



Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

Caracterització del *quorum sensing*  
regulat per les N-acil-L-homoserina lactonas en  
*Stenotrophomonas maltophilia*

**Paula Martínez Alcalá**

Abril 2014





**Universitat Autònoma de Barcelona**

Parc de Recerca UAB

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina

Departament de Genètica i de Microbiologia



Caracterització del *quorum sensing*  
regulat per les N-acil-L-homoserina lactonas en  
*Stenotrophomonas maltophilia*

Tesi Doctoral presentada per **Paula Martínez Alcalá** per optar al Grau de **Doctora** per la Universitat Autònoma de Barcelona. Programa de doctorat en **Microbiologia** de la Facultat de Biociències.

Vist-i-plau dels Directors de la Tesi,

**Dr. Isidre Gibert González**

**Dra. Raquel Planell Cerezo**

**Dr. Daniel Yero Corona**

Bellaterra, Abril 2014



*“Si neix en tu el gust de descobrir coses,  
no deixaràs mai de sentir la necessitat d’anar  
cada cop més lluny.”*

Muntanyes d’una vida, Walter Bonatti



*A la meva mare i al meu pare*





*Índex*

---



## ÍNDEX

ÍNDEX.....	xi
RESUM.....	xix
ABREVIATURES I ACRÒNIMS.....	xxiii
Taula d'abreviatures de les molècules N-acil-L- homoserina lactona.....	xxvi
Taula d'abreviatures dels nucleòtids de DNA/RNA- .....	xxvi
Taula d'abreviatures dels Aminoàcids .....	xxvi
1. INTRODUCCIÓ.....	3
1.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> : característiques més rellevants.....	3
1.2. Característiques generals del <i>quorum sensing</i> .....	6
1.2.1. <i>Vibrio fischeri</i> : primer model de <i>quorum sensing</i> descrit. ....	7
1.2.2. Classificació dels diferents sistemes de <i>quorum sensing</i> en funció de les molècules autoinductores secretades.....	9
1.3. <i>Quorum sensing</i> regulat per les N-acil-L-homoserina lactona .....	12
1.3.1. Proteïnes sintases d'AHLs. ....	13
1.3.2. Estructura, transport i acumulació de les AHLs.....	14
1.3.3. Proteïnes del tipus LuxR. ....	16
1.4. La producció d'AHLs és àmpliament estesa entre els bacteris gram negatius.....	18
1.5. Diversificació de múltiples sistemes de <i>quorum sensing</i> regulats per AHLs i altres molècules autoinductores.....	20
1.6. AHLs i senyalització interespècie.....	21
1.7. LuxR “solo” .....	22
1.7.1. LuxR “solo” en bacteris productors i no productors d'AHLs. ....	23
1.7.2. Evolució dels LuxR “solo”. ....	26
1.8. Afectació del <i>quorum sensing</i> en el procés de formació de biofilm i motilitat.....	27
1.8.1. Influència del <i>quorum sensing</i> en el procés de formació de biofilms. ....	27
1.8.2. Influència del <i>quorum sensing</i> en la motilitat.....	31
1.9. L'ús d'inhibidors de <i>quorum sensing</i> com a diana terapèutica.....	33
1.9.1. Tipus d'inhibidors de <i>quorum sensing</i> regulat per AHLs.....	34
1.9.2. Aplicacions dels inhibidors de <i>quorum sensing</i> .....	37
1.10. Detecció d'AHLs mitjançant bacteris biosensors. ....	38
1.10.1. Mètodes i usos de les soques biosensores. ....	39
1.10.2. Tipus de soques biosensores.....	41

1.11. El <i>quorum sensing</i> en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	45
2. OBJECTIUS.....	51
3. MATERIALS I MÈTODES .....	55
3.1. Soques bacterianes i plasmidis.....	55
3.1.1. Condicions de creixement de les soques bacterianes. ....	55
3.1.2. Condicions de conservació i manteniment de les soques bacterianes. ....	55
3.2. Medis de cultiu, antibiòtics, AHLs i altres solucions.....	57
3.2.1. Medis de cultiu. ....	57
3.2.2. Antibiòtics.....	58
3.2.3. Molècules N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) sintètiques.....	59
3.2.4. Altres solucions.....	59
3.3. Bioassaig per a detectar AHLs mitjançant soques biosensores.....	60
3.3.1. Soques biosensores seleccionades.....	60
3.3.2. Bioassaigs per a detectar AHLs en placa de Petri.....	61
3.4. Tractament i extracció de sobrenedant.....	63
3.5. Cromatografia líquida d'alta resolució o de fase reversa (RP-HPLC).....	64
3.5.1. Separació de sobrenedants i AHLs sintètiques mitjançant HPLC.....	65
3.5.2. Bioassaig de les fraccions provinents de HPLC. ....	65
3.6. Cromatografia en Capa Fina (CCF).....	65
3.6.1. Separació dels sobrenedants i AHLs sintètiques mitjançant CCF.....	66
3.6.2. Detecció d'AHLs mitjançant bioassaig sobre les plaques de CCF.....	67
3.7. Identificació d'AHLs amb l'espectrometre de masses.....	67
3.8. Mètodes de manipulació del DNA.....	69
3.9. Seqüenciació de DNA.....	70
3.10. Mètodes de transferència de DNA plasmídic.....	71
3.10.1. Preparació d'electrocompetents de <i>S. maltophilia</i> i <i>P. aeruginosa</i> .....	71
3.10.2. Electroporació de <i>S. maltophilia</i> i <i>P. aeruginosa</i> .....	72
3.11. Mutagènesi en <i>S. maltophilia</i> E77.....	72
3.12. Complementació de mutacions en <i>S. maltophilia</i> E77.....	75
3.13. Anàlisi de l'expressió gènica.....	76
3.13.1. Construcció de fusions transcripcionals amb el gen indicador <i>lacZ</i> . ....	76
3.13.2. Assaig de l'activitat de la $\beta$ -galactosidasa.....	76
3.14. Mètodes de manipulació de proteïnes.....	79
3.14.1. Sobreproducció de proteïnes recombinants en <i>E. coli</i> BL21 (DE3). ....	79

3.14.2. Electroforesi de proteïnes. ....	80
3.15. Assaig d'unió a AHLs. ....	81
3.16. Assaigs de formació de biofilms. ....	82
3.16.1. Biofilms en plaques de poliestirè de 96 pous. ....	82
3.16.2. Biofilms en tubs de vidre. ....	83
3.16.3. Biofilms en cambres de flux. ....	83
3.17. Motilitat del tipus <i>swarming</i> . ....	85
3.17.1. Estudi de la motilitat del tipus <i>swarming</i> a partir de l'addició de diferents mostres a les plaques de <i>swarming</i> . ....	85
3.18. Anàlisi estadístic. ....	86
3.19. Anàlisi bioinformàtic. ....	86
3.19.1. Bases de dades. ....	86
3.19.2. Anàlisi de gens i proteïnes. ....	86
3.19.3. Altres programaris utilitzats. ....	87
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	91
4.1. Detecció de molècules senyal del tipus AHL produïdes per soques clíniques de <i>S. maltophilia</i> . ....	91
4.1.1. Bioassaig en placa a partir de la sembra en forma de "T". ....	91
4.1.2. Bioassaig en placa a partir de tip de colònia. ....	92
4.1.3. Bioassaig en placa a partir de sobrenedants totals concentrats. ....	93
4.2. Separació del sobrenedant concentrat de <i>S. maltophilia</i> per HPLC. ....	94
4.2.1. Separació i purificació per HPLC de les AHLs sintètiques. ....	94
4.2.2. Separació dels sobrenedants concentrats de <i>S. maltophilia</i> i purificació de les AHLs presents per HPLC. ....	96
4.3. Caracterització de les AHLs presents en els sobrenedants de <i>S. maltophilia</i> per CCF. ....	98
4.3.1. CCF dels sobrenedants totals concentrats de <i>S. maltophilia</i> i fraccions positives HPLC amb suport de <i>Silica gel 60</i> . ....	99
4.3.2. CCF dels sobrenedants totals concentrats de <i>S. maltophilia</i> amb suport de C <sub>18</sub> de fase reversa. ....	101
4.4. Caracterització de les AHLs presents en els sobrenedants de <i>S. maltophilia</i> E77 per MS/MS. ....	103
4.5. Anàlisi <i>in silico</i> de les proteïnes implicades en el sistema de <i>quorum sensing</i> regulat per les AHLs en <i>S. maltophilia</i> . ....	105

