niveles de (p)ppGpp regulan la síntesis de PHB a través de un mecanismo independiente de RpoS.

2. (p)ppGpp regula la síntesis de PHB de manera sinérgica con DksA.

3. DksA regula directamente la transcripción de *rpoS* a través del promotor P1.

4. DksA tambien regula la síntesis de PHB por al menos un segundo mecanismo independiente de RpoS.

5. DksA es un regulador global de la transcripción en *A. vinelandii* en condiciones que no favorecen la respuesta estricta.

6. DksA regula positivamente la expresión de las enzimas del metabolismo central necesarias para la síntesis de los precursores de la síntesis de PHB.

10. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar los niveles de (p)ppGpp durante el ciclo del PHB en *A. vinelandii*.

2. Determinar los posibles mecanismos independientes de DksA por los cuales (p)ppGpp regula la síntesis de PHB.

3. Determinar si la disminución en la expresión de las enzimas que sintetizan los substratos para la síntesis de PHB en la mutante en *dksA*, está involucrada en el mecanismo que regula la síntesis de PHB independiente de RpoS.

11. REFERENCIAS

Åberg, A., Fernández-Vázquez, J., Cabrer-Panes, J. D., Sánchez, A., & Balsalobre, C. (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3226–3236. https://doi.org/10.1128/JB.01410-08

Agirrezabala, X., Fernández, I. S., Kelley, A. C., Cartón, D. G., Ramakrishnan, V., & Valle, M. (2013). The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Reports*, *14*(9), 811–816. https://doi.org/10.1038/embor.2013.106

Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, *160*(1), 63–67. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-I

Bali, A., Blanco, G., Hill, S., & Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a nifL mutant of Azotobacter vinelandii fixing nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5), 1711–1718. https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1711-1718.1992

Basu, P., Pal, R. R., Dasgupta, S., & Bhadra, R. K. (2017). DksA-HapR-RpoS axis regulates haemagglutinin protease production in Vibrio cholerae. *Microbiology (United Kingdom)*, *163*(6), 900–910. https://doi.org/10.1099/mic.0.000469

Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in escherichia coli. *Annual Review of Microbiology*, *65*, 189–213. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946

Bishop, P. E., & Brill, W. J. (1977). Genetic analysis of Azotobacter vinelandii mutant strains unable to fix nitrogen. *Journal of Bacteriology*, *130*(2), 954–956. https://doi.org/10.1128/jb.130.2.954-956.1977

Boyle, W. K., Richards, C. L., Dulebohn, D. P., Zalud, A. K., Shaw, J. A., Lovas, S., Gherardini, F. C., & Bourret, T. J. (2021). DksA-dependent regulation of RpoS contributes to Borrelia burgdorferi tick-borne transmission and mammalian infectivity. *PLoS Pathogens*, *17*(2), 1–29. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009072

Brigham, C. J., Speth, D. R., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2012). Whole-genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in Ralstonia eutropha H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(22), 8033–8044. https://doi.org/10.1128/AEM.01693-12

Brown, L., Gentry, D., Elliott, T., & Cashel, M. (2002). DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *Journal of Bacteriology*, *184*(16), 4455–4465. https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002

Calderón-Flores, A., Pont, G. Du, Huerta-Saquero, A., Merchant-Larios, H., Servín-González, L., & Durán, S. (2005). The Stringent Response Is Required for Amino Acid and Nitrate Utilization , Nod Factor Regulation , Nodulation , and Nitrogen Fixation in Rhizobium etli †. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5075–5083. https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5075

Cashel, M. (1969). The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, *244*(12), 3133–3141. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93106-6

Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and σS form part of a cascade that controls alginate production in Azotobacter vinelandii. *Journal of Bacteriology*, *183*(23), 6787–6793. https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001

Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in Azotobacter vinelandii. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*(PART 3), 479–487. https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0

Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in Azotobacter vinelandii. *Microbiology*, *157*(6), 1685–1693. https://doi.org/10.1099/mic.0.046268-0

Cohen, H., Adani, B., Cohen, E., Piscon, B., Azriel, S., Desai, P., Bähre, H., Mcclelland, M., Rahav, G., & Gal-mor, O. (2022). The ancestral stringent response potentiator , DksA has been adapted throughout Salmonella evolution to orchestrate the expression of metabolic , motility , and virulence pathways. *Gut Microbes*, *14*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1997294

Dworkin, J. (2023). Understanding the Stringent Response: Experimental Context Matters. *MBio*, *14*(1). https://doi.org/10.1128/mbio.03404-22

Edwards, A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A., Mercante, J. W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M. I., Fields, J. A., Thompson, S. A., Georgellis, D., Cashel, M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular Microbiology*, *80*(6), 1561–1580. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07663.x

Espin Ocampo, E. G. (2003). Biología de Azotobacter vinelandii. In *Microbios en línea* (pp. 1–17).

Fellay, R., Frey, J., & Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene*, *52*(2–3), 147–154. https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90041-2

Gourse, R. L., Chen, A. Y., Gopalkrishnan, S., Sanchez-vazquez, P., Myers, A., & Ross, W. (2019). *Transcriptional Responses to ppGpp and DksA*. 163–184.

https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062444.Transcriptional

Gourse, R. L., Chen, A. Y., Gopalkrishnan, S., Sanchez-Vazquez, P., Myers, A., & Ross, W. (2018). Transcriptional Responses to ppGpp and DksA. *Annual Review of Microbiology*, *72*, 163–184. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062444

Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, *32*(18), 2847–2849.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8

Haugen, S. P., Ross, W., & Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(7), 507–519. https://doi.org/10.1038/nrmicro1912

Hernandez-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the Azotobacter vinelandii polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology*, *157*(11), 3014–3023. https://doi.org/10.1099/mic.0.051649-0

Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Nun, C., & Muriel-Millan, L. F. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in Azotobacter vinelandii. *Microbiology*, *158*(2012), 1953–1963. https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0

Huang, C., Li, W., & Chen, J. (2023). Transcriptomic Analysis Reveals Key Roles of (p) ppGpp and DksA in Regulating Metabolism and Chemotaxis in Yersinia enterocolitica. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7612). https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ ijms24087612

Juenger, J., Borisova, M., Mayer, C., Wolz, C., Brigham, C., Sinskey, A., & Jendrossek, D. (2017). Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-Hydroxybutyrate) in Ralstonia eutropha H16. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(13), 1–16. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.00755-17

Kang, P. J., & Craig, E. A. (1990). Identification and characterization of a new Escherichia coli gene that is a dosage-dependent suppressor of a dnaK deletion mutation. *Journal of Bacteriology*, *172*(4), 2055–2064. https://doi.org/10.1128/jb.172.4.2055-2064.1990

Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, *82*(1958), 33–36. https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961

Lemke, J. J., Sanchez-Vazquez, P., Burgos, H. L., Hedberg, G., Ross, W., & Gourse, R. L. (2011). Direct regulation of Escherichia coli ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, *108*(14), 5712–5717. https://doi.org/10.1073/pnas.1019383108

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6

Luo, W., & Brouwer, C. (2013). Pathview: an R/Biocondutor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, *29*(14), 1830–1831.

Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St. John, K., & Gottesman, S. (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: The characterization of RprA. *Molecular Microbiology*, *39*(5), 1382–1394. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02329.x

Manzo, J., Cocotl-Yañez, Miguel Tzontecomani, T., Martinez, V., Bustillos, R., Velasquez, C., Goiz, Y., Solis, Y., Lopez, L., Fuentes, L., Nuñez, C., Segura, D., Espin, G., & Castañeda, M. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene algD by the Gac / Rsm System in Azotobacter vinelandii. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *21*, 147–159. https://doi.org/10.1159/000334244

Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., & Cashel, M. (2002). Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of RelSeq, the Rel/Spo enzyme from streptococcus equisimilis. *Journal of Bacteriology*, *184*(11), 2878–2888. https://doi.org/10.1128/JB.184.11.2878-2888.2002

Mejía-Ruiz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (1997). Isolation and characterization of an Azotobacter vinelandii algK mutant. *FEMS Microbiology Letters*, *156*, 101–106.

Min, K. B., Yoon, S. S., & Whitfield, C. (2020). Transcriptome analysis reveals that the RNA polymerase-binding protein DksA1 has pleiotropic functions in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(12), 3851–3864. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011692

Mozejko-Ciesielska, J., Dabrowska, D., Szalewska-Palasz, A., & Ciesielski, S. (2017). Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis by Pseudomonas putida KT2440 relA/spoT mutant: bioprocess characterization and transcriptome analysis. *AMB Express*, *7*(1). https://doi.org/10.1186/s13568-017-0396-z

Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G., & Hengge-Aronis, R. (1996). The response regulator RssB controls stability of the σS subunit of RNA polymerase in Escherichia coli. *EMBO Journal*, *15*(6), 1333–1339. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00475.x

Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017). Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in Azotobacter vinelandii. *Molecular Microbiology*, *104*(2), 197–211. https://doi.org/10.1111/mmi.13621

Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2015). The Unphosphorylated EIIA Ntr Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in Azotobacter vinelandii. *PLoS ONE*, 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117184

Ortiz-Vasco, C. C. (2019). *Papel de la proteina EIIA en el mecanismo de regulación de la síntesis de PHB en Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional Autonoma de México.

Ortiz, C. C. (2019). *Papel de la proteina EIIA en el mecanismo de regulación de la síntesis de PHB en Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: A Critical Component of the Transcription Initiation Machinery that Potentiates the Regulation of rRNA Promoters by ppGpp and the Initiating NTP Brian. *Cell*, *118*(3), 311–322. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009

Paul, B. J., Berkmen, M. B., & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(22), 7823–7828. https://doi.org/10.1073/pnas.0501170102

Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecwlar mass distributions, broth viscosity and morphology of Azotobacter vinelandii cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(4), 510–515. https://doi.org/10.1007/s002530051088

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín, L., & Espin Ocampo, E. G. (2002). Expression of the Azotobacter vinelandii Poly-β-Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. *Journal of Bacteriology*, *184*(20), 5672–5677. https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5672

Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassylyev, D. G. (2004). Regulation through the secondary channel - Structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, *118*(3), 297–309. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.030

Perron, K., Comte, R., & Van Delden, C. (2005). DksA represses ribosomal gene transcription in Pseudomonas aeruginosa by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. *Molecular Microbiology*, *56*(4), 1087–1102. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04597.x

Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology*, *62*(1), 35–51. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162903

Rice, C. J., Ramachandran, V. K., Shearer, N., & Thompson, A. (2015). Transcriptional and post-transcriptional modulation of SPI1 and SPI2

expression by ppGpp, RpoS and DksA in Salmonella enterica sv Typhimurium. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127523

Rodríguez-Martínez, K., Muriel-Millán, L. F., Ortíz-Vasco, C., Moreno, S., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (2023). Defining the regulatory mechanisms of sigma factor RpoS degradation in Azotobacter vinelandii and Pseudomonas aeruginosa. *Molecular Microbiology*, *June*, 91–102. https://doi.org/10.1111/mmi.15107

Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A., Lee, J.-H., Burgos, H. L., & Gourse, R. L. (2016). ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Molecular Cell*, *62*(6), 811–823. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.029

Ross, W., Vrentas, C. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2013). The magic spot: A ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular Cell*, *50*(3), 420–429. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.021

Ruiz, J. A., López, N. I., Fernández, R. O., & Méndez, B. S. (2001). Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of Pseudomonas oleovorans in natural water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(1), 225–230. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.225-230.2001

Schafhauser, J., Lepine, F., Mckay, G., Ahlgren, H. G., Khakimova, M., & Nguyen, D. (2014). *The Stringent Response Modulates 4-Hydroxy-2-Alkylquinoline Biosynthesis and Quorum-Sensing Hierarchy in Pseudomonas aeruginosa*. *196*(9), 1641–1650. https://doi.org/10.1128/JB.01086-13

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675.

