

**Título: Metabolismo de poliaminas en bacterias fitopatógenas: su relación con la virulencia y la resistencia al estrés oxidativo.**

**Tesista:** Lic. Solmi, Leandro

**Dir:** Dr. Gárriz, Andrés

**Co-dir:** Dr. Rossi, Franco Rubén

**RESUMEN.**

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos gram-negativos móviles, con metabolismo aeróbico, pertenecientes a la clase de las *gammaproteobacterias*. Este género, notable por su diversidad genética, con más de 330 especies identificadas, prospera en diversos ambientes tales como suelo, agua y plantas, desempeñando funciones ecológicas fundamentales. La especie *Pseudomonas syringae* es una bacteria de gran relevancia en la agricultura debido a su capacidad para infectar una amplia gama de cultivos, lo que la convierte en uno de los patógenos más comunes en plantas. Se han identificado múltiples patovares dentro de esta especie, cada uno con una especificidad de hospedador distintiva. *P. syringae* muestra una estrategia de vida hemibiotrófica, valiéndose de los nutrientes obtenidos de células vivas de la planta en una primera etapa de la infección, para dar paso a una segunda etapa más tardía donde se observa la muerte de las células vegetales. Una vez que las células bacterianas alcanzan la superficie del hospedador, utilizan heridas o aperturas naturales tales como los estomas para colonizar el apoplasto vegetal, siendo éste el nicho donde prospera. Las plantas pueden reconocer directa o indirectamente la presencia del patógeno, elicitando una variedad de mecanismos de defensa para frenar su proliferación y evitar el desarrollo de la enfermedad. Entre estos mecanismos, se encuentra la generación de especies reactivas del oxígeno, lo que impone una situación de estrés oxidativo al microorganismo invasor. Así, para que la infección tenga éxito, los patógenos deben modular distintos mecanismos de virulencia a los fines de adaptarse o contrarrestar las modificaciones del entorno generadas por la planta. En este sentido, *P. syringae* hace uso de efectores que suprimen la respuesta inmune de la planta, produce exopolisacáridos y enzimas detoxificantes, lo que contribuye a su capacidad de persistencia y virulencia.

Las poliaminas son compuestos biológicos esenciales que presentan grupos aminos cargados positivamente a pH fisiológico, fundamentales en la unión a polianiones como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos de membranas. Entre las poliaminas más abundantes en bacterias, se encuentran la diamina putrescina (PUT) y la triamina espermidina (ESPD). Es crucial que los

niveles de estas moléculas estén regulados de forma precisa ya que, su exceso como su déficit, son perjudiciales para las células. Esto se logra controlando sus rutas metabólicas que incluyen la biosíntesis, degradación y transporte. Las poliaminas desempeñan funciones claves en múltiples aspectos de la biología bacteriana. En primer lugar, facilitan la condensación y estabilización del ADN, promueven la unión de proteínas al ARNm, regulan la permeabilidad de la membrana externa y, en el caso de bacterias patógenas, participan en la activación de mecanismos de virulencia y en la supervivencia en el interior de los tejidos del hospedador. En particular, se ha demostrado que son importantes en la tolerancia al estrés oxidativo.

Debido a que existen pocos trabajos que estudien el metabolismo de poliaminas en bacterias patógenas de plantas, este trabajo de tesis tubo como finalidad corroborar la hipótesis de que “El metabolismo de poliaminas es modulado en bacterias fitopatógenas durante su crecimiento en los tejidos vegetales, un proceso que juega un papel crucial en el desarrollo de la patogénesis”. El objetivo general fue evaluar de manera integral el papel de las poliaminas en bacterias patógenas de plantas, utilizando como modelo de estudio la cepa DC3000 del patovar *tomato* de *Pseudomonas syringae* (Pto). En relación con el objetivo general, los objetivos específicos fueron: **1-Explorar, mediante un meta-análisis de datos transcriptómicos públicos**, los perfiles de expresión de los genes del metabolismo de poliaminas en distintas bacterias durante la colonización de tejidos vegetales y en respuesta al estrés oxidativo, con énfasis en *P. syringae*, **2- Investigar el papel que cumple la biosíntesis de poliaminas en la tolerancia al estrés oxidativo** de la bacteria e identificar los mecanismos subyacentes, y **3-Evaluar la importancia de las poliaminas en la activación de mecanismos de virulencia** bacteriano y en la habilidad para infectar *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar, identificamos el conjunto de genes que participan del metabolismo de poliaminas en distintas bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, y utilizamos las bases de datos de estudios transcriptómicos para obtener una primera aproximación del patrón de expresión de estos genes durante la invasión de plantas hospedantes y en respuesta al estrés oxidativo. Nuestros análisis destacan una supresión relativa de los genes que participan en la síntesis de poliaminas en medios de cultivos inductores de la virulencia. De forma contraria, se encontró una leve inducción de los genes de esta ruta en los primeros estadios de la infección de plantas. Este hallazgo sugiere mecanismos de regulación diferencial que podrían estar relacionados con la adaptación de la bacteria al entorno del hospedador y a la respuesta inmune vegetal. Además, se revelaron patrones más complejos en la expresión de genes del catabolismo y transporte de poliaminas durante este proceso, aunque los genes que participan en la incorporación de poliaminas parecen estar inducidos en etapas más tardías, donde los de síntesis se ven

reprimidos. Por su parte, en estos análisis se encontró una regulación negativa de los genes biosintéticos en condiciones de estrés oxidativo, lo que desafía la idea convencional de que estas aminas funcionan como agentes protectores antioxidantes. En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de estudiar la modulación de la síntesis de poliaminas en *Pseudomonas syringae*, para comprender mejor la participación en la tolerancia al estrés y en la virulencia.