4.5.1. Conservació i característiques de la proteïna reguladora LuxR en <i>S. maltophilia</i> .....	105
4.5.2. Cerca d'AHLS sintases homòlogues en el genoma de <i>S. maltophilia</i> .....	110
4.6. Mutagènesi dels gens seleccionats <i>in silico</i> implicats en el sistema de <i>quorum sensing</i> regulat per les AHLs en <i>S. maltophilia</i> E77. ....	114
4.6.1. Deleció del gens <i>smlt1839</i> i <i>smlt4572</i> que codifiquen per a una proteïna hipotètica reguladora LuxR i una sintasa HdtS respectivament en <i>S. maltophilia</i> E77. ....	114
4.6.2. Comprovació de <i>S. maltophilia</i> E77 mutant pel gen <i>smlt1839</i> - regulador LuxR homòleg.....	115
4.6.3. Comprovació de <i>S. maltophilia</i> E77 mutant pel gen <i>smlt4572</i> - sintasa hipotètica del tipus HdtS.....	116
4.7. Caracterització de la unió del regulador LuxR de <i>S. maltophilia</i> E77 a diferents AHLs sintètiques.....	117
4.7.1. Sobreproducció de la proteïna LuxR de <i>S. maltophilia</i> E77 en el vector d'expressió pET22b en presència d'AHLS sintètiques.....	118
4.7.2. Anàlisi i caracterització de la unió LuxR-AHL en el suport de CCF C <sub>18</sub> de fase reversa.....	119
4.8. Estudi del promotor del gen <i>luxR</i> . ....	121
4.8.1. Cerca del promotor del gen <i>luxR in silico</i> . ....	121
4.8.2. Activitat β-galactosidasa sota el promotor hipotètic <i>PluxR</i> .....	125
4.8.3. Cerca <i>in silico</i> de la caixa <i>lux</i> en el promotor funcional del gen <i>luxR</i> . ....	128
4.9. Anàlisi funcional del gen <i>smlt4572</i> en <i>S. maltophilia</i> E77. ....	130
4.9.1. Caracterització a nivell de producció d'AHLS de la soca mutant E77 Δ <i>smlt4572</i> .....	130
4.10. Anàlisi funcional del gen <i>smlt1839</i> en <i>S. maltophilia</i> E77.....	130
4.10.1. Formació de biofilms en <i>S. maltophilia</i> E77 i en el mutant E77Δ <i>smlt1839</i> . ....	130
4.10.2. Motilitat del tipus <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77 i en el mutant E77Δ <i>smlt1839</i> .....	134
4.11. Efecte dels inhibidors de <i>quorum sensing</i> en <i>S. maltophilia</i> E77. ....	136
4.11.1. Efecte de l'enzim lactonasa AiiA com a IQS en la formació de biofilms. ..	137
4.11.2. Efecte de l'enzim lactonasa AiiA com a IQS en la motilitat del tipus <i>swarming</i> . ....	138
4.12. Estimulació del <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77. ....	139

4.12.1. Efecte del sobrenedant concentrat total de <i>P. aeruginosa</i> MPA01.....	139
4.12.2. Efecte del sobrenedant concentrat total de <i>P. aeruginosa</i> MPA01 que expressa de forma heteròloga del gen <i>aiiA</i> de <i>B. subtilis</i> A24.....	140
4.12.3. Efecte de les fraccions obtingudes per HPLC a partir de la separació del sobrenedant de <i>P. aeruginosa</i> MPA01.....	144
4.12.4. Efecte de les AHLs sintètiques sobre el <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77.....	146
4.13. Complementació del biofilm en <i>S. maltophilia</i> E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> .....	147
4.14. Complementació del <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> .....	148
5. DISCUSSIÓ GENERAL .....	151
5.1. Detecció i caracterització de les AHLs en el sobrenedant de diferents soques clíniques de <i>S. maltophilia</i> .....	151
5.2. Caracterització de la funcionalitat del domini d'unió a AHLs del regulador LuxR de <i>S. maltophilia</i> E77.....	155
5.3. Cerca del promotor <i>luxR</i> en <i>S. maltophilia</i> i estudi de l'expressió del regulador <i>luxR</i> en la soca E77.....	156
5.4. Participació del regulador LuxR en la formació de biofilms en <i>S. maltophilia</i> E77.....	158
5.5. Participació del regulador LuxR en la motilitat del tipus <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77.....	160
5.6. Estratègies per a la complementació de la soca mutant pel gen <i>luxR</i> en <i>S. maltophilia</i> E77.....	162
5.7. Efecte de les AHLs en la motilitat del tipus <i>swarming</i> en <i>S. maltophilia</i> E77.....	164
5.8. Present i futur de l'estudi del QS bacterià.....	165
6. CONCLUSIONS.....	169
7. BIBLIOGRAFIA .....	175





*Resum*

---



## RESUM

Els senyals de *quorum sensing* (QS) del tipus N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) són les molècules predominants detectades entre els proteobacteris. En el sistema de QS regulat per les AHLs intervenen dues proteïnes que pertanyen a la família del tipus LuxI i LuxR. Les proteïnes LuxI sintetitzen AHLs que interactuen amb un domini específic de les proteïnes LuxR. Aquest complex s'uneix a seqüències promotores específiques i permeten a la població bacteriana coordinar l'expressió gènica. En molts bacteris gram negatius, aquest sistema regula factors de virulència.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la identificació i caracterització de les molècules senyal del tipus AHLs i determinar diferents fenotips associats al QS mitjançant l'estudi del regulador del sistema (*luxR*) en *Stenotrophomonas maltophilia*, un patògen humà oportunista intrahospitalari emergent. Així, l'estudi s'ha centrat en primer terme en la detecció d'AHLs en diferents aïllats clínics d'aquest patògen, en concret de les soques E77, M30 i K279a. La detecció d'AHLs s'ha dut a terme emprant la soca biosensora d'*Agrobacterium tumefaciens* KYC55 i, posteriorment, les AHLs s'han caracteritzat per espectrometria de masses. S'ha fet també un estudi del promotor del gen *luxR*, que ha permès identificar que l'expressió d'aquest gen és depenent de la fase de creixement. A més a més, s'ha demostrat que el domini d'unió a AHLs del regulador LuxR és capaç d'unir-se a aquestes molècules senyal. A nivell fenotípic s'ha investigat la implicació de LuxR en la formació de biofilms i en la motilitat del tipus *swarming*. Els resultats han demostrat la influència de LuxR en els dos fenotips tal i com s'ha descrit per altres LuxR homòlegs. Tanmateix, s'ha apreciat la inhibició d'ambdós processos quan s'ha usat com a inhibidor de QS (IQS) l'enzim AiiA, procedent de *Bacillus subtilis*, el qual hidrolitza les AHLs. Per últim, s'ha posat de manifest l'efecte estimulador que exerceix el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 sobre el *swarming* de *S. maltophilia*.