Segura, D., & Espín, G. (2004). Inactivation of pycA , encoding pyruvate carboxylase activity , increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in Azotobacter vinelandii on solid medium. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 414–418. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1611-9

Senior, P. J., & Dawes, E. A. (1973). The regulation of poly β hydroxybutyrate metabolism in Azotobacter beijerinckii. *Biochemical Journal*, *134*(1), 225–238. https://doi.org/10.1042/bj1340225

Sledjeski, D. D., Gupta, A., & Gottesman, S. (1996). The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in Escherichia coli. *EMBO Journal*, *15*(15), 3993–4000. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00773.x

Steinchen, W., & Bange, G. (2016). The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*, *101*, 531–544. https://doi.org/10.1111/mmi.13412

Travis, B. A., & Schumacher, M. A. (2022). Diverse molecular mechanisms of

transcription regulation by the bacterial alarmone ppGpp. *Molecular Microbiology*, *117*(2), 252–260. https://doi.org/10.1111/mmi.14860

Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., & Segura, D. (2020). The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*(April). https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00386

Venturi, V. (2003). Control of rpoS transcription in Escherichia coli and Pseudomonas: Why so different? *Molecular Microbiology*, *49*(1), 1–9. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03547.x

Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. L., & Jefferson, R. A. (1995). β-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology*, *141*(7), 1691–1705. https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1691

Wu, L., Wang, Z., Guan, Y., Huang, X., Shi, H., Liu, Y., & Zhang, X. (2020). The (p)ppGpp-mediated stringent response regulatory system globally inhibits primary metabolism and activates secondary metabolism in Pseudomonas protegens H78. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(7), 3061–3079. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10421-5

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

The stringent response regulates the poly-β-hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Azotobacter vinelandii*

Cristian Camilo Ortiz-Vasco[1], Soledad Moreno[1], Luis Alonso Quintero-Navarro[2], Juliana Berenice Rojo-Rodríguez[1], Guadalupe Espín[1]*

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, México, **2** Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

* elda.espin@ibt.unam.mx

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Ortiz-Vasco CC, Moreno S, Quintero-Navarro LA, Rojo-Rodríguez JB, Espín G (2024) The stringent response regulates the poly-β-hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Azotobacter vinelandii*. PLoS ONE 19(4): e0299640. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640

Editor: Dharam Singh, CSIR-Institute of Himalayan Bioresource Technology, INDIA

Received: October 6, 2023

Accepted: February 13, 2024

Published: April 4, 2024

Copyright: © 2024 Ortiz-Vasco et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting information files.

Funding: This work was supported by a grant from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT) IN224223 to Guadalupe Espin. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The stringent response exerted by (p)ppGpp and RNA-polymerase binding protein DksA regulates gene expression in diverse bacterial species. To control gene expression (p)ppGpp, synthesized by enzymes RelA and SpoT, interacts with two sites within the RNA polymerase; site 1, located in the interphase between subunits β' and ω (*rpoZ*), and site 2 located in the secondary channel that is dependent on DksA protein. In *Escherichia coli*, inactivation of *dksA* results in a reduced sigma factor RpoS expression. In *Azotobacter vinelandii* the synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) is under RpoS regulation. In this study, we found that the inactivation of *relA* or *dksA*, but not *rpoZ*, resulted in a negative effect on PHB synthesis. We also found that the *dksA*, but not the *relA* mutation reduced both *rpoS* transcription and RpoS protein levels, implying that (p)ppGpp and DksA control PHB synthesis through different mechanisms. Interestingly, despite expressing *rpoS* from a constitutive promoter in the *dksA* mutant, PHB synthesis was not restored to wild type levels. A transcriptomic analysis in the *dksA* mutant, revealed downregulation of genes encoding enzymes needed for the synthesis of acetyl-CoA, the precursor substrate for PHB synthesis. Together, these data indicate that DksA is required for optimal expression of RpoS which in turn activates transcription of genes for PHB synthesis. Additionally, DksA is required for optimal transcription of genes responsible for the synthesis of precursors for PHB synthesis.

Introduction

The stringent response is a ubiquitous bacterial reaction triggered by nutrient deprivation and mediated by the intracellular concentrations of ppGpp and pppGpp. These secondary messengers, jointly referred to as (p)ppGpp, control gene transcription, mRNA translation, and protein activity to adjust the metabolism and growth rate to environmental conditions [1]. The intracellular levels of (p)ppGpp are the result of two enzyme activities called RelA and SpoT.

These enzymes have a synthesis and synthesis/degradation activity, respectively. In some bacteria, *relA/spoT* mutants (pppGpp^0), showed defective growth in minimal medium [2].

The main mechanism for (p)ppGpp control on gene expression in most bacteria involves its binding to RNA polymerase at two specific sites: a site 1 on the interphase between β' and ω (*rpoZ*) subunits, and a site 2 on the secondary channel, which is dependent on the DksA protein. Thus, the inactivation of *rpoZ* (ω subunit) and *dksA* genes removes the (p)ppGpp binding sites 1 and 2, respectively [3].

The presence of site 2 on RNA polymerase allowed the understanding of the *in vitro* and *in vivo* differences in gene expression [4]. Some studies indicated that site 2 is important for transcription activation and modulates the response to (p)ppGpp concentrations. On the other hand, the only presence of site 1 is enough for the repression of gene expression [3].

An RNAseq analysis in a strain that synthesized (p)ppGpp by constitutive expression of *relA*, revealed that the major effect on whole gene expression was due to (p)ppGpp binding to the RNA polymerase, rather than binding to other proteins [5].

In some bacteria, the expression of the alternative sigma factor RpoS is under the control of the DksA and (p)ppGpp; in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio cholerae* DksA regulates RpoS at a transcriptional and translational level. In *E. coli*, the activity of *rpoS* promoters was diminished in a *dksA* mutant; furthermore, an increase in the levels of (p) ppGpp did not affect the *rpoS* transcription in this mutant [6]. In *Salmonella typhimurium* a *dksA* mutant, but not a *relA/spoT* mutant, has reduced levels of RpoS [7]; and in *Vibrio cholerae*, the expression of RpoS in a *dksA* mutant was diminished at transcriptional and translational levels [8].

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium belonging to the *Pseudomonadaceae* family that produces poly-β-hydroxybutyrate (PHB), a biopolymer of industrial relevance. In this bacterium, the enzymes for the synthesis of PHB are encoded in the *phbBAC* operon [9]. Transcription of this operon initiates from two promoters: pB1 activated by the transcriptional activator PhbR, and pB2, an RpoS dependent promoter. On the other hand, the transcription of *phbR* is also dependent on RpoS; thus, the inactivation of *rpoS* or *phbR* significantly reduced the synthesis of PHB [10, 11].

In *A. vinelandii*, the synthesis of PHB starts with the condensation of two molecules of acetyl-CoA by the β-ketothiolase PhbA, to produce acetoacetyl-CoA, which is reduced by the NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase PhbB, producing the β-hydroxybutyryl-CoA monomer which is polymerized by the PHB synthase PhbC. [9]. The synthesis of PHB is closely related to the functioning of the TCA cycle, since unbalanced growth conditions, such as an excess of a carbon source and other nutrient is growth-limiting, or by mutations that cause a slow-down in the TCA activity lead to a higher availability of acetyl-CoA for the synthesis of PHB [12, 13].

In this study, we investigated the regulatory roles of the stringent response in the control of PHB synthesis in *A. vinelandii*. Our results indicate that an effect of a *dksA* mutation on PHB synthesis is a downregulation of the expression of *rpoS*. We also found that some carbon metabolism genes necessary for the synthesis of acetyl-CoA the substrate for PHB synthesis are downregulated in the *dksA* mutant. Additionally, in the *relA* mutant, the reduction of PHB synthesis was not due to a reduction in *rpoS* expression.

Results

Inactivation of *relA* or *relA/spoT* genes reduces PHB accumulation

A search in the genome of *A. vinelandii* identified *avin37060* and *avin02810* genes encoding proteins sharing a 48% and 54% identity with the RelA and SpoT proteins from *E. coli*.

Sequences analysis of these proteins showed the presence of domains characteristic of (Rel/Spo homolog) RSH proteins, implying that *avin37060* encodes a RelA type (p)ppGpp synthase while *avin02810* encode a SpoT protein with (p)ppGpp synthase and hydrolase activities.

To elucidate the involvement of (p)ppGpp in PHB synthesis, we constructed UW136 derivative strains carrying a *relA*::Km mutation and a double mutant *relA*::Km/*spoT*::Gm to obtain UW*relA* and UW*relA/spoT* strains, which as shown in Fig 1B are less white than UW136. This phenotype is due to a decreased PHB accumulation. Fig 1C shows quantification of PHB in these mutants, where a reduction in PHB accumulation of 50% in the UW*relA*, and 56% in the UW*relA/spoT* strains was observed compared with the wild type. As depicted in Fig 1A, the inactivation of *relA/spoT* genes negatively affected growth. A complemented UW*relA*/*relA*$^+$ strain was also constructed. As expected, the synthesis of PHB in the complemented strain increased to 77% of the wild type (Fig 1C).

The inactivation of *dksA* but not of *rpoZ* diminishes PHB synthesis in *A. vinelandii*

As mentioned above, the main mechanism though which (p)ppGpp exerts its effects involves binding to RNA polymerase at two distinct sites, one involving the ω (*rpoZ*) subunit and the other requiring the presence of the DksA protein. We identified in the *A. vinelandii* genome a *rpoZ* homolog (*avin02820*) and a *dksA* homolog (*avin42640*).

To determine whether the removal of (p)ppGpp binding sites in RNA polymerase affects PHB synthesis, we constructed strains UW*dksA* and UW*rpoZ* each carrying non-polar *dksA*::Sp and *rpoZ*::Gm mutations, as *rpoZ* and *spoT* are transcribed as an operon (S1 Fig). Fig 1A shows that the inactivation of *dksA* or *rpoZ* had no effect on growth. However, in the absence of *dksA*, PHB synthesis was reduced by 84% compared to the wild type, whereas PHB synthesis in the UW*rpoZ* mutant was not affected (Fig 1B and 1C).

To confirm that the PHB defective phenotype of the UW*dksA* strain was caused by the *dksA* inactivation, we constructed a complemented UW*dksA*/*dksA*$^+$ strain. As shown in Fig 1C, PHB synthesis in the complemented strain increased to 72% of the wild type.

PHB synthesis is abolished in the UW*relA/dksA* double mutant strain

As shown above, the *relA* mutation reduced PHB synthesis by 50%, while in the *dksA* mutant, the synthesis of this polymer was reduced by 86%. These results suggested the possibility that the effect of DksA is independent of (p)ppGpp, or that DksA exerts its control through two distinct pathways, one of which may involve (p)ppGpp binding.