Inicialmente, se observó que *Pto* muestra una significativa resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde se retrasa el inicio de la fase de crecimiento exponencial bacteriano sin afectar la tasa de crecimiento posterior. Esta resistencia está asociada con la capacidad de la bacteria para desplegar mecanismos de tolerancia frente a este agente estresor. Se encontró además que *Pto* produce, en respuesta al estrés oxidativo, un incremento en la PUT extracelular, lo que estaría explicado por una posible inducción de la síntesis o secreción bajo estas condiciones de estrés. Para evaluar en mayor profundidad la funcionalidad de las poliaminas en estas condiciones, se construyeron cepas mutantes con deleciones en genes que participan de la síntesis de PUT ( $\Delta speA$ ,  $\Delta speC$ ,  $\Delta speA\Delta speC$ ) y ESPD ( $\Delta speE$ ). Demostramos así que, la perturbación en la síntesis de ESPD (cepa  $\Delta speE$ ) resulta en una mayor tolerancia al estrés oxidativo, lo que está relacionado a una mayor estabilidad de la membrana externa y a cambios en la regulación de las catalasas como KatB y KatG, siendo estas las principales enzimas encargadas de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos hallazgos destacan un papel crucial de las poliaminas en la respuesta de *Pto* al estrés oxidativo, mostrando cómo la regulación fina de estas moléculas puede influir en la capacidad de la bacteria para sobrevivir y persistir en entornos hostiles, como podría ser el interior de las plantas durante las infecciones. Por lo tanto, a continuación, exploramos el rol de las poliaminas en la activación de mecanismos de virulencia y en la patogenicidad en su hospedante *A. thaliana*.

Nuestras investigaciones demostraron que la deficiencia en la síntesis de PUT afecta negativamente la formación de *biofilms*, mientras que la ausencia de ESPD promueve su desarrollo, sugiriendo que estas moléculas presentan efectos contrastantes en la regulación de estas estructuras. Además, demostramos que las poliaminas participan en la adquisición de hierro mediante la síntesis de sideróforos como la pioverdina, la movilidad bacteriana y la capacidad de inhibir el cierre estomático. En el contexto vegetal, las poliaminas demostraron ser necesarias para activar correctamente el sistema de secreción tipo III (T3SS), esencial para la translocación de efectores bacterianos que suprimen las defensas de la planta. Finalmente, demostramos que la síntesis de PUT resulta esencial para la persistencia del patógeno en la superficie vegetal y en su multiplicación en el apoplasto. Mientras tanto, la ESPD sería necesaria

para el ingreso a la planta, aunque dispensable en los tejidos internos de la planta, ya que la bacteria puede nutrirse a partir de la ESPD de origen vegetal.

En conclusión, nuestro estudio revela un papel multifacético de las poliaminas en la virulencia bacteriana, destacando su capacidad para modular diversos mecanismos adaptativos y patogénicos que facilitan la colonización y supervivencia en el ambiente vegetal. Estos hallazgos no solo amplían nuestro entendimiento de la biología de la interacción planta-patógeno, sino que también sugieren nuevas estrategias para el control de enfermedades vegetales mediante la manipulación de las vías de síntesis de poliaminas en bacterias fitopatógenas.

**Palabras claves:** *Pseudomonas syringae*, Poliaminas, Estrés oxidativo, Virulencia

## **ABSTRACT.**

Bacteria of the genus *Pseudomonas* are motile gram-negative bacilli with aerobic metabolism, belonging to the class *gammaproteobacteria*. This genus, notable for its genetic diversity with more than 330 identified species, thrives in various environments such as soil, water, and plants, performing fundamental ecological functions. The species *Pseudomonas syringae* is highly significant in agriculture due to its ability to infect a wide range of crops, making it one of the most common plant pathogens. Multiple pathovars have been identified within this species, each with a distinctive host specificity. *P. syringae* exhibits a hemibiotrophic lifestyle strategy, utilizing nutrients from living plant cells in the initial stage of infection, leading to a later stage where plant cell death is observed. Once bacterial cells reach the host surface, they use wounds or natural openings such as stomata to colonize the plant apoplast, which is the niche where they thrive. Plants can directly or indirectly recognize the presence of the pathogen, eliciting a variety of defense mechanisms to inhibit its proliferation and prevent disease development. Among these mechanisms is the generation of reactive oxygen species, imposing oxidative stress on the invading microorganism. Thus, for the infection to succeed, pathogens must modulate various virulence mechanisms to adapt to or counteract the environmental changes induced by the plant. In this context, *P. syringae* employs effectors that suppress the plant's immune response, produces exopolysaccharides, and detoxifying enzymes, contributing to its persistence and virulence.