El fet d'haver estat capaços d'identificar i caracteritzar les AHLs i el regulador d'aquest sistema (LuxR), ens ha dut a cercar la sintasa (LuxI) entre els diferents genomes publicats. Tot i així, l'aproximació utilitzada en aquest treball no ens ha permès determinar la proteïna LuxI i, per tant, continua sent un objectiu obert que caldrà resoldre.

Fins a dia d'avui, només el sistema de QS regulat per la molècula senyal anomenada *Diffusible signal factor* (DSF), ha estat ben estudiat en aquesta espècie. Els resultats obtinguts evidencien que en *S. maltophilia* podrien coexistir diferents sistemes de comunicació, un mediat pel DSF i un segon per les AHLs.



## *Abreviatures i Acrònims*

---



## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

%	Tant per cent
[wt/vol]	Relació aigua/volum
°C	Graus Centígrads
A <sub>550nm</sub>	Absorvència a 550nm
aa	Aminoàcids
Abs	Absorbància
Acil-PTA	Proteïna Transportadora de Acil
ACN	Acetonitril
AHL/AHLs	N-acil-L-homoserina lactona/ss
AI	Molècula autoinductora
AI-1	Autoinductor del tipus 1
AI-2	Autoinductor del tipus 2
AI-3	Autoinductor del tipus 3
AIPs	<i>Around cyclic autoinducer peptides</i>
AT	Medi de cultiu per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATCC	Col·lecció americana de cultius tipus ( <i>American Type Culture Collection</i> )
Bcc	Complex de <i>Burkholderia cepacia</i>
BD	Braç Dret
BE	Braç Esquerre
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Blastn	<i>Nucleotid BLAST</i>
Blastp	<i>Protein BLAST</i>
BrEt	Bromur d'Etidi
c-	Centi
CCF	Cromatografia en Capa Fina
cel/mL	Cèl·lules per mil·lilitre
CFTCR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CMI	Concentració Mínima Inhibitòria
C-terminal	Extrem carboxi-terminal
CV	Cristall Violeta
Da	Daltons
DMF	N,N dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Àcid desoxirribonucleic ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxirribonucleòtid trifosfat
DSF	<i>Diffusible signal factor</i>
EPS	Exopolisacàrids o polisacàrids extracel·lulars
Erm	Eritromicina
<i>et al.</i>	I col·laboradors (del llatí <i>et alter</i> )
eV	Electró-Volt
F	Constant de Faraday

## Abreviatures i Acrònims

<b>F(num)</b>	Fracció HPLC número
<b>FQ</b>	Fibrosi Quística
<b>g</b>	Grams
<b><i>g</i></b>	RCF ( <i>Relative Centrifugal Force</i> )
<b>GC</b>	Guanina i Citosina
<b>GEIs</b>	Illes genòmiques
<b>Gfp</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>Gm</b>	Gentamicina
<b>h</b>	Hora
<b>HCl</b>	Àcid clorhídric
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució ( <i>High pressure liquid chromatography</i> )
<b>HSL</b>	Homoserina Lactona
<b>HTH</b>	<i>Helix-turn-helix</i>
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IPTG</b>	Isopropil-b-D-tiogalactopiranosid
<b>IQS</b>	Inhibidor de <i>quorum sensing</i>
<b>k-</b>	Quilo
<b>kb</b>	Quilo bases
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>L</b>	Litres
<b>LB</b>	Medi Luria-Bertani
<b>LPLAT</b>	Aciltransferasa de biosíntesi de lisofosfolípids
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>m-</b>	Mil·li
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	Metres
<b><i>m/z</i></b>	Massa/càrrega
<b>MALDI-TOF</b>	Desorció/ionització laser assistida per matriu-temps de vol ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i> )
<b>MCS</b>	Lloc de clonatge múltiple ( <i>Multiple cloning site</i> )
<b>MDR</b>	<i>Multidrug Resistant</i>
<b>MDRO</b>	<i>Multiple-drug-resistant organism</i>
<b>MEGA</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<b>min</b>	Minuts
<b>MS</b>	Espectrometria de masses
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de masses en tàndem
<b>MW</b>	Masa molecular
<b>n-</b>	Nano
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Informació en Biotecnologia, ( <i>National Center of Biotechnology Information</i> )
<b>nt</b>	Nucleòtids
<b>N-terminal</b>	Extrem amino-terminal
<b>OD</b>	Densitat òptica ( <i>Optical density</i> )
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>ONPG</b>	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactòsid



<b>ORF</b>	Marc obert de lectura ( <i>Open Reading frame</i> )
<b>ORI</b>	Origen de replicació
<b>PAB</b>	<i>Plant Associated Bacteria</i>
<b>pb</b>	Parell de bases
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PFAM</b>	<i>Protein families</i>
<b>Plasmidi Ti</b>	Plasmidi Inductor de tumors
<b>PlsC</b>	1-acil-sn-glicerol-3-fosfat aciltransferasa
<b>PQS</b>	Quinolona senyal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PSI-BLAST</b>	Position Specific Iterated BLAST
<b>Q</b>	Quantificació
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>QS-AHL</b>	<i>Quorum sensing</i> regulat per AHLs
<b>Q-TOF</b>	Analitzador de masses Quadrupol- Temps de vol
<b>RBS</b>	Lloc d'unió del ribosoma ( <i>Ribosome binding site</i> )
<b>R<sub>f</sub></b>	Valor de Ràtio o Front
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic ( <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>RND</b>	<i>Resistance-nodulation-division</i>
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució de fase reversa ( <i>Reversed phase-HPLC</i> )
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic (Sodium dodecyl sulfate)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS ( <i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
<b>SN</b>	Sobrenedant
<b>Spc</b>	Spectinomicina
<b>T.E</b>	Estria en forma de "T"
<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>TFA</b>	Àcid trifluoroacètic ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
<b>TLC</b>	Cromatografia en capa fina ( <i>Thin layer chromatography</i> )
<b>TMP-SMX</b>	Trimetoprim-Sulfametoxazol
<b>UM</b>	Unitats Miller
<b>V</b>	Volts
<b>v/v</b>	Relació volum/volum
<b>WT</b>	Salvatge ( <i>Wild-Type</i> )
<b>Xcc</b>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranòsid
<b>Xoo</b>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
<b>Δ</b>	Defectiu
<b>Δt</b>	Diferència de temps (temps final-temps inicial)
<b>μ-</b>	Micro-
<b>Ω</b>	Ohm

**Taula d'abreviatures de les molècules N-acil-L- homoserina lactona**

<b>Nom</b>	<b>Compost químic</b>
<b>C4-HSL</b>	N-Butanoil-L-homoserina lactona
<b>C6-HSL</b>	N-Hexanoil-L-homoserina lactona
<b>C8-HSL</b>	N-Octanoil-L-homoserina lactona
<b>C10-HSL</b>	N-Decanoil-L-homoserina lactona
<b>C12-HSL</b>	N-Dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14-HSL</b>	N-Tetradecanoil-L-homoserina lactona
<b>C4oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Butanoil-L homoserina lactona
<b>C6oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Hexanoil-L-homoserina lactona
<b>C8oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Octanoil-L-homoserina lactona
<b>C10oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Decanoil-L-homoserina lactona
<b>C12oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14oxo-HSL</b>	N-3-oxo-Tetradecanoil-L-homoserina lactona
<b>C4OH-HSL</b>	N-3-hidroxi-Butanoil-L homoserina lactona
<b>C12OH-HSL</b>	N-3-Hydroxidodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14OH-HSL</b>	N-3-hidroxi-Tetradecanoil-L-homoserina lactona

**Taula d'abreviatures dels nucleòtids de DNA/RNA-**

<b>Nom de la Base Nitrogenada</b>	<b>Codi una lletra</b>
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T
Uracil	U

**Taula d'abreviatures dels Aminoàcids**

<b>Nom</b>	<b>Codi tres lletres</b>	<b>Codi una lletra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Àcid Aspàrtic	Asp	D
Cisteïna	Cys	C
Àcid Glutàmic	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptòfan	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## *Introducció*

---







## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. *Stenotrophomonas maltophilia*: característiques més rellevants.