To investigate further, we constructed a double mutant UW*relA/dksA*, and assessed its PHB phenotype. As shown in Fig 1C, PHB production in this strain was abolished. This result agrees with the hypothesis that (p)ppGpp and the DksA protein regulate PHB synthesis through separate and independent mechanisms, implying that, (p)ppGpp levels, provided by RelA, exert control over PHB synthesis via an alternative pathway that does not involve binding to DksA-related site on RNA polymerase. Moreover, the lack of effect of the *rpoZ* mutation on PHB synthesis suggests that the (p)ppGpp effect on PHB is unrelated to its binding to site 1 in the polymerase.

Strains UW*dksA* and UW*relA/dksA* exhibited a light brown color compared to the white color observed in the wild type strain (Fig 1B). The cause of this phenotype and if it is related to PHB is not known, but it may be due to the production of a pigment caused by the pleiotropic nature of the *dksA* mutation.

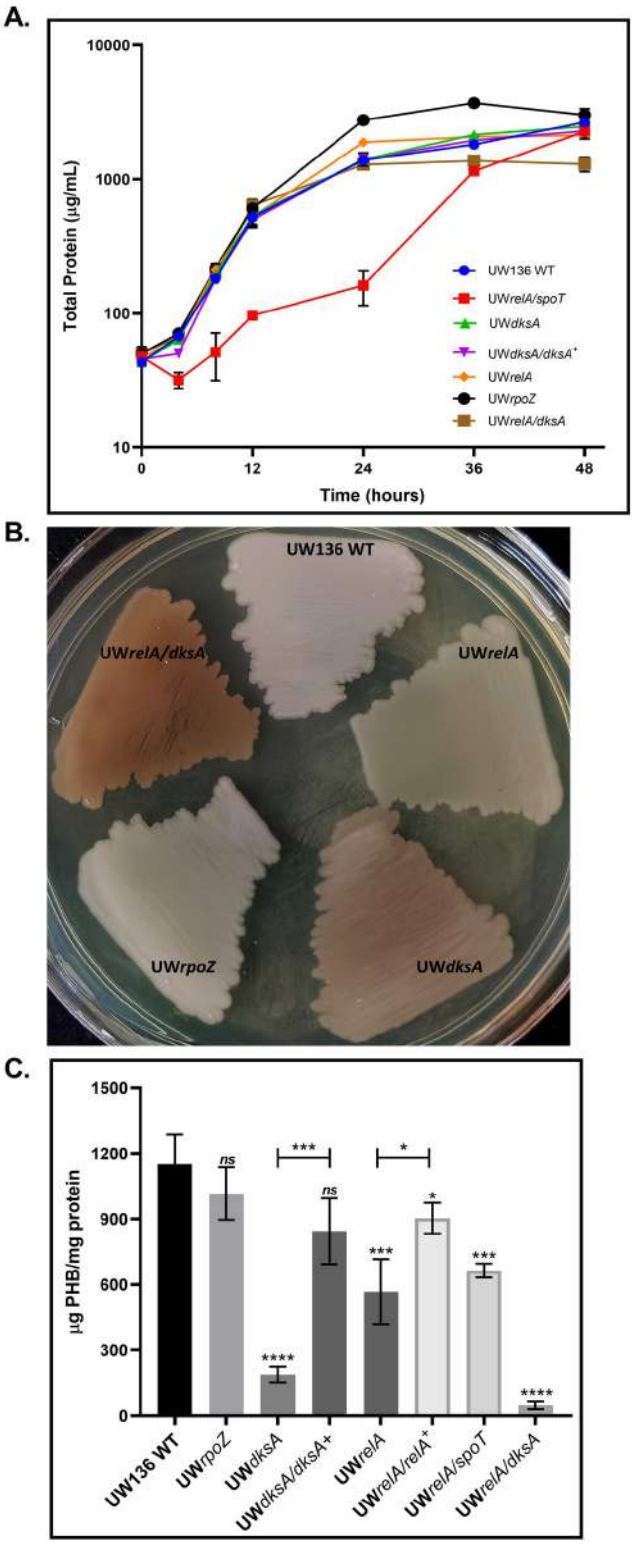


Fig 1. The stringent response regulates the PHB accumulation. (A), Growth kinetics of *A. vinelandii* strains in liquid PY medium at 30˚C. (B) PHB synthesis phenotype of strains grown in PY solid medium, and (C), PHB quantification in PY liquid medium for 36 hours. The white color indicates PHB accumulation. A less white appearance means reduction or no accumulation of PHB. The mean from three independent experiments is presented. Statistical significance is t student $p<0.05$ with respect to wild type. Statistical significance is t student $p<0.05$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g001

RpoS expression is reduced in the UW*dksA* mutant strain

DksA regulates the expression of RpoS in several bacterial species. Thus, we investigated whether the dksA mutation in the UW*dksA* resulted in diminished expression of RpoS, required for PHB synthesis. We employed RT-qPCR, to quantify the effect of the *dksA* mutation on *rpoS* transcription. Fig 2A shows that the *rpoS* transcript level in the UW*dksA* mutant was reduced by 70%.

A previous study [14], and an analysis carried out here using *Softberry software*, indicated that *rpoS* transcription in *A. vinelandii* initiates from three promoters; P1, P2, and P3. We constructed UW136 derivative strains carrying the *rpoS*::*gusA* transcriptional fusion with all 3 promoters (*rpoS*::*gusA*AP), as well as with only P1, P2, or P3 promoters (Fig 2B and S2 Fig). β–glucuronidase activity measurements in these strains (Fig 2B) indicates that the P1 promoter accounted for about 95% of *rpoS* transcriptional activity, with P2 and P3 jointly contributing a 5% in the wild type strain.

To confirm the positive effect of DksA on *rpoS* transcription we also constructed UW*dksA* mutant derivatives, containing the *rpoS*::*gusA* fusion with P1 or all promoters (*rpoS*::*gusA*AP). Fig 2C, shows that *rpoS* transcription from the P1 promoter was reduced by 30–60% in the *dksA* mutant. Interestingly, a significant reduction was observed in the strain carrying the fusion with all 3 promoters (Fig 2D), indicating a positive role of DksA in *rpoS* transcription.

The *dksA* mutation, but not the *relA* mutation, reduces RpoS protein levels without affecting stability

In *Escherichia coli*, the *dksA* mutation was reported to affect both *rpoS* transcription and RpoS protein levels even under conditions of (p)ppGpp overproduction [6]. We determined the effect of the *dksA* and *relA* mutations on RpoS level and stability. Western blot assays revealed that in line with reduced *rpoS* transcription, RpoS protein levels in the UW*dksA* mutant were diminished by about 50% compared to those in the wild type strain, whereas RpoS levels in the UW*relA* mutant were not affected (Fig 3A).

We also assessed the *in vivo* stability of RpoS. As shown in Fig 3B, the RpoS protein in the UW*dksA* mutant exhibited a half-life similar to that observed in the wild type. As a control, we employed UW*ptsP* strain, where RpoS half-life was previously shown to be reduced [15]. The negative effect on RpoS levels in the UW*dksA* but not in UW*relA* strain, further support the proposal that (p)ppGpp levels and DksA protein affect PHB synthesis through different pathways.

Transcription of *rpoS* from a constitutive promoter in the UW*dksA* mutant does not restore PHB synthesis

To evaluate whether the reduced PHB accumulation in the UW*dksA* mutant primarily resulted from diminished *rpoS* expression, we constructed UW*dksA*/*rpoS*$^+$ strain, containing a *rpoS* gene expressed from the *gyrA* constitutive promoter. The expectation was that by increasing *rpoS* transcription in a DksA-independent manner, the PHB-negative phenotype caused by the *dksA* mutation would be restored. As shown in Fig 4B, the transcript level of *rpoS* determined by RT-qPCR, along with the RpoS protein level (Fig 4C) were significantly increased. As expected an increased expression of *phbR* and *phbB* was also observed in the UW*dksA*/*rpoS*$^+$ strain (Fig 4B). However, PHB synthesis was only partially restored corresponding to 25% of the wild type strain (Fig 4A).

These results suggest that the DksA protein exerts an additional level of control over PHB synthesis, that is independent of its regulation of RpoS expression.

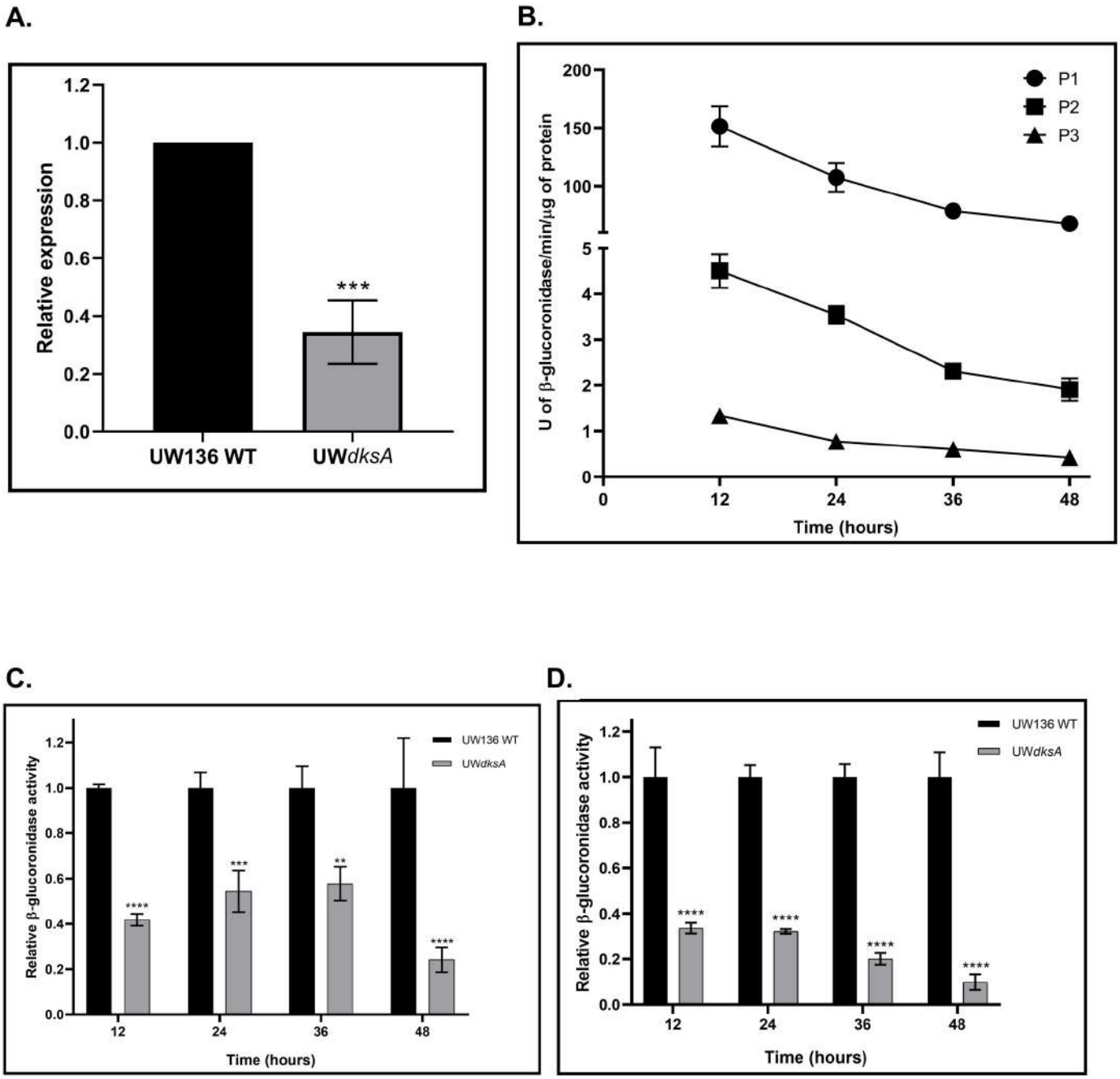


Fig 2. The *dksA* mutation reduces *rpoS* expression and its promoter activity. (A). Relative expression of *rpoS* gene determined by RT-qPCR in the UW*dksA* mutant and the wild type strain after 36 hours incubation on PY medium. (B). β-glucuronidase activity in the wild type strain UW136 carrying transcriptional *rpoS*::*gusA* fusions to the P1, P2, and P3 promoters. (C). Relative β-glucuronidase activity of the transcriptional fusion that contains *rpoS*::*gusA* P1 promoter in the UW*dksA* mutant with respect to wild type. (D). Relative β-glucuronidase activity of transcriptional fusion that contains all promoters (*rpoS*::*gusA*AP) in the UW*dksA* mutant with respect to wild type. The results are the mean from three independent experiments. Statistical significance is t student $p<0.05$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g002