Polyamines are essential biological compounds with positively charged amino groups at physiological pH, crucial for binding to polyanions such as nucleic acids, proteins, and membrane phospholipids. Among the most abundant polyamines in bacteria are the diamine putrescine (PUT) and the triamine spermidine (SPD). It is crucial that the levels of these molecules are precisely regulated since both their excess and deficiency are detrimental to cells. This is achieved by controlling their metabolic pathways, including biosynthesis, degradation, and transport. Polyamines play key roles in multiple aspects of bacterial biology. Firstly, they facilitate DNA condensation and stabilization, promote protein binding to mRNA, regulate outer membrane permeability, and in pathogenic bacteria, participate in activating virulence mechanisms and survival within host tissues. Specifically, they have been shown to be important in tolerance to oxidative stress.

Due to the scarcity of studies on polyamine metabolism in plant pathogenic bacteria, this thesis aimed to corroborate the hypothesis that "Polyamine metabolism is modulated in

phytopathogenic bacteria during their growth in plant tissues, a process playing a crucial role in pathogenesis development." The general objective was to comprehensively evaluate the role of polyamines in plant pathogenic bacteria, using the *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000 (*Pto*) as a study model. Regarding the general objective, the specific objectives were: 1- To explore, through a meta-analysis of public transcriptomic data, the expression profiles of polyamine metabolism genes in different bacteria during plant tissue colonization and in response to oxidative stress, with an emphasis on *P. syringae*, 2- To investigate the role of polyamine biosynthesis in bacterial oxidative stress tolerance and identify underlying mechanisms, and 3- To assess the importance of polyamines in activating bacterial virulence mechanisms and the ability to infect *Arabidopsis thaliana*.

Firstly, we identified the set of genes involved in polyamine metabolism in different *Pseudomonas* species and used transcriptomic study databases to obtain an initial approximation of the expression patterns of these genes during plant host invasion and in response to oxidative stress. Our analyses highlight a relative suppression of genes involved in polyamine synthesis in virulence-inducing culture media. Conversely, a slight induction of genes in this pathway was found in the early stages of plant infection. This finding suggests differential regulatory mechanisms that might be related to bacterial adaptation to the host environment and plant immune response. Additionally, more complex patterns in the expression of catabolism and polyamine transport genes were revealed during this process, although the genes involved in polyamine uptake seem to be induced in later stages, where synthesis genes are repressed. Furthermore, these analyses found negative regulation of biosynthetic genes under oxidative stress conditions, challenging the conventional idea that these amines function as protective antioxidants. Together, these findings underscore the importance of studying polyamine synthesis modulation in *Pseudomonas syringae* to better understand their role in stress tolerance and virulence.

Initially, it was observed that *Pto* shows significant resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, where the onset of bacterial exponential growth phase is delayed without affecting the subsequent growth rate. This resistance is associated with the bacteria's ability to deploy tolerance mechanisms against this stressor. Additionally, *Pto* produces an increase in extracellular PUT in response to oxidative stress, possibly explained by an induced synthesis or secretion under these stress conditions. To further evaluate polyamine functionality under these conditions, mutant strains with deletions in genes involved in PUT ( $\Delta speA$ ,  $\Delta speC$ ,  $\Delta speA\Delta speC$ ) and SPD ( $\Delta speE$ ) synthesis were constructed. We demonstrated that disruption of SPD synthesis results in greater oxidative stress

tolerance, related to increased outer membrane stability and regulation changes in catalases like KatB and KatG, the main enzymes responsible for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition. These findings highlight a crucial role for polyamines in *Pto*'s oxidative stress response, showing how fine regulation of these molecules can influence bacterial survival and persistence in hostile environments, such as within plants during infections. Therefore, we subsequently explored the role of polyamines in activating virulence mechanisms and pathogenicity in its host *A. thaliana*.

Our investigations demonstrated that PUT synthesis deficiency negatively affects biofilm formation, whereas SPD absence promotes its development, suggesting these molecules have contrasting effects in regulating these structures. Additionally, we showed that polyamines participate in iron acquisition through siderophore synthesis like pyoverdine, bacterial motility, and the ability to inhibit stomatal closure. In the plant context, polyamines proved necessary for properly activating the type III secretion system (T3SS), essential for translocating bacterial effectors that suppress plant defenses. Finally, we demonstrated that PUT synthesis is essential for pathogen persistence on the plant surface and multiplication in the apoplast. Meanwhile, SPD is necessary for plant entry, though dispensable in the plant's internal tissues, as the bacteria can utilize plant-derived SPD.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae*, Polyamines, Oxidative stress, Virulence.