*Stenotrophomonas maltophilia*, és un bacteri gram negatiu ambiental de la família Xanthomonadaceae dins de la classe dels gammaproteobacteris, aerobi obligat, que es pot trobar en una ampla varietat d'hàbitats, sovint aïllat de la rizosfera i diverses fonts d'aigua (Berg, *et al.*, 2005). Contràriament als gèneres filogenèticament propers de *Xanthomonas* i *Xylella*, cap espècie de *Stenotrophomonas* spp. no ha mostrat ser fitopatogènica (Ryan, *et al.*, 2009).

Aquesta espècie originalment va ser anomenada *Pseudomonas maltophilia* per Hugh i Ryschenkow (1961), però més tard, Swings, *et al.*, (1983) la va incloure dins del gènere de *Xanthomonas* abans d'adquirir el gènere propi anomenat *Stenotrophomonas* (Palleroni & Bradbury, 1993).

Tot i que *S. maltophilia* és un bacteri ambiental, durant la darrera dècada ha estat reconegut com un emergent patògen oportunista, que causa infeccions greus a pacients immunodeprimits. L'elevada incidència en infeccions intrahospitalàries, té una rellevància important degut al fenotip multiresistent que complica l'eradicació de la infecció i el converteix en un organisme anomenat MDRO, *multiple-drug-resistant organism* (Brooke, 2012). L'Organització Mundial de la Salut (OMS) l'ha catalogat com un dels principals patògens resistents a tot el món (Looney, *et al.*, 2009).

Les infeccions més recurrents causades per *S. maltophilia*, es localitzen generalment al tracte respiratori, sobretot en pacients de Fibrosi Quística (FQ), tot i que poden aparèixer en un ampli rang d'òrgans i teixits com, per exemple, poden causar bacterièmia, endocarditis i infeccions al tracte urinari (Brooke, 2012). Aquest microorganisme s'associa amb una alta taxa de mortalitat i és de gran preocupació en infeccions del torrent sanguini en pacients amb càncer i pacients amb catèters venosos centrals (Looney, *et al.*, 2009). També s'han comunicat diversos casos d'infeccions causades per *S. maltophilia* a la comunitat extrahospitalària (Falagas, *et al.*, 2009).

La FQ és un trastorn genètic hereditari comú, causat per la mutació en el gen que codifica la proteïna CFTR, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, que provoca l'obstrucció del transport d'ions i que acaba desencadenant alteracions en la immunitat innata

## Introducció

del pacient. Aquests defecte predisposa el pacient amb FQ a la colonització microbiana i a desenvolupar infeccions que tendeixen a convertir-se en cròniques (Pompilio, *et al.*, 2010). Tot i que *Pseudomonas aeruginosa* és el microorganisme que infecta en un percentatge major el pulmó (Lyczak, *et al.*, 2000), *S. maltophilia* ha guanyat atenció degut a la major incidència en infeccions nosocomials d'aquest tipus (Waters, *et al.*, 2007, Di Bonaventura, *et al.*, 2010, Waters, *et al.*, 2011).

Malgrat que *S. maltophilia* no és un patogen altament virulent, la major problemàtica en eradicar les infeccions que causa, rau en la resistència intrínseca a un ampli ventall d'antibiòtics, fet que suposa elevades taxes de mortalitat entre els pacients immunodeprimits. El fenotip MDR, *multidrug resistant*, dels bacteris gram negatius patògens nosocomials, generalment es deu a la sobreproducció de bombes de flux del tipus RND, *resistance-nodulation-division*, les quals tenen afinitat per un ampli rang de substrats com els solvents orgànics, desinfectants i antibacterians de moltes classes diferents. Els antibiòtics d'elecció per al tractament d'infeccions produïdes per *S. maltophilia* són escassos ja que s'ha descrit resistència intrínseca per a molts antibiòtics com, per exemple, per a famílies dels  $\beta$ -lactàmics, quinolones, aminoglicòsids i tetraciclina. Actualment, el tractament d'elecció per a les infeccions causades per *S. maltophilia* és la combinació dels antibiòtics Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX), tot i que ja s'han descrit aïllats resistents (Alonso & Martinez, 1997, Zhang, *et al.*, 2000, Nicodemo & Paez, 2007, Gulmez, *et al.*, 2010, Brooke, 2012). Són necessaris nous tractaments antimicrobians i noves teràpies per al tractament de les infeccions causades per *S. maltophilia* (Abbott, *et al.*, 2011, Brooke, 2014)

A més a més de la presència de diferents bombes de flux del tipus RND que afavoreixen la resistència antibiòtica, també s'associen altres factors a la resistència intrínseca de *S. maltophilia*, com per exemple la reducció de la permeabilitat de la membrana externa, canvis en l'estructura del lipopolisacàrid (LPS), l'adquisició d'integrans i transposons amb cassets de resistència, la producció de pigments com la melanina i la formació de biofilms (Crossman, *et al.*, 2008, Liaw, *et al.*, 2010).

En els darrers anys, diversos genomes de soques de *S. maltophilia* (K279a, R551-3, JV3 i D457) de diferents procedències, aïllats clínics o ambientals, han estat seqüenciats. S'han descrit mitjançant eines bioinformàtiques i anàlisis de genòmica funcional hipotètics factors de virulència que contribueixen a la patogenicitat de *S. maltophilia*. Aquests factors inclouen els sistemes de secreció de proteïnes del tipus I, II, IV i V, l'habilitat d'elaborar un ampli rang



d'enzims extracel·lulars, com són ara les proteases, lipases i fibrolisines, la producció de varis pilis, fimbries i adhesines, la presència de sistemes de *quorum sensing* (QS) i la síntesi d'exopolisacàrids (EPS) (Crossman, *et al.*, 2008, Rocco, *et al.*, 2009, Lira, *et al.*, 2012, Zhang, *et al.*, 2013).

Una característica molt important d'aquest bacteri és l'habilitat de colonitzar i formar biofilms en cèl·lules epitelials del pulmó (Pompilio, *et al.*, 2010), o en diferents tipus de superfícies abiòtiques així com implants mèdics, catèters i instrumental mèdic (Di Bonaventura, *et al.*, 2004, Huang, *et al.*, 2006, Di Bonaventura, *et al.*, 2007). Els biofilms estan formats per una comunitat de cèl·lules adherida a una superfície i protegida per una matriu extracel·lular composta de polisacàrids i proteïnes (Costerton, *et al.*, 1995). Aquest fenotip els confereix protecció natural davant la resposta immunitària de l'hoste i diferents antibiòtics. La formació de biofilms no és precisament un mecanisme de resistència, però sí incrementa la resistència als antimicrobians que en general no aconsegueixen eradicar els biofilms (de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003).

Estudis previs han relacionat el rol dels flagels amb la capacitat d'adhesió i formació de biofilms de *S. maltophilia* en diferents suports com per exemple, el poliestirè, vidre o en cèl·lules epitelials (Huang, *et al.*, 2006, Pompilio, *et al.*, 2008, Pompilio, *et al.*, 2010). En *S. maltophilia* s'han descrit tres tipus de motilitats diferents, que són *el twitching*, el *swimming* i, recentment, el *swarming* (Roschetto, *et al.*, 2012, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2013).

Durant els darrers anys s'ha demostrat la versatilitat metabòlica i diversitat ambiental on es pot aïllar. A més a més, un gran nombre d'anàlisis moleculars revelen l'elevada heterogenicitat entre les soques aïllades de *S. maltophilia*. Tots aquestes casuístiques probablement afavoreixen la seva patogenicitat (Ryan, *et al.*, 2009, Brooke, 2012).