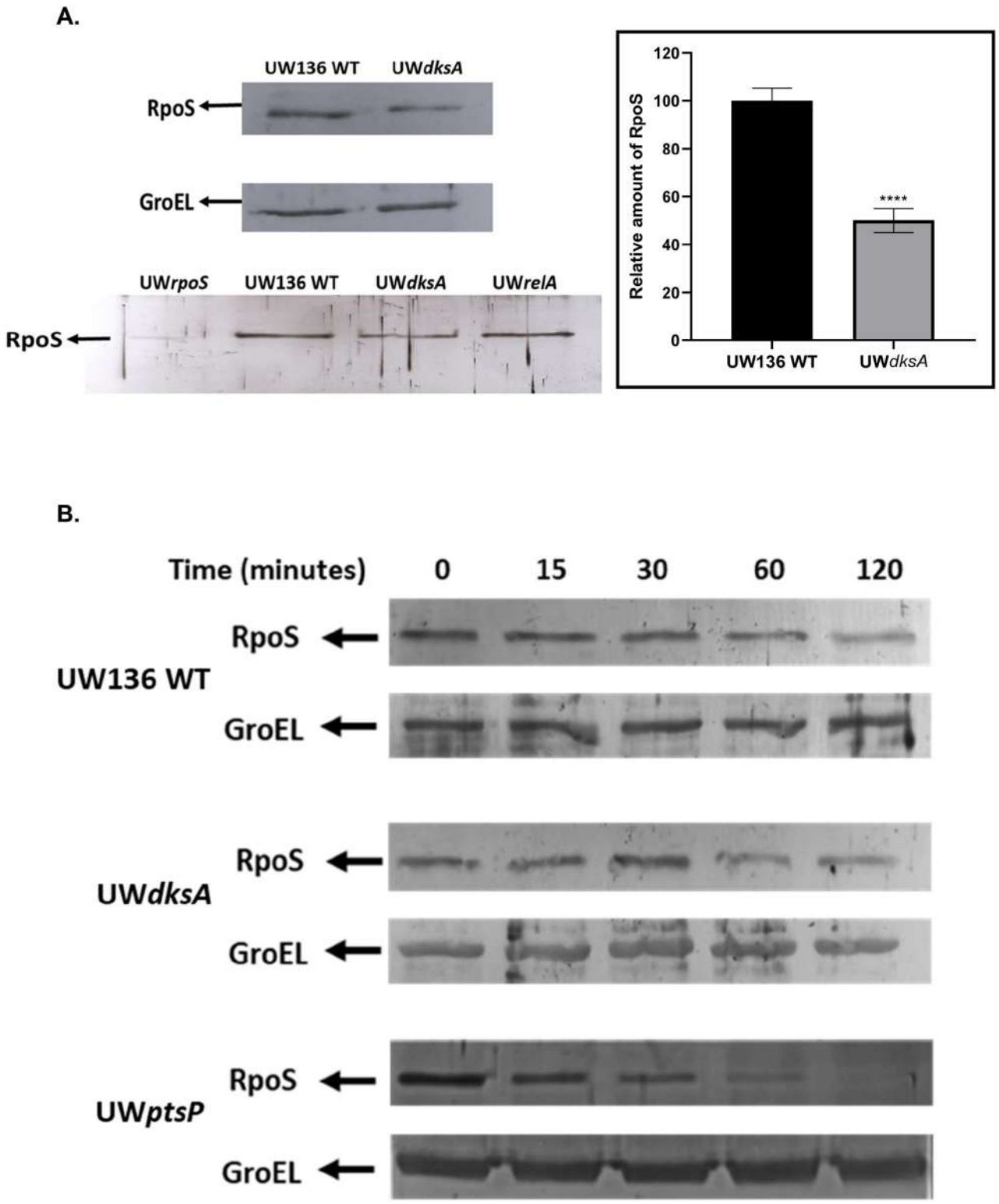


Fig 3. Protein levels of RpoS were reduced in the UW*dksA* mutant, but its stability was not affected. (A). Western blot assay and relative amount of RpoS was determined in UW*dksA* and UW*relA* mutants after 36 hours of incubation on PY medium using polyclonal anti-RpoS antiserum. The relative amount of RpoS in the UW*dksA* was determined by ImageJ software. (B). RpoS Protein stability was determined after adding kanamycin (0.5mg/mL) to block protein synthesis and was compared to the wild type and a UW*ptsP* mutant with a shorter half-life [15].

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g003

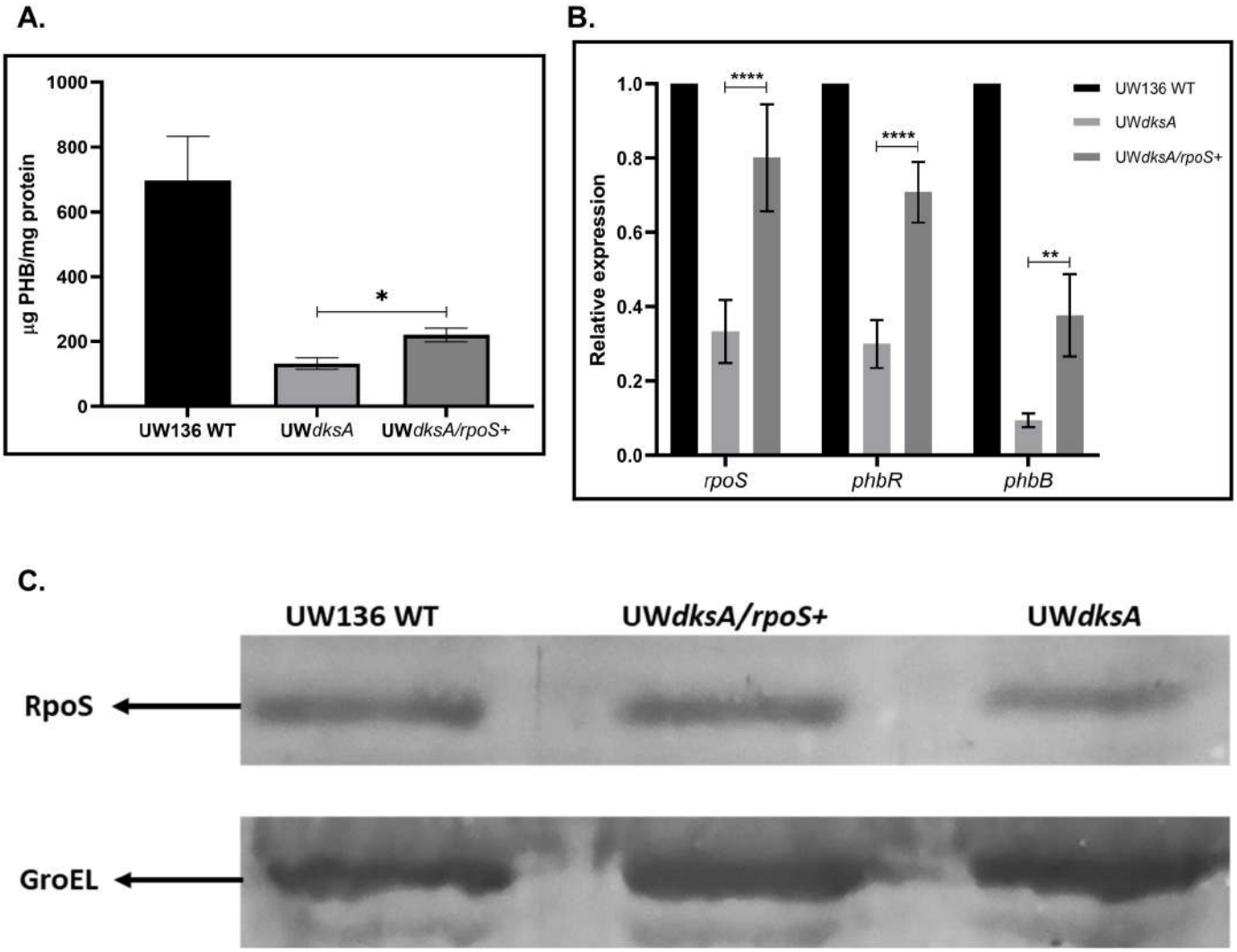


Fig 4. Complementation with a *rpoS* copy from a constitutive promoter increased the *rpoS*, *phbR*, and *phbB* transcription and the RpoS protein but did not restore the PHB production on UW*dksA* mutant. (A). Quantification of PHB production. (B). Relative expression of *rpoS*, *phbR*, and *phbB* genes determined by RT-qPCR in UW*dksA* and UW*dksA/rpoS*+ strains. (C). Detection of RpoS by Western blot assay. Determination of transcript levels and RpoS protein were carried out after 36 hours of incubation in a PY liquid medium. The results are the mean from three independent experiments. Statistical significance is t student $p<0.05$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g004

Genes encoding enzymes for PHB precursors synthesis are downregulated in the UW*dksA* strain

To identify an RpoS-independent and alternative pathway throughout DksA coregulates PHB synthesis, we conducted a transcriptome analysis comparing the UW*dksA* mutant to the wild type. Principal component analysis (PCA) highlighted distinct clustering of replicate strains, with the most significant variance (99%) between UW*dksA* and UW136 strains being captured by the first principal component (PC1) (Fig 5A).

Differential gene expression analysis as performed using IDEAMEX software revealed 856 differentially expressed genes (DEGs) between UW*dksA* and UW136 strains, comprising 467 upregulated genes and 389 downregulated genes (Fig 5B, $\log_2$ FC ±1, pValue<0.05). Gene list enrichment analysis of the UW*dksA* mutant identified enrichment terms in Metabolism,

Genetic Information Processing, and Environmental Information Processing (Fig 5C). Clustering of enriched Metabolism and Genetic Information Processing GO term clusters showed cased prominence in "metabolic pathways", "pyruvate metabolism", "biosynthesis of secondary metabolism" and "ribosome" (S3 Fig).

We explored metabolic pathways responsible for the synthesis of precursors for PHB synthesis. As shown in Fig 6A and S3 Fig, the glycolysis and pyruvate metabolism pathways were downregulated in the UW*dksA* strain. We validated the reduced expression of nine genes encoding enzymes required for PHB precursors (phosphoenolpyruvate, pyruvate, and acetyl-CoA) via RT-qPCR (Fig 6B). These findings suggest that the downregulation of these genes may contribute to the observed negative impact on PHB synthesis in the UW*dksA* strain.