L'heterogenicitat de *S. maltophilia* en soques ambientals i clíniques i la resistència intrínseca d'aquests aïllats revelen la necessitat de continuar identificant els aïllats de dins i fora de l'àmbit hospitalari. La tipificació molecular de *S. maltophilia* ha resultat ser una eina útil per a la comprensió de les infeccions d'aquest patogen emergent, molt probablement degut a la gran diversitat genètica segurament relacionada amb l'elevada versatilitat ambiental. (Berg, *et al.*, 1999, Valdezate, *et al.*, 2004, Turrientes, *et al.*, 2010, Pompilio, *et al.*, 2011, Brooke, 2012).

## Introducció

Els treballs de Rocco, *et al.*,(2009) i Ryan, *et al.*,(2009), intenten explicar la versatilitat genètica i l'adaptabilitat a diferents nínxols ecològics a través de l'anàlisi comparatiu entre els genomes seqüenciats entre les soques de *S. maltophilia* K279a i R551-3, una soca clínica i una endofítica, respectivament. A través de la comparativa genètica, aquests treballs demostren que hi ha un cos genètic comú i que la versatilitat genètica es basa principalment en la presència/absència d'illes genòmiques (GEIs) i ambdós proposen noves dianes terapèutiques.

De tots els mecanismes moleculars involucrats en la virulència de *S. maltophilia* mencionats anteriorment, en aquest treball ens centrarem en l'estudi del QS en aquesta espècie. Malgrat que el sistema de QS en *S. maltophilia* va començar a ésser estudiat recentment per Fouhy, *et al.*,(2007) i Huang i Wong (2007), calen molts més estudis per a poder interpretar millor les bases moleculars de la senyalització cèl·lula-cèl·lula en la patogènia i virulència d'aquesta espècie.

A continuació farem una explicació de les característiques generals del QS i, posteriorment, procedirem a fer un recull del coneixement que es té d'aquests sistemes en *S. maltophilia*.

### **1.2. Característiques generals del *quorum sensing*.**

Fa unes dècades es creia que els organismes unicel·lulars procariotes, com els bacteris, vivien de forma independent i que només responien a estímuls físics i químics d'origen ambiental. Fins a 1980 no hi ha els primers indicis que pugui existir un sistema que coordini l'activitat d'un grup de microorganismes mitjançant una possible comunicació intercel·lular. Aquest mecanisme de comunicació cèl·lula-cèl·lula es coneix com a "*quorum sensing*" (QS) i va ser introduït per primer cop per Fuqua, *et al.*, (1994) a partir de quasi 20 anys d'estudis realitzats amb el bacteri marí bioluminescent *Vibrio fischeri*.

Els sistemes de QS permeten als bacteris obtenir informació de la densitat cel·lular del seu entorn més proper mitjançant la síntesi de molècules químiques anomenades autoinductores (AI), concentració de les quals augmenta en funció de l'increment de la densitat cel·lular (Waters & Bassler, 2005).

Per tant, el QS és regulat per les molècules senyals AI, les qual són sintetitzades a l'espai intracel·lular al llarg del creixement bacterià i alliberades a l'espai extracel·lular. A mesura que augmenta el nombre de cèl·lules bacterianes també ho fa el nombre de molècules AI. Quan

aquestes arriben a una concentració llindar, el mecanisme de QS altera l'expressió gènica en resposta a l'acumulació de les molècules AI. A partir d'aquest sistema de senyal-resposta els bacteris sincronitzen el seu comportament i els permet coordinar un ampli ventall de processos fisiològics de forma cooperativa (Ng & Bassler, 2009).

S'ha demostrat en nombrosos estudis el rol i la contribució del QS en els bacteris patògens i simbiòtics. Els simbiòtics utilitzen el sistema de QS per fenotips com la bioluminescència i la formació de nòduls, mentre que els bacteris patògens ho fan per a regular processos relacionats amb la virulència. Un exemple és la producció de toxines i proteases entre d'altres factors més complexos com el desenvolupament de biofilms que permeten als bacteris resistir a compostos antimicrobians (Williams, 2007).

La comunitat científica ha abocat nombrosos esforços en el coneixement del QS de molts bacteris patògens, perquè conèixer els mecanismes que permetin bloquejar aquest comportament coordinat resulta molt interessant. Amb aquest bloqueig es teoritza que els bacteris perdrien la capacitat d'evadir-se del sistema immune de l'hoste i de formar estructures organitzades que promouen la patogènesi, com per exemple la formació de biofilms.

### **1.2.1. *Vibrio fischeri*: primer model de quorum sensing descrit.**

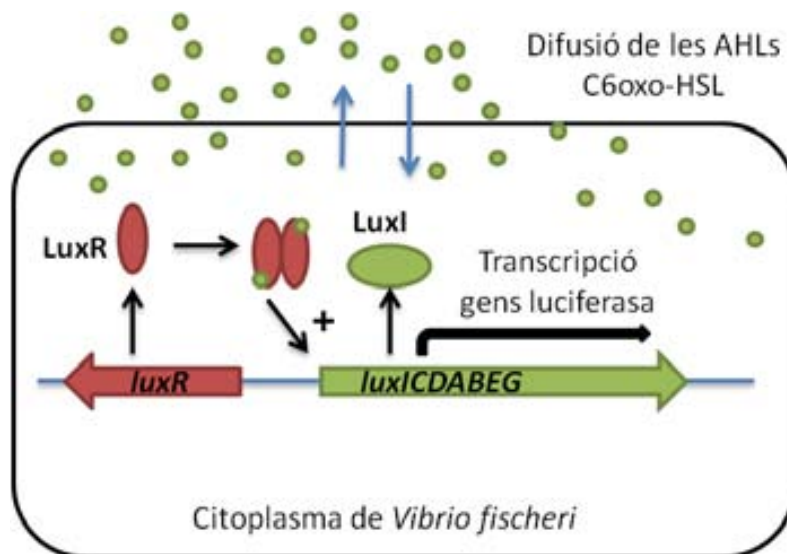
El primer sistema de QS descrit va ser en el bacteri bioluminescent marí *V. fischeri*. Aquest bacteri estableix una relació simbiòtica amb peixos i calamars, colonitzant un òrgan específic denominat òrgan de llum (Fuqua, *et al.*, 1996). Les descripcions originals sobre l'autoinducció de luminescència en aquest microorganisme s'inicien el 1970 per diversos autors (Nealson, *et al.*, 1970, Nealson & Hastings, 1979).

Quan *V. fischeri* viu lliure en el mar i la densitat cel·lular no supera les  $10^2$  cel/mL no és luminescent, però quan aquesta densitat cel·lular arriba a les  $10^{10}$ - $10^{11}$  cel/mL en el laboratori o en l'òrgan que colonitza, és capaç d'emetre llum (Fuqua, *et al.*, 1996).