Additionally, other enriched GO term clusters upregulated in the UW*dksA* mutant pertained to Genetic Information Processing, particularly "aminoacyl tRNA biosynthesis" and "ribosome" (S3 Fig, $\log_2$ FC ±1, pValue <0.05). This indicates that the *dksA* mutation affects

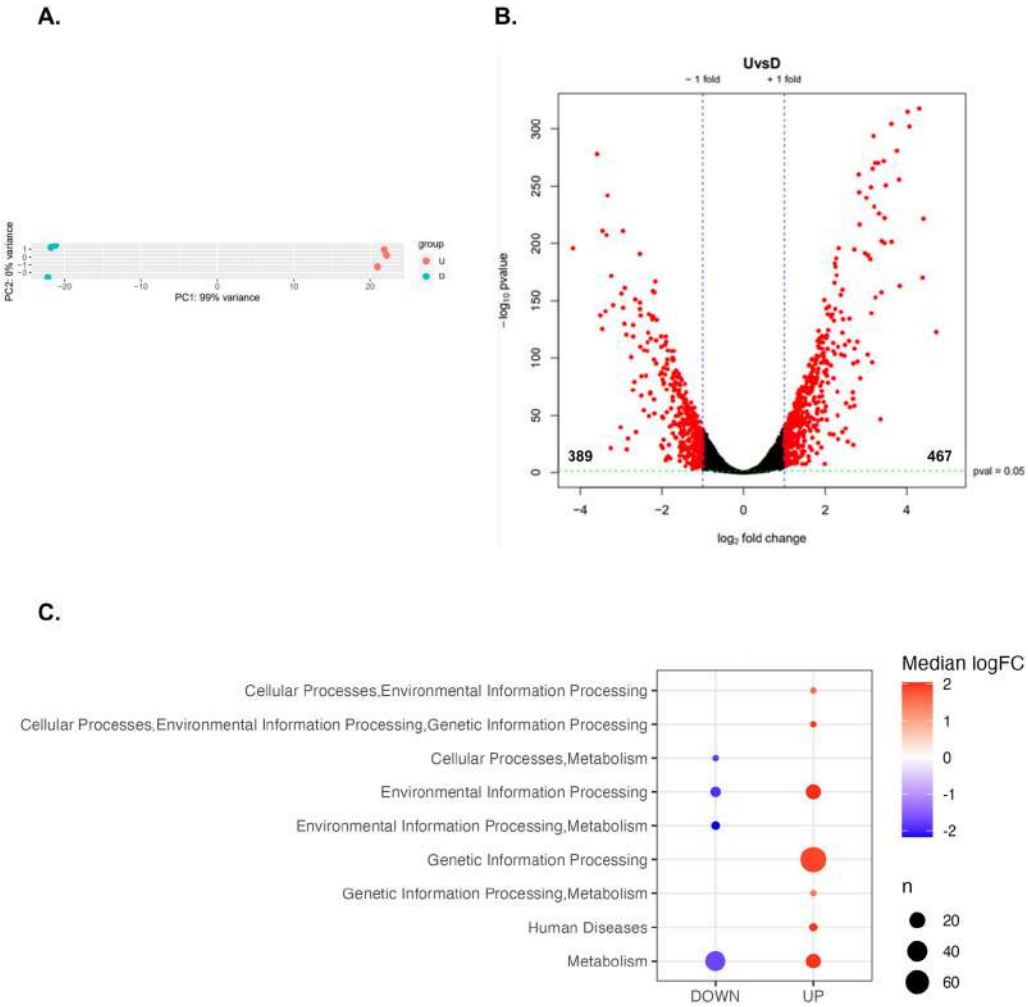


Fig 5. UW*dksA* mutant transcriptomic profile. (A). Principal component analysis identified clustering of UW*dksA* mutant (blue) with respect to UW136 (red). (B). Differential gene expression analysis identified 856 UW*dksA* mutant DEGs compared to UW136. ($\log_2$ FC ±1 cut off, pValue <0.05). (C). Clustering of the enriched Biological Process GO: terms. Spots represent GO: terms, one gene can belong to more than one GO: term. Spot size relates the number of genes in each term and the color indicates the enrichment significance.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g005

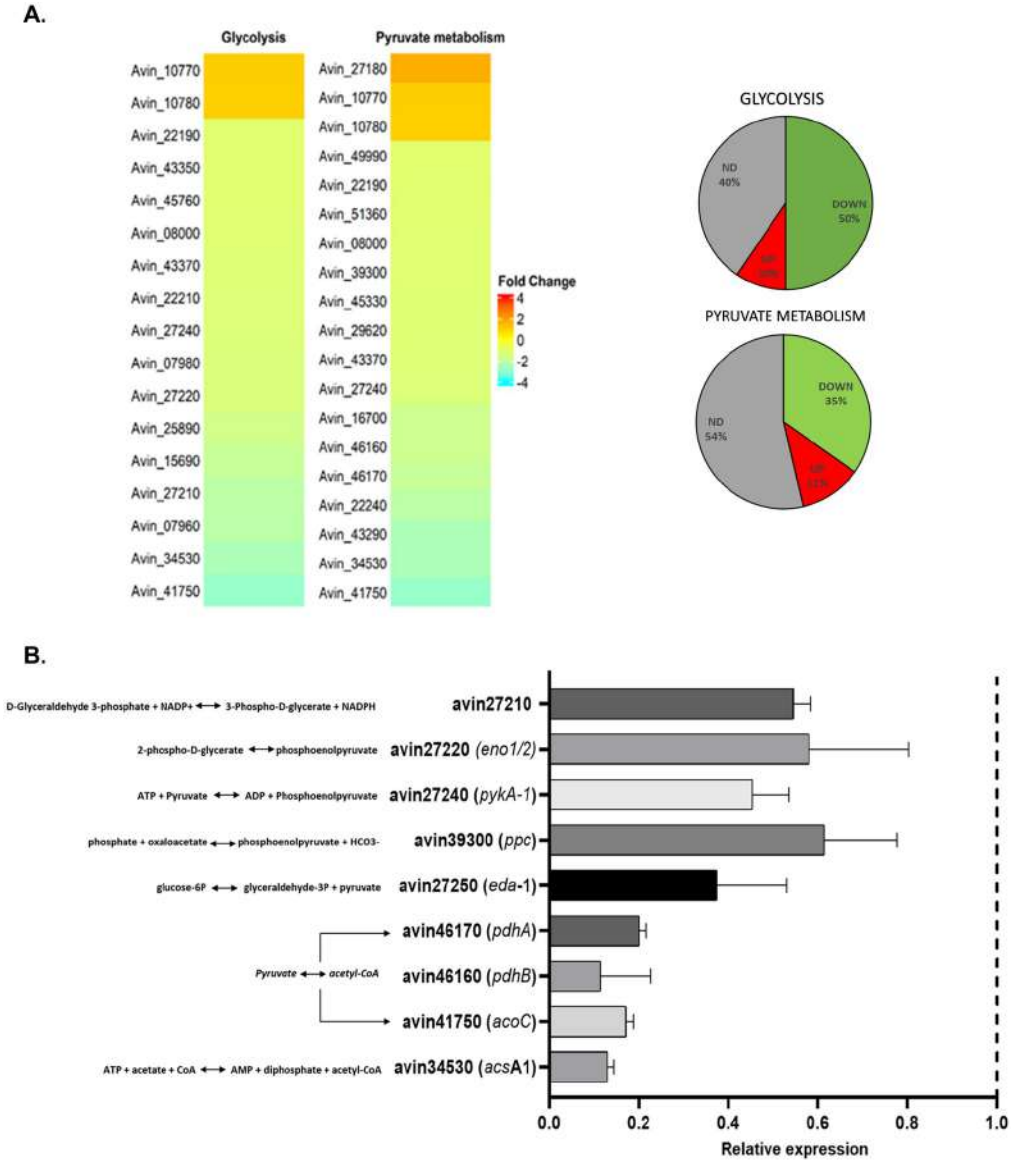


Fig 6. Genes that code enzymes necessary for the synthesis PHB precursors were downregulated in the UW*dksA* mutant. (A). Glycolysis and pyruvate metabolism pathways deposited in KEEG to *A. vinelandii* are represented. The color scale indicated the differential regulated between UW*dksA* mutant and UW136 ($\log_2$ FC ±1 pValue <0.05). Right. Percent of genes in the metabolic pathway that change the expression in the UW*dksA* mutant respect to the wild type (ND: No differential expression). (B). RT-qPCR of genes related to phosphoenolpyruvate, pyruvate, and acetyl-CoA synthesis from UW*dksA* mutant compared to the UW136.The results are the mean from three independent experiments. Statistical significance is t student $p<0.05$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g006

the transcription of genes associated to ribosomal proteins, implying a repressive role of DksA on genes linked to ribosome biogenesis. in *A. vinelandii*

Discussion

Recent research has shed light on the broad implication of the stringent response in bacterial physiology, extending its influence beyond amino acid deprivation to encompass

transcriptional regulation of hundreds of genes [2]. The (p)ppGpp synthesized by RelA/SpoT proteins, and the DksA protein are required to carry out the changes in transcription observed during the stringent response. The impact of (p)ppGpp levels in the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) including PHB, in some bacteria has been investigated. In model organisms like *Cupriavidus necator* H16 (previously called *Ralstonia eutropha*), mutations in *relA/spoT* genes have shown to regulate PHB synthesis and degradation [16, 17]. Similar effects have been observed in species such as *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas chlororaphis* PA23, and *Rhizobium etli* upon inactivation of *relA/spoT* [18–20].

This study aimed to elucidate the relevance of stringent response genes in PHB synthesis in *A. vinelandii*. Like another γ-proteobacteria *A. vinelandii* possesses homologs of the RelA and SpoT proteins. Our construction of a UW*relA* single mutant and a UW*relA/spoT* double mutant generating a (p)ppGpp^0 strain revealed that as in other PHAs-producer bacteria, *A. vinelandii relA/spoT* mutations led to a reduction in PHB synthesis.

(p)ppGpp primarily exert its regulatory role though binding to RNA polymerase at two distinct sites: site 1, dependent on the ω subunit (*rpoZ*), and site 2, dependent on the RNA polymerase binding protein DksA [2]. This study showed that mutational inactivation of *rpoZ* had no effect on PHB synthesis. In contrast, the UW*dksA* mutant exhibited a more pronounced reduction in PHB synthesis than the UW*relA* mutant. Interestingly, UW*relA/dksA* double mutant showed accumulative effect in agreement with the notion that (p)ppGpp and DksA independently regulate PHB synthesis through different pathways.

It is noteworthy that in *E. coli* many phenotypes regulated by stringent response are potentiated by the (p)ppGpp-DksA interaction [21]. However, DksA can also act independently of (p)ppGpp to modulate RNA polymerase activity. Negative and positive regulation by (p)ppGpp has been studied and found that either site 1 or site 2 alone are sufficient for the negative regulation of promoter activity, while site 2 is necessary for positive regulation, with the presence of both sites enhancing activity [5].

Our results agree with the positive role of the DksA protein in PHB synthesis, even in conditions where normal (p)ppGpp levels are present, as in the UW*dksA* mutant. This suggest that DksA, independently of (p)ppGpp, promotes the expression of genes required for the PHB synthesis.

In *A. vinelandii*, the sigma factor RpoS has been shown to activate transcription of *phbR* and the PHB biosynthetic operon *phbBAC* [10, 11]. In some bacteria like *E. coli* and *Borrelia burgdorferi*, a *dksA* mutant exhibited undetectable RpoS level under various conditions, even in the presence of high (p)ppGpp levels [6, 22]. In *Vibrio cholerae* DksA was found to regulate RpoS expression at the transcriptional and translational level [8].

This study showed that in *A. vinelandii*, transcription of *rpoS* is initiated from three promoters, with P1 contributing with 95% of *rpoS* transcriptional activity. Interestingly, the UW*dksA* mutant, showed a significant reduction in transcription from the P1 promoter. Moreover, in the UW*dksA* strain with the *rpoS::gusAAP* transcriptional fusion, the reduction of β-glucuronidase activity was higher than in the strain with only the P1 promoter, suggesting the presence of regulatory elements in the DNA region downstream P1. In concordance with the decreased *rpoS* transcription, expression of *phbBAC* and *phbR* was significantly reduced in the UW*dksA* mutant. Taken together these results indicated the necessity of DksA for optimal RpoS expression, which in turn activates transcription of PHB genes.

As a result of the reduction in the *rpoS* transcription, the RpoS protein levels were also lowered in the UW*dksA* mutant, while the UW*relA* mutant exhibited wild type RpoS levels. This indicated that, (p)ppGpp regulates PHB production through an RpoS-independent pathway.

To ascertain whether the reduction of *rpoS* transcription observed in the UW*dksA* mutant was responsible for the reduction in PHB synthesis, we investigated if DksA independent

expression of *rpoS*, could restore the PHB synthesis. As expected, in the UW*dksA* mutant with the *rpoS* gene transcribed from a *gyrA* promoter, the RpoS protein levels were restored to those of the wild type. However, PHB synthesis was only partially restored, suggesting that DksA also controls PHB synthesis through an RpoS-independent pathway.

To further investigate the regulatory mechanisms by which DksA controls PHB synthesis independently of RpoS, we carried out a transcriptome analysis comparing the UW*dksA* mutant with the wild type UW136. The RNA-seq results showed significant transcriptional changes, in genes involved in metabolism, metabolic pathways, pyruvate metabolism, and biosynthesis of secondary metabolism, which were downregulated. Additionally, genes related to Genetic Information Processing such as aminoacyl tRNA biosynthesis and ribosome-related genes were upregulated.

Some of the downregulated genes involved in carbon metabolism encoded enzymes responsible for the synthesis of phosphoenolpyruvate, pyruvate, and acetyl-CoA, which are precursors for PHB synthesis. This suggest that the decrease in the level of these enzymes, may contribute to the observed decrease in PHB synthesis in the UW*dksA* mutant, as well as in its derivative strain expressing *rpoS* from a constitutive promoter. No negative effect on growth was observed in the UW*dksA* mutant despite the decreased expression of the carbon metabolism genes. This may be due to a lack of effect of the *dksA* mutation in exponentially growing cells, as downregulation of these genes was observed in cell in stationary phase where the synthesis of PHB is carried out.

As in *A*. *vinelandii*, in other bacteria, carbon metabolism enzymes of the glycolytic pathway and the tricarboxylic acid (TCA) cycle have been reported as part of the DksA and (p)ppGpp regulon [23]. Also, in the *Enterobacteriaceae*, *Yersinia enterocolitica*, the response to DksA and RelA/SpoT proteins has been studied, revealing the downregulation of genes encoding enzymes of the TCA cycle [24].

In *E*. *coli*, DksA is also involved in the response to glucose-phosphate stress, which leads to growth inhibition due to the accumulation of sugar phosphates, or to depletion of glycolytic intermediates. The small RNA SgrS and its transcriptional activator SgrR alleviate this stress in part by repressing sugar phosphates transport [25]. This mechanism potentially present in *A*. *vinelandii* remains to be explored. The presence of small RNAs regulated by the stringent response in *A*. *vinelandii* is an attractive possibility to study.

In summary, this study along with research carried out in other bacterial species, has established a link between stringent response effectors and carbon metabolic networks. We propose that in *A*. *vinelandii* this link is likely to affect PHB synthesis.

Finally, early studies on the effects of the stringent response demonstrated the inhibition of ribosome biogenesis and transcription of rRNA genes [2]. More recent transcriptomic analysis revealed upregulation of genes coding for ribosomal proteins and ribosome assembly factors in *E*. *coli* and *Yersinia enterocolitica* [5, 24]. This study revealed that DksA functions as a repressor of ribosomal synthesis genes in *A*. *vinelandii*. Notably in *Pseudomonas* species, phylogenetically close related to *A*. *vinelandii*, a *dksA* mutation also affected the transcription of genes linked to ribosomal proteins and ribosome biogenesis [26, 27]. However, whether the upregulation of these genes in *A*. *vinelandii* affects PHB synthesis remains to be investigated.

In summary, we propose a model (Fig 7) for the regulation of the synthesis of PHB by (p)ppGpp and DksA in *A*. *vinelandii*, where DksA is necessary for optimal transcription of *rpoS*. In turn, RpoS activates transcription of the PHB biosynthetic genes. On the other hand, DksA is also required for optimal transcription of genes encoding enzymes responsible for the synthesis of acetyl-CoA the substrate for the synthesis of PHB. Finally, (p)ppGpp exerts a positive role on synthesis of PHB by and unknown mechanism independent of DksA and RpoZ.

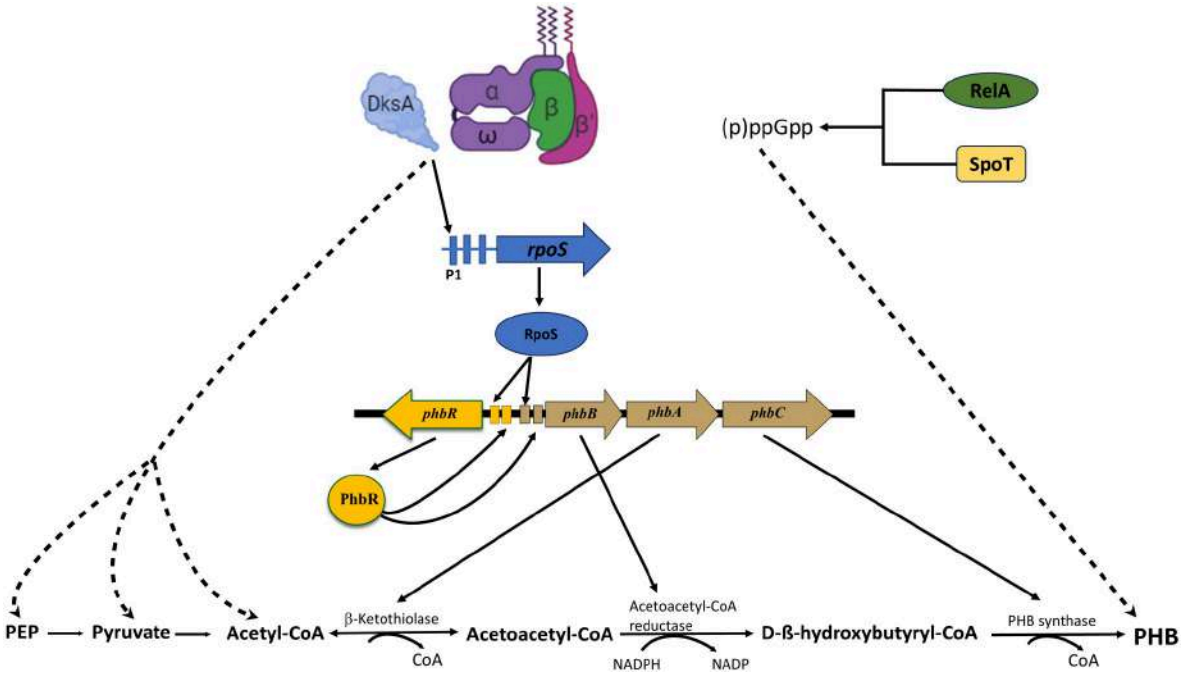


Fig 7. Model for the regulation of PHB synthesis by DksA and (p)ppGpp in *A.vinelandii*. Promoters are indicated as small rectangles; positive regulation is indicated with arrows; dashed lines indicate unknown intermediates and mechanism.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.g007

Materials and methods

Strains, media, and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1, and the oligonucleotides used in S1 Table. *A. vinelandii* strains were grown in peptone yeast medium added with 2% sucrose (PY) and incubated at 30˚ C. *E. coli* strains were cultured in Luria Bertani (LB) medium at 37˚C. Antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* were as follows: kanamycin (km) 3μg/mL, gentamycin (Gm) 1μg/mL, tetracycline (Tc) 30μg/mL, and spectinomycin (Sp) 100μg/mL.

Construction of plasmids and mutant strains

DNA fragments of 2336, 2833, 663, and 435 bp containing the *spoT*, *relA*, *dksA*, or *rpoZ* genes respectively, were amplified using oligonucleotides spoT-Fw, spoT-Rv, relA-Fw, relA-Rv, dksA-Fw, dksA-Rv, rpoZ-Fw, and rpoZ-Rv, respectively. These fragments were cloned into pJET1.2/blunt vector to generate plasmids pJETspoT, pJETrelA pJETdksA and pJETrpoZ. Restriction sites *Apa*I, *Sal*I, inside *spoT* and *rpoZ* respectively were used to insert a Gm cassette obtained from plasmid pBSL98. Km and Sp cassettes from pBSL99 and pHP45W-Km plasmids were inserted into *Sac*I and *Sma*I sites inside *relA* and *dksA* genes. In *A. vinelandii*, the insertion of Gm, Km or Sp cassettes into genes with same orientation as the direction of transcription, produces non-polar mutations which allow transcription of downstream genes in the same operon [33]. The resultant plasmids pJETspoT::Gm, pJETrpoZ::Gm, pJETrelA::Km, and pJETdksA::Sp were confirmed to carry the cassettes cloned in the same direction of transcription of the mutated gene. Plasmids pJETrpoZ::Gm, pJETrelA::Km and pJETdksA::Sp were digested with *Sca*I and used to transform *A. vinelandii* UW136 strain. Linearization of these

Table 1. Strains and plasmids, used in this study.