El sistema de QS de *V. fischeri* és el paradigma de QS de la majoria de sistemes presents entre els bacteris gram negatius. Aquest sistema es basa en 2 proteïnes, LuxI i LuxR que s'encarreguen de la síntesi i el reconeixement de les molècules autoinductores respectivament. La proteïna LuxI és l'enzim que sintetitza la molècula N-acil-L-homoserina lactona (AHL) del tipus N-3-oxo-Hexanoil-L-homoserina lactona (C6oxo-HSL) que difon dins i fora de la cèl·lula. A baixes concentracions cel·lulars hi ha poca quantitat de proteïnes LuxI,

## Introducció

molècules C6oxo-HSL i una expressió basal dels gens de la luciferasa (Engebrecht, *et al.*, 1983). A mesura que la densitat cel·lular incrementa, la quantitat de C6oxo-HSL augmenta en l'espai extracel·lular fins que el nivell de les AHLs arriba a una concentració llindar i aquestes reingressen dins la cèl·lula i s'uneixen al regulador LuxR (Eberhard, *et al.*, 1981). Les molècules AHL s'uneixen a la proteïna LuxR en el domini d'unió a AHLs i formen el complex LuxR-AHL que permet l'activació del regulador LuxR exposant el seu domini d'unió al DNA. El regulador LuxR s'uneix al promotor de l'operó *luxICDABEG* i activa la transcripció dels gens requerits per a la luminescència, entre aquests el gen *luxI* (Stevens & Greenberg, 1997). No obstant això, la producció de LuxI no augmenta sense parar, gràcies al fet que s'equilibra amb la regulació negativa que exerceix el complex LuxR-AHL sobre el regulador LuxR. Això, al seu torn, condueix a una disminució en els nivells de LuxR, la producció de LuxI i l'expressió de gens de luciferasa. Per tant, la regulació del gen *luxR* divergeix respecte de l'operó, tot i que la posició d'aquest en el genoma és adjacent a aquest (Jayaraman & Wood, 2008). El gen *luxR* està regulat per estímuls ambientals exògens, com elevades temperatura i l'AMPc que estimulen la transcripció d'aquest gen (Dunlap, 1999). Podeu veure un esquema a la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Esquema de la via de regulació de la bioluminescència mitjançant el sistema de QS LuxI/R en *V. fischeri*. La proteïna LuxI sintetitza les AHLs del tipus C6oxo-HSL (rodones verdes) i aquestes es difonen a través de la membrana cel·lular. Un cop s'arriba a una concentració llindar, les AHLs s'uneixen al regulador LuxR. Aquesta proteïna unida a AHLs s'uneix al promotor del operó *luxICDABEG* activant la transcripció dels gens de la luciferasa. Figura basada en el treball de Galloway, *et al.*, (2011).

En aquest sistema de QS les sintases d'AHLs conformen una família de proteïnes homòlogues evolutivament conservades anomenades família del tipus LuxI. Les proteïnes dels tipus LuxR, pertanyen a un altre grup de proteïnes conservades, que actuen com a elements de

resposta unides a molècules AI específiques, unió que els permet actuar com a reguladors transcripcionals en la majoria dels casos. Les proteïnes homòlogues LuxI i LuxR han estat identificades en un gran nombre de proteobacteris gram negatius (Gray & Garey, 2001).

### **1.2.2. Classificació dels diferents sistemes de *quorum sensing* en funció de les molècules autoinductores secretades.**

En les darreres dècades s'han anat descobrint altres sistemes de comunicació bacteriana que utilitzen mecanismes de comunicació cèl·lula-cèl·lula diferents als que s'han explicat anteriorment. Existeixen diversos sistemes de QS perquè cada sistema s'ha adaptat i optimitzat en funció del nínxol ecològic on viu cada espècie bacteriana. Per tant, els tipus de senyals extracel·lulars, receptors, mecanismes de transducció de senyals i la regulació dels gens diana són característics i específics de cada espècie bacteriana (Bassler, 2002). Les principals diferències d'aquests nous sistemes de QS respecte el model LuxI/R de *V. fischeri* radiquen en la naturalesa de la molècula AI, els mecanismes que controlen la seva síntesi, la resposta cel·lular que controlen i l'espectre de comunicació (interespècies, intraespècies o interregnes).

Tot i que en aquest treball ens centrarem en l'estudi del QS regulat per les molècules AI dels tipus AHLs, a continuació s'enumeren i es fa una breu explicació dels diferents sistemes de QS més ben descrits i estudiats entre els bacteris gram negatius i positius en funció de les molècules AI que utilitzin. La major part de bacteris gram negatius utilitzen les AHLs, també anomenades AI-1, els bacteris gram positius utilitzen pèptids senyals i ambdós grups utilitzen les molècules AI-2. Més enllà d'aquestes principals categories també existeixen altres sistemes de QS que utilitzen altres molècules AI. Probablement es seguiran descobrint moltes altres molècules AI a mesura que l'estudi del QS avanci (LaSarre & Federle, 2013). Vegeu la Figura 1.2 on s'exemplifiquen les diferents molècules AI.

#### **1.2.2.1. QS regulat per les N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) o autoinductores del tipus 1 (AI-1).**

Sistema de QS majoritari i establert només en els bacteris gram negatius. El primer descrit va ser en *V. fischeri* i el sistema de comunicació cel·lular es basa en la síntesi i recepció de les molècules autoinductores AHLs (Figura 1.2-A), sintetitzada i reconeguda per les proteïnes del tipus LuxI i LuxR respectivament (Whitehead, *et al.*, 2001). A continuació d'aquest apartat hi haurà una explicació més detallada d'aquest sistema de QS.

#### **1.2.2.2. QS regulat per les molècules autoinductores del tipus 2 (AI-2).**

Aquest sistema és utilitzat en bacteris gram negatius i gram positius. Originalment identificat en *Vibrio harveyi* com a regulador de bioluminescència, la proteïna LuxS s'encarrega de la síntesi de la molècula autoinductora AI-2 (derivats de 4,5-dihidroxi 2,3-pentanediona, DPD) les quals s'han identificat en més d'una cinquantena d'espècies diferents com, per exemple, *Salmonella enterica* (Figura 1.2-B). Les AI-2 difonen lliurement a través de la membrana tant en bacteris gram negatius com positius i s'acumulen a l'espai extracel·lular, com succeeix amb totes les molècules senyals dels diferents tipus de QS. La detecció d'aquestes molècules es produeix a partir de diferents receptors a la membrana. Aquest sistema es considera el llenguatge universal entre bacteris gram negatius i gram positius, detectada en diversos ambients, com per exemple en el tracte gastrointestinal (Surette, *et al.*, 1999, Jayaraman & Wood, 2008).

#### **1.2.2.3. QS regulat per oligopèptids.**

Els bacteris gram positius utilitzen oligopèptids modificats com a molècules autoinductores per a comunicar-se. Aquests no difonen lliurement per la membrana sinó que s'exporten de les cèl·lules utilitzant transportadors específics. Durant la translació, exportació i detecció, els pèptids sofreixen varies modificacions. La detecció d'aquests pèptids es produeix majoritàriament de forma extracel·lular a partir de l'activació de sistemes de dos components situats a la membrana. Alguns exemples es trobem en espècies com *Staphylococcus aureus* el qual produeix 4 grups de pèptids del tipus AIPs, *around cyclic autoinducer peptides* (Figura 1.2-C) mentre que *Streptococcus pneumoniae* produeix pèptids linears anomenats CSP (Figura 1.2-D). D'altres actuen a nivell intercel·lular unint-se directament al regulador per alterar l'expressió gènica, com per exemple *Enterococcus faecalis* o *Bacillus thuringiensis*, productors també de pèptids linears, cCF10 i NprX/PapR respectivament (Figura 1.2-D) (Kleerebezem, *et al.*, 1997, LaSarre & Federle, 2013).

Com ja hem mencionat anteriorment, a més a més de les principals categories de molècules AI hi ha altres molècules AI que no entren dins d'aquests tres grups, però que són molt estudiades en alguns microorganismes. En fem un resum a continuació:

#### **1.2.2.4. QS regulat per les Quinolona senyal de *Pseudomonas aeruginosa* (PQS).**

Les molècules PQS (Figura 1.2-E) i les precursors HHQ són els productes de la biosíntesi de l'operó *pqsABCDE*. Tot i això, ambdues actuen com a molècules AI de QS unint-se al regulador transcripcional PqsR que regula i modula l'expressió gènica en *P. aeruginosa*. PQS i

HHQ es diferencien l'una de l'altra per un grup hidroxil que s'encarrega d'afegir l'enzim PqsH. Altres microorganismes com *Burkholderia* spp. utilitzen els precursors HHQ com a senyals de QS (Dubern & Diggle, 2008). La molècula senyal del tipus PQS s'ha vist que s'allibera a l'espai extracel·lular dins de vesícules, les quals transporten diferents tipus de macromolècules. Aquestes vesícules contenen PQS i altres quinolones, per tant, serveixen per al transport de diversos missatges, ja que transporten molècules AI i antibacterians. (Pesci, *et al.*, 1999, Mashburn & Whiteley, 2005, Bassler & Losick, 2006).