Strain	Description	Reference
E. coli DH5 **α**	endA1 hsdR17 supE44 thi-1λ-recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15).	[28]
UW136	*A. vinelandii* wild type strain	[29]
UW*rpoZ*	UW136 derivative carrying a *rpoZ*::Gm non polar mutation	This study
UW*relA*	UW136 derivative carrying a *relA*::Km mutation	This study
UW*dksA*	UW136 derivative carrying a *dksA*::Sp mutation	This study
UW*relA/spoT*	UW136 derivative carrying a *relA*::Km and *spoT*::Gm mutations	This study
UW*relA/dksA*	UW*relA* carrying a *dksA*::Sp mutation.	This study
UW*dksA/dksA*$^+$	UW *dksA* carrying pJETdksAAC-Km cointegrated into the chromosome	This study
UW*relA/relA*$^+$	UW*relA* carrying a wild type *relA* gene transcribed from a *gyrA* promoter	This study
UW*rpoS*::*gusA-P1*	UW136 carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* promoter P1	This study
UW*rpoS*::*gusA-P2*	UW136 carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* promoter P2	This study
UW*rpoS*::*gusA-P3*	UW136 carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* promoter P3	This study
UW*rpoS*::*gusA-AP*	UW136 carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* P1, P2 and P3 promoters	This study
UW*dksA/rpoS*::*gusA-P1*	UW*dksA* carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the rpoS promoter P1	This study
UW*dksA/rpoS*::*gusA-P2*	UW*dksA* carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* promoter P2	This study
UW*dksA/rpoS*::*gusA-P3*	UW*dksA* carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* promoter P3	This study
UW*dksA/rpoS*::*gusA-AP*	UW*dksA* carrying a *rpoS*::*gusA* gene fusion transcribed from the *rpoS* P1, P2 and P3 promoters	This study
UW*dksA/rpoS*$^+$	UW *dksA* derivative carrying an *rpoS* gene transcribed from a *gyrA* promoter.	This study
Plasmids		
pJET1.2	pJET1.2 blunt cloning vector.	Thermo Scientific
pBSL97	Plasmid with a Km cassette.	[30]
pBSL98	Plasmid with a Gm cassette.	[30]
pHP45Ω	Plasmid with omega Sp cassette.	[31]
pUMATc	pUC19 containing a 1kb fragment with the *melA* gene and a Tc cassette.	[32]
pUMATcgusAT	Vector with a *gusA* gene for transcriptional fusions.	[15]
pJET-gyrA	pJET1.2 carrying the promoter region of *gyrA*	[31]
pJETspoT	pJET with *spoT* gene.	This study
pJETrel*A*	pJET with locus *relA*.	This study
pJETdks*A*	pJET with *dksA* locus.	This study
pJETrpoZ	pJet with *rpoZ* gene.	This study
pJETspoT::Gm	pJET with *spoT* gene mutation.	This study
pJETrpoZ::Gm	pJET with *rpoZ*::Gm NP mutation.	This study
pJETrelA::*Km*	pJET with the *relA*::Km mutation.	This study
pJETdksA::Sp	pJET with *dksA*::Sp mutation.	This study
pJETdksAC	pJET with a *dksA* gene and its own promoter.	This study
pJETdksAC-Km	pJETdksAC with a Km-cassette.	This study
pJETrelAC	pJET with a *relA* gene	This study
pJETgyrA-relAC	pJET-gyrA with a *relA* gene from pJETrelAC	This study
pUMAgyrA-relA	pUMA plasmid with a *relA* gene transcribed from a *gyrA* promoter.	This study
pJETP1rpoS	pJET carrying a fragment with the *rpoS* P1 promoter	This study
pJETP2rpoS	pJET carrying a fragment with the *rpoS* P2 promoter	This study
pJETP3rpoS	pJET carrying a fragment with the *rpoS* P3 promoter	This study
pJETAPrpoS	pJET carrying a fragment with the *rpoS* P1, P2 and P3 promoters	This study
pUMAP1rpoS::gusA	pUMATc gusAT derivative carrying a *rpoS*::*gusA*P1 transcriptional fusion	This study
pUMAP2rpoS::gusA	pUMATcgusAT carrying a *rpoS*::*gusA*P2 transcriptional fusion	This study
pUMAP3rpoS::gusA	pUMATcgusAT carrying a *rpoS*::*gusA*P3 transcriptional fusion	This study
pUMAAPrpoS::gusA	pUMATcgusAT carrying a *rpoS*::*gusA*AP transcriptional fusion	This study

(*Continued*)

Table 1. (Continued)

Strain	Description	Reference
pJETrpoS	pJET 1.2 with a *rpoS* gene copy.	This study
pJETgyrA-rpoS	pJETgyrA plasmid with *rpoS* gene copy.	This study
pUMAgyrA-rpoS	pUMA plasmid with an *rpoS* gene transcribed from a *gyrA* promoter	This study

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299640.t001

plasmids was carried out to avoid plasmid cointegration into the chromosome, due to single recombination events. Transformants UW*rpoZ*, UW*relA*, and UW*dksA* resistant to Gm, Km or Sp respectively were selected from BS plates supplemented with the respective antibiotics. For the construction of UW*relA/spoT* UW*relA/dksA* double mutants, plasmids pJETspoT::Gm and pJETdksA::Sp were used to transform UW*relA* mutant. The presence of the *spoT*::*Gm*, *rpoZ*::Gm, *relA*::Km, and *dksA*::Sp mutations in these transformants was confirmed by PCR (data not shown).

For the construction of complemented UW*dksA*/*dksA*$^+$, a fragment containing *dksA* including its own promoter was amplified using oligonucleotides dksAC-Fw and dksA-C-Rev, that was cloned into pJET1.2 to generate plasmid pJETdksAC. A Km-cassette was inserted into a *Sca*I site (located within the pJET1.2), of pJETdksAC to produce plasmid pJETdksAC-Km. This plasmid unable to replicate in *A*. *vinelandii* was transformed into UW*dksA* strain. A Km resistant transformant UW*dksA*/*dksA*$^+$, that showed a higher PHB accumulation phenotype than its parental UW*dksA* was selected, and confirmed by PCR to carry pJETdksAC-Km that was cointegrated within the *dksA*::Sp gene by a single recombination event.

For construction of strain UW*relA/relA*$^+$, a 2273 bp fragment containing the *relA* gene was amplified using oligonucleotides relAC-Fw-XbaI and relAC-Rev-BamHI, cloned into pJET1.2 to produce pJETrelAC. An *Xba*I-*BamH*I fragment from this plasmid, was excised and cloned into pJETgyrA downstream and in the same direction of the p*gyrA* promoter producing plasmid pJETgyrA-relAC. A *Bgl*II fragment containing the p*gyrA-relA* fusion excised from this plasmid, was cloned into PUMA-Tc carrying the *A*. *vinelandii melA* gene that is used as a neutral site to introduce genes or gene fusions into the *A*. *vinelandii* chromosome [17, 34]. The resulting plasmid PUMAgyrA-relA was linearized and transformed into UW*relA* mutant for isolation of UW*relA/relA*$^+$ strains, a Tc resistant transformant where the p*gyrA-relA* fusion was integrated into the *melA* gene by a double recombination event.

Construction of strain UW*dksA/rpoS*$^+$. **O**ligonucleotides *rpoS-BamH*I Fw and *rpoS-Xba*I Rv were used to amplify a 1022 bp fragment containing the *rpoS* gene that was cloned into the pJET1.2 vector, resulting in plasmid pJET*rpoS*. A *Bam*HI and *Xba*I fragment containing the *rpoS* gene excised from this plasmid was cloned downstream and in the same orientation as the *gyrA* promoter into the pJET*gyrA* vector [17], to generate plasmid pJET*gyrA-rpoS*. A *Bgl*II fragment with the p*gyrA-rpoS* fusion obtained from this plasmid, was inserted into the *BamH*I site of the *A*. *vinelandii melA* gene of vector pUMA-*Tc* [34], producing plasmid pUMA*gyrA-rpoS*. This plasmid was linearized by *Sca*I digestion and transformed into the UW*dksA* strain, to isolate Tc resistant strain UW*dksA/rpoS*$^+$, that carries the *rpoS* gene transcribed from the *gyrA* promoter integrated within the *melA* gene.

To the construction of strains carrying transcriptional *gusA* gene fusions. DNA fragments of 171bp, 145bp, and 137bp containing the *rpoS* P1, P2, P3 promoters respectively, were amplified by PCR using the oligonucleotides: rpoS-P1-Fw and rpoS-P1-Rv, rpoS-P2-Fw and rpoS-P2-Rv, rpoS-P3-Fw and rpoS-P3-Rv. Oligos rpoS-P1-Fw and rpoSP3-Rv were used to obtain a 457pb fragment containing the three *rpoS* promoters (*rpoS* AP). Restriction sites for

*Xba*I and *Eco*RI were included in all oligonucleotides. These four fragments shown in S2 Fig were cloned into the pJET1.2 vector to produce plasmids pJETP1rpoS, pJETP2rpoS, pJETP3rpoS and pJETAPrpoS respectively. *Xba*I-*Eco*RI fragments from these plasmids were sequenced and cloned into plasmid pUMATc*gusA*T vector [17] generating plasmids pUMAP1rpoS::*gusA*, pUMAP2rpoS::*gusA*, pUMAP3rpoS::*gusA*, and pUMAAPrpoS::*gusA* respectively that were linearized by *Sca*I digestion and transformed into *A*. *vinelandii* UW136. Tc-resistant transformants were selected resulting in strains UW*rpoS*::*gusA*-P1, UW*rpoS*::*gusA*-P2, UW*rpoS*::*gusA*-P3, and UW*rpoS*::*gusA*-AP. Similarly, these plasmids were used to transform the UW*dksA* strain to generate strains UW*dksA/rpoS*::*gusA*P1, UW*dksA/rpoS*::*gusA*P2, UW*dksA/rpoS*::*gusA*P3, and UW*dksA/rpoS*::*gusA*AP. The integration of the *rpoS*::*gusA* transcriptional fusions by a double recombination event was confirmed by PCR.

Plasmid transformation

Plasmid transformation was carried out as previously described [34]. Briefly *A*. *vinelandii* cells were grown overnight in Burk's medium modified by the omission of the Fe and Mo salts. Aliquots of cells were mixed with plasmid DNA on plates of Burk's medium and incubated overnight at 30 C. The transformants were plated on selective Burk's medium with the corresponding antibiotic.

β-glucuronidase activity

The β-glucuronidase activity was determined as described [35], 1 U corresponds to 1 nmol of p-nitrophenyl-β-D-glucuronide hydrolyzed per minute per mg of protein and the results as represented as relative activity respect with to the wild type strain UW136. Protein was measured by the Lowry Method [36].

Western-blot assays

Detection of RpoS levels in *A*. *vinelandii* cells grown for 36 hours in PY medium was carried out by western blot analysis as previously described [15]. For the determination of *in vivo* stability of RpoS, the strains were grown as mentioned above and protein synthesis was stopped by adding kanamycin (0.5 mg/mL). Relative protein levels of RpoS were estimated by densitometry analyses in the ImageJ software [37].

In silico analysis

DNA and amino acid sequences of *relA*, *spoT*, *dksA*, and *rpoZ* from *A*. *vinelandii* were retrieved from KEGG. Nucleotide sequence alignments were done by NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search tool) using as a reference the *A*. *vinelandii* genome accession number NCBI ID 322710 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Conserved amino acid sequences were analyzed using the Clustal Omega program (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Quantitative real time PCR (RT-qPCR) and RNA-seq assay

For RT-qPCR experiments, total RNA was extracted from *A*. *vinelandii* strains grown in PY liquid medium at 36 hours and 30˚C. The RNA samples were extracted with TRIzol™ Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Thermo Scientific) as a manufacturer protocol. The quality and quantity of the RNA were determined by Nanodrop One^{C} (Thermo Scientific). 2μg of RNA were employed to treat with DNAse (Thermo Scientific) following manufacturing instructions. The Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit from Thermo Scientific was used to synthesize cDNA using reverse oligonucleotides listed in S1 Table. A PCR was carried

out for these cDNAs to confirm the correct synthesis. A LightCycler480 System (Roche Diagnostics) equipment and SyBR-Green were used for fluorescence quantification. A q-PCR assay corresponds to a 3 min preincubation at 95 C, 40 cycles at 60 C for 1 min with a 15 second interval between cycles. A *gyrA* gene was used as an internal control.

For RNA-seq analysis, an RNA extraction kit was employed (Total RNA Purification Kit, Jena Bioscience) according to manufacturer instructions. The analytical quality of RNA was determined using an Agilent Bioanalyzer 2100 system, before sequencing of ribosomal RNA-depleted RNA. The ribosomal depletion was carried out by RiboMinus rRNA depletion kit for bacteria (Thermo Fisher Scientific). Libraries were generated using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina). Sequencing was performed by NextSeq 500 (Illumina) with the kit NexSeq 500 High Output kit v2.5. The clean data was mapped to the reference genome of *A*. *vinelandii*

DJ from NCBI Genomes. The alignment was carried by Smalt software and the coverage was determined by CoverageBed from Bamtools software. The differential expression analysis was carried by IDEAMEX software (Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments) that use four packages, edgeR, DESeq2, limma, and NOISeq. The conjunction of the genes by these four packages determines the real differential expression between UW136 and UW*dksA* mutant.

The significantly differentially expressed genes (DEGs) were determined as $\log_2$ FC ±1, p-value <0.05, and counter per million >1 (CPM>1) are reported in S1 File. The biological relevance of the significant DEGs was estimated by list enrichment analysis and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [38]. The analysis of enrichment GO: terms were established at a $\log_2$ FC ±1 and FDR 0.05 [39, 40].

PHB quantification

PHB was extracted from cells grown in PY liquid at 30˚C and hydrolyzed with concentrated H_2SO_2 as described by Peña *et al* 1997 [41]. The crotonic acid produced by the PHB hydrolysis was measured using the method described by Law and Slepecky 1961 [42].

Supporting information

S1 Fig. The *rpoZ* and *spoT* genes are transcribed as a bicistronic operon. The non-polar mutation in UW*rpoZ* did not affect *spoT* transcription. (A) Physical map of the *A*. *vinelandii rpoZ* (Avin02820) and *spoT* (Avin02810) genes. The arrows indicate the oligonucleotides used to determine the transcript corresponding to the intergenic region of the *rpoZ-spoT* operon. (B) RT-PCR using total RNA from UW136 to amplify a 120 bp of the *rpoZ-spoT* intergenic region. Total DNA from UW136 was used as positive control. (C) Transcription of *spoT* in UW*rpoZ* compared with its parental UW136 strain, determined by RT-qPCR.
(TIF)

S2 Fig. Physical map of the *rpoS* region including promoters P1, P2 and P3, and fragments used for the construction of the *rpoS-gusA* transcriptional fusions, and relative activity from P2 and P3 promoters in UW*dksA* strain. **(A)** The -10 and -35 regions for P1, P2, P3, promoters are indicated by small squares. The DNA fragments used for the construction of *rpoS*::gusA fusions are represented as rectangles. **(B)** and **(C)**. Relative -glucuronidase activity in UW136 and UW*dksA* strains carrying P2rpoS::gusA and P3rpoS::gusA fusions respectively.
(TIF)

S3 Fig. The ribosomal proteins and some enzymes of the glycolysis and pyruvate synthesis are differentially expressed in the UW*dksA* strain. A. Expression profile of ribosomal

proteins in UW*dksA*. **B.** Glycolysis and pyruvate pathways from *A*. *vinelandii* KEGG pathways, that showed differential expression in UW*dksA* respect to wild type.
(TIF)

S1 Table. Oligonucleotides used in this study.
(PDF)

S1 Raw images.
(PDF)

S1 File. RNA-seq results. *Fold change* ±1 from UW*dksA* strain.
(TXT)

Acknowledgments

We thank E. Bustos and J. Yañez for oligonucleotide synthesis and DNA sequencing services.

Author Contributions

Conceptualization: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Guadalupe Espín.

Data curation: Cristian Camilo Ortiz-Vasco.

Formal analysis: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Guadalupe Espín.

Funding acquisition: Guadalupe Espín.

Investigation: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Guadalupe Espín.

Methodology: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Soledad Moreno, Luis Alonso Quintero-Navarro, Juliana Berenice Rojo-Rodríguez.

Project administration: Guadalupe Espín.

Resources: Guadalupe Espín.

Supervision: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Soledad Moreno, Guadalupe Espín.

Validation: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Soledad Moreno, Guadalupe Espín.

Writing – original draft: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Guadalupe Espín.

Writing – review & editing: Cristian Camilo Ortiz-Vasco, Guadalupe Espín.

References

1. Bange G, Brodersen DiE, Liuzzi A, Steinchen W. Two P or Not Two P: Understanding Regulation by the Bacterial Second Messengers (p)ppGpp. Annu Rev Microbiol. 2021; 75:383–406. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-042621-122343 PMID: 34343020
2. Gourse RL, Chen AY, Gopalkrishnan S, Sanchez-Vazquez P, Myers A, Ross W. Transcriptional Responses to ppGpp and DksA. Annu Rev Microbiol. 2018; 72:163–84. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062444 PMID: 30200857
3. Ross W, Sanchez-Vazquez P, Chen A, Lee JH, Burgos HL, Gourse RL. ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. Mol Cell [Internet]. 2016; 62(6):811–23. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.029 PMID: 27237053
4. Hengge R, Häussler S, Pruteanu M, Stülke J, Tschowri N, Turgay K. Recent Advances and Current Trends in Nucleotide Second Messenger Signaling in Bacteria. J Mol Biol. 2019; 431(5):908–27. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.014 PMID: 30668970

5. Sanchez-Vazquez P, Dewey CN, Kitten N, Ross W, Gourse RL. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019; 116(17):8310–9.

6. Brown L, Gentry D, Elliott T, Cashel M. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. J Bacteriol. 2002; 184(16):4455–65. https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002 PMID: 12142416

7. Rice CJ, Ramachandran VK, Shearer N, Thompson A. Transcriptional and post-transcriptional modulation of SPI1 and SPI2 expression by ppGpp, RpoS and DksA in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. PLoS One. 2015; 10(6):1–18.

8. Basu P, Pal RR, Dasgupta S, Bhadra RK. DksA-HapR-RpoS axis regulates haemagglutinin protease production in *Vibrio cholerae*. Microbiol (United Kingdom). 2017; 163(6):900–10.

9. Segura D, Cruz T, Espín G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-β-hydroxybutyrate synthesis. Arch Microbiol. 2003; 179(6):437–43.

10. Hernandez-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G. Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. Microbiology. 2011; 157(11):3014–23.

11. Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín L, Espin Ocampo EG. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- ℓ -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. J Bacteriol. 2002; 184(20):5672–7.

12. Senior PJ, Dawes EA. The regulation of poly β hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem J. 1973; 134(1):225–38.

13. Segura D, Espín G. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. Appl Environ Microbiol. 2004; 65:414–8.

14. Cocotl-Yañez M, Sampieri A, Moreno S, Núñez C, Castañeda M, Segura D, et al. Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology. 2011; 157 (6):1685–93.

15. Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez L, Castañeda M, Segura D, et al. The Unphosphorylated EIIA Ntr Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. PLoS One [Internet]. 2015;1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117184 PMID: 25642700

16. Juenger J, Borisova M, Mayer C, Wolz C, Brigham C, Sinskey A, et al. Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. Appl Environ Microbiol. 2017; 83(13):1–16.

17. Brigham CJ, Speth DR, Rha CK, Sinskey AJ. Whole-genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia eutropha* H16. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(22):8033–44.

18. Mozejko-Ciesielska J, Dabrowska D, Szalewska-Palasz A, Ciesielski S. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis by *Pseudomonas putida* KT2440 relA/spoT mutant: bioprocess characterization and transcriptome analysis. AMB Express. 2017; 7(1).

19. Sharma PK, Munir RI, Plouffe J, Shah N, de Kievit T, Levin DB. Polyhydroxyalkanoate (PHA) polymer accumulation and pha gene expression in phenazine (phz-) and pyrrolnitrin (prn-) defective mutants of *Pseudomonas chlororaphis* PA23. Polymers (Basel). 2018; 10(11).

20. Calderón-Flores A, Pont G Du, Huerta-Saquero A, Merchant-Larios H, Servín-González L, Durán S. The Stringent Response Is Required for Amino Acid and Nitrate Utilization, Nod Factor Regulation, Nodulation, and Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli* †. J Bacteriol. 2005; 187(15):5075–83.

21. Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(22):7823–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0501170102 PMID: 15899978

22. Boyle WK, Richards CL, Dulebohn DP, Zalud AK, Shaw JA, Lovas S, et al. DksA-dependent regulation of RpoS contributes to *Borrelia burgdorferi* tick-borne transmission and mammalian infectivity. PLoS Pathog. 2021; 17(2):1–29.

23. Cohen H, Adani B, Cohen E, Piscon B, Azriel S, Desai P, et al. The ancestral stringent response potentiator, DksA has been adapted throughout *Salmonella* evolution to orchestrate the expression of metabolic, motility, and virulence pathways. Gut Microbes [Internet]. 2022; 14(1):1–23. https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1997294 PMID: 34923900

24. Huang C, Li W, Chen J. Transcriptomic Analysis Reveals Key Roles of (p) ppGpp and DksA in Regulating Metabolism and Chemotaxis in *Yersinia enterocolitica*. Int J Mol Sci. 2023; 24(7612).

25. Kessler J, Cobe B, Richards G. Stringent response regulators contribute to recovery from glucose phosphate stress in *Escherichia coli*. Appl Enviromen Microbiol. 2017; 83(24)

26. Min KB, Yoon SS. Transcriptome analysis reveals that the RNA polymerase-binding protein DksA1 has pleiotropic functions in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem [Internet]. 2020; 295(12):3851–64. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011692 PMID: 32047111

27. Perron K, Comte R, Van Delden C. DksA represses ribosomal gene transcription in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. Mol Microbiol. 2005; 56(4):1087–102.

28. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983; 166(4):557–80.

29. Bishop PE, Brill WJ. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. J Bacteriol. 1977; 130(2):954–6.

30. Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. Gene. 1995; 160(1):63–7.

31. Fellay R, Frey J, Krisch H. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene. 1987; 52(2–3):147–54. https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90041-2 PMID: 3038679

32. Cocotl-Yañez M, Moreno S, Encarnación S, López-Pliego L, Castañeda M, Espín G. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. Microbiol (United Kingdom). 2014; 160(PART 3):479–87.

33. Mejía-Ruíz H, Guzmán J, Moreno S, Soberón-Chávez G, Espín G. The *Azotobacter vinelandii* alg8 and alg44 genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an algD-independent promoter. Gene. 1997; 199(1–2):271–7.

34. Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C. Excretion of ammonium by a nifL mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. Appl Environ Microbiol. 1992; 58(5):1711–8.

35. Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, Jefferson RA. β-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. Microbiology. 1995; 141(7):1691–705.

36. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem [Internet]. 1951; 193(1):265–75. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6 PMID: 14907713

37. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods. Nat Methods. 2012; 9(7):671–5.

38. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 2000; 28:27–30. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27 PMID: 10592173

39. Gu Z., Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. Bioinformatics. 2016; 32(18):2847–9. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313 PMID: 27207943

40. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Biocondutor package for pathway-based data integration and visualization. Bioinformatics. 2013; 29(14):1830–1.

41. Peña C, Campos N, Galindo E. Changes in alginate molecwlar mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. Appl Microbiol Biotechnol. 1997; 48(4):510–5.

42. Law JH, Slepecky RA. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. J Bacteriol. 1961; 82(1958):33–6.