#### **1.2.2.5. QS regulat pel *Diffusible signal factor* (DSF).**

El QS regulat per la molècula autoinductora DSF (Figura 1.2-F) va ser descrit per primer cop en *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc) i caracteritzat com un àcid gras insaturat anomenat cis-11-methyl-dodecenoic per Wang, *et al.*, (2004). Aquest sistema depèn principalment del cluster de gens anomenats *rpfBF* i *rpfGHC*, el qual codifica proteïnes sintetitzadores d'aquest àcid gras (DSF) i un sistema de dos components que regula el senyal de transcripció (Barber, *et al.*, 1997, Slater, *et al.*, 2000). Un sistema similar regulat per una molècula senyal del tipus DSF s'ha descrit a *Xylella fastidiosa* espècie fitopatògena genèticament relacionada amb *Xanthomonas* (Colnaghi Simionato, *et al.*, 2007). El sistema DSF també és present en patògens humans gram negatius com *S. maltophilia* (Fouhy, *et al.*, 2007, Huang & Lee Wong, 2007).

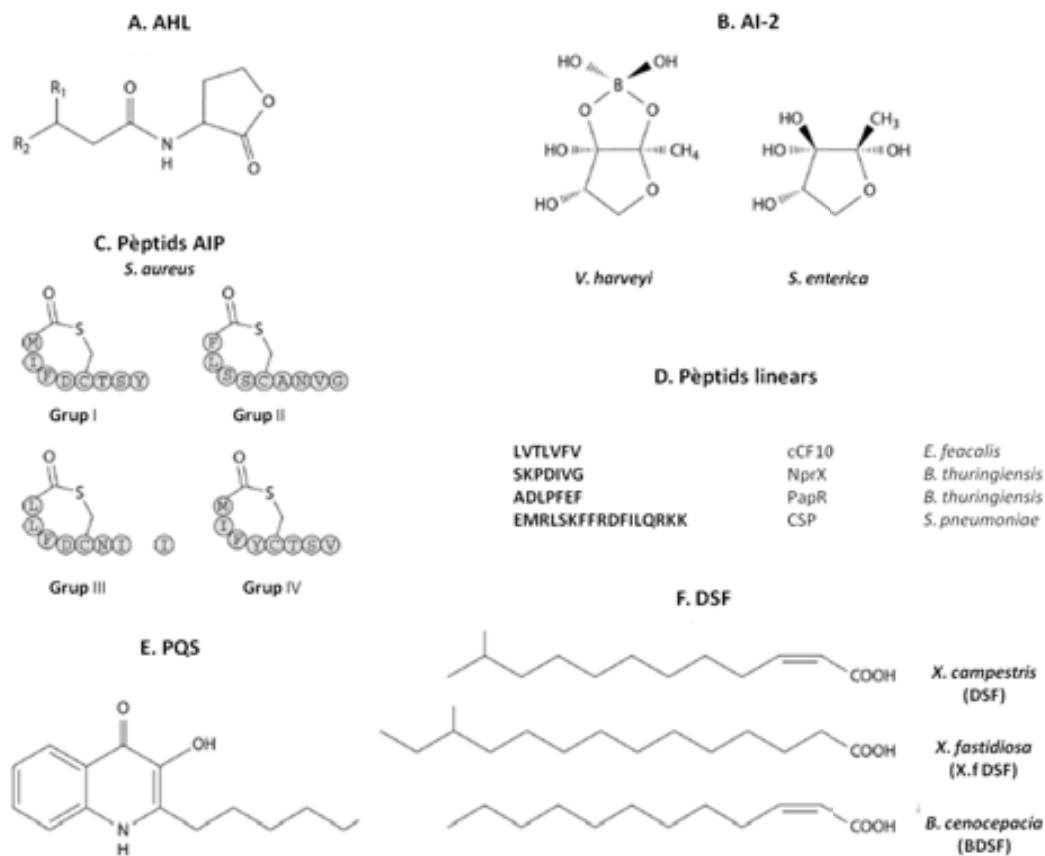
#### **1.2.2.6. QS regulat per les molècules autoinductores del tipus 3 (AI-3).**

Aquestes molècules aromàtiques són produïdes per la flora microbiana del tracte intestinal humà i per algunes espècies entèriques patògenes. L'estructura i síntesis de la molècula AI-3 és desconeguda. Els sistema de dos components QseC/B regulen aquestes molècules i activen la transcripció gènica en *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. S'hipotetitza que aquestes molècules AI-3 són similars a dos hormones produïdes per l'hoste (Kendall & Sperandio, 2007, Moreira, *et al.*, 2010).

#### **1.2.2.7. QS regulat per la molècula peptídica AX21.**

Aquesta molècula AI es tracta de la primera molècula peptídica identificada en bacteris gram negatius. Ha estat detectada recentment en l'espècie fitopatògena de l'arròs *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). AX21 és una proteïna de 194 aminoàcids secretada a través del sistema de secreció del tipus I. Els seus homòlegs són presents en plantes i agents patògens d'animals, inclosos *Xanthomonas* spp (90%-98% d'identitat), *X. fastidiosa* (48%

d'identitat) i *S. maltophilia* (61% d'identitat). La relació funcional d'aquest sistema de QS amb els sistemes de regulació ja coneguts encara resta per descobrir (Ham, 2013).



**Figura 1.2.** Exemples de la diversitat de molècules AI dels diferents sistemes de QS bacterians. **A**, AHLs, N-acil-L-homoserina lactonas, produïdes pels bacteris gram negatius.  $R_1$ , substitució en el tercer carboni per un grup –oxo o –hidroxil i  $R_2$ , llargada de la cadena variable entre 1-15 carbonis. **B**, molècules AI-2 produïdes per gram negatius i gram positius. **C** i **D**, pèptids senyal (AIP o linears) produïts per diferents bacteris gram positius. **E**, PQS, quinolona senyal de *P. aeruginosa*. **F**, DSF, *Diffusible signal factor*, produït per diversos bacteris gram negatius. Figura adaptada de LaSarre i Federle (2013).

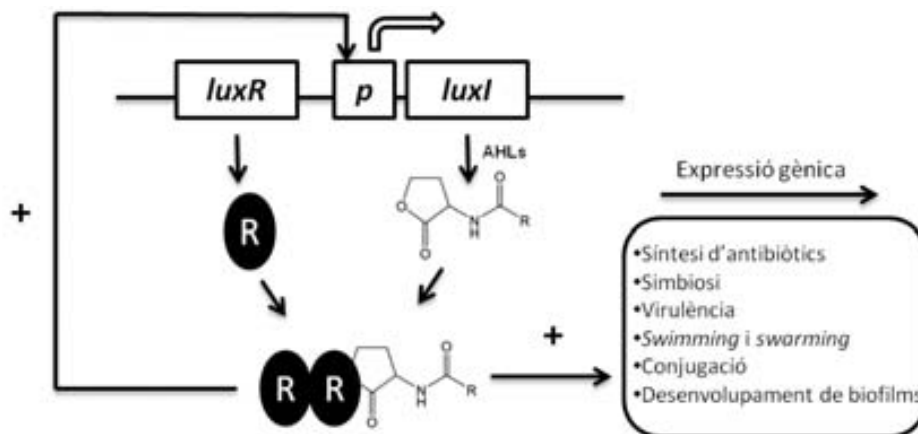
### 1.3. Quorum sensing regulat per les N-acil-L-homoserina lactona.

Com hem mencionat anteriorment existeixen diferents tipus de QS en funció de la naturalesa de la molècula AI. Entre ells, el sistema de QS regulat per les molècules d'AHLs ha estat el que s'ha investigat més minuciosament, degut al fet que les AHLs són la classe de molècules AI aïllades més freqüents en els bacteris gram negatius proteobacteris (Geske, *et al.*, 2008).

El sistema descobert en *V. fischeri* ha estat reconegut en els darrers 20 anys en molts bacteris gram negatius i, poc a poc, s'han anat descobrint diferents sistemes del tipus



LuxI/LuxR QS-AHL, els quals cadascun d'ells controla fenotips molt diversos en funció de l'espècie. En aquest sistema de QS, les sintases d'AHLs formen una família de proteïnes homòlogues, evolutivament conservades, anomenades família del tipus LuxI. Les proteïnes que actuen com a elements de resposta quan s'uneixen a molècules AHLs específiques i actuen com a reguladors transcripcionals pertanyen a un altre grup conservat, anomenat família del tipus LuxR. És important remarcar que el procés de QS en molts bacteris gram negatius és més complex que el descrit anteriorment (Venturi & Subramoni, 2009, Galloway, *et al.*, 2011). Vegeu diferents mecanismes regulats pel sistema de QS-AHL a la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Model general dels diferents mecanismes que són regulats en els diversos bacteris gram negatius mitjançant l'expressió gènica dels gens regulats pel sistema de QS-AHL. Complex LuxR-AHL regula l'expressió gènica de diferents processos segons l'espècie bacteriana. En la majoria de sistemes del tipus LuxI/R, homòlegs al sistema descrit en *V. fischeri*, es produeix una activació en la transcripció de la sintasa del tipus LuxI (+). Figura adaptada del treball realitzat per Williams (2007).

### 1.3.1. Proteïnes sintases d'AHLs.

Fins ara s'han descrit tres famílies de sintases, enzims aciltransferases no homòlogues entre si, capaces de sintetitzar molècules AI del tipus AHL. No obstant això, el major nombre d'enzims responsables de la síntesi d'AHLs són les que es corresponen a les del tipus LuxI, ortòlogues a la sintasa LuxI de *V. fischeri*. Per tant, a part de la família del tipus LuxI, les AHLs també són sintetitzades a partir d'altres famílies de sintases del tipus AinS/LuxM (Bassler, *et al.*, 1993, Gilson, *et al.*, 1995) i HdtS (Laue, *et al.*, 2000).

#### 1.3.1.1. Família LuxI.

Les proteïnes del tipus LuxI o sintases d'AHLs són les encarregades de sintetitzar els diferents tipus d'AHLs a partir de 2 molècules orgàniques: la S-adenosil metionina (SAM) i una cadena acil que pot ser aportada per la proteïna transportadora d'acil (acil-PTA) o per la coenzima A (CoA) (Galloway, *et al.*, 2011). Ambdós substrats es troben normalment a la cèl·lula

ja que participen tant en la síntesis d'aminoàcids com d'àcids grassos (More, *et al.*, 1996). En aquesta família de proteïnes el percentatge d'identitat és entre el 28 % i el 35 %. Tot i la baixa identitat, existeixen 2 regions força conservades en els extrems amino-terminal i carboxi-terminal (Fuqua, *et al.*, 1996, Hanzelka, *et al.*, 1997). Encara no ha estat possible predir les AHLs produïdes per a cada sintasa mitjançant eines bioinformàtiques (Williams, 2007).

### **1.3.1.2.Família AinS/LuxM.**

Els enzims AinS i LuxM s'han descrit per primer cop en *V. harveyi* i *V. fischeri*. Són dos proteïnes homòlogues entre si que no presenten similitud amb les proteïnes del tipus LuxI tot i que sintetitzen les AHLs seguint el mateix mecanisme i utilitzant els mateixos substrats que les de la família del tipus LuxI (Gonzalez & Marketon, 2003).

### **1.3.1.3.Família HdtS.**

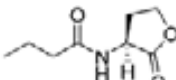
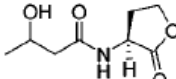
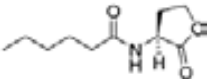
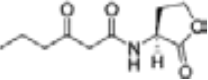
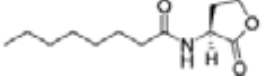
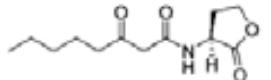
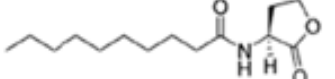
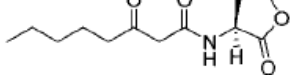
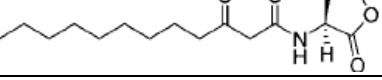
La família de sintases d'AHLs del tipus HdtS es van identificar originalment a *Pseudomonas fluorescens* F113 la qual no guarda cap homologia amb les sintases anteriors esmentades. Laue, *et al.*, (2000) han demostrat que la sintasa HdtS és la responsable de la síntesis en *P. fluorescens* de diferents molècules d'AHLs. Tot i que és capaç de dirigir la síntesis de diverses molècules d'AHL, l'anàlisi del seu ORF indica que la sintasa HdtS és una aciltransferasa que pertany a la família 1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat *O*-aciltransferasa, també anomenada LPA aciltransferases (aciltransferases de l'àcid lisofosfatídic). Aquests enzims catalitzen la transferència d'una cadena acilada com l'acil-PTA o bé l'acil-CoA a l'àcid lisofosfatídic produint àcid fosfatídic, és a dir, estan involucrats en la biosíntesi de la membrana cel·lular a través del metabolisme de fosfolípids. S'ha suggerit que la proteïna sintasa HdtS és una aciltransferasa que sintetitza AHLs com les altres dos famílies de sintases, és a dir, a partir de la reacció d'unió entre la cadena acil-PTA i la metionina SAM (Laue, *et al.*, 2000). Els autors Rivas, *et al.*,(2007), també demostren que l'aciltransferasa anomenada Act (*acil transfer function*), ortòloga a la sintasa de la família HdtS, és la responsable de la síntesi d'AHLs en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

## **1.3.2. Estructura, transport i acumulació de les AHLs.**

Les N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) són les molècules AI més comunament detectades en els sistemes de QS dels bacteris gram negatius. Són molècules orgàniques de baix pes molecular que s'acumulen en el medi de creixement d'un cultiu bacterià. Gràcies a això, aquestes molècules s'aïllen dels sobrenedants en fase estacionària mitjançant una extracció orgànica. La primera molècula AHL descrita va ser per Eberhard, *et al.*,(1981)

pertanyent a la C6oxo-HSL de *V. fischeri*. Des de llavors s'han identificat nombroses AHLs diferents. Es mostren alguns exemples a la Taula 1.1. Aquestes molècules estan compostes d'un anell homoserina lactona invariable, comú per a totes les AHLs, unit per un enllaç amida a una cadena acil. Les AHLs posseeixen una elevada diversitat conformacional, degut al fet que difereixen en la longitud i el grau de insaturació de la cadena lateral acilada així com també en les possibles substitucions ubicades en el tercer carboni de la cadena. La llargada de la cadena acil varia entre 4 i 18 àtoms de carboni i les substitucions que es poden produir en el tercer carboni de la cadena poden ser per a grups carbonils (-oxo) o hidroxils (-hidroxil). Les insaturacions de dobles o triples enllaços es poden presentar en la posició C-7 i C-8 de la cadena acilada (LaSarre & Federle, 2013).

**Taula 1.1.** Composició química, pes molecular, estructura química i abreviatura utilitzada en aquest treball de diferents tipus d'AHLs produïdes per bacteris gram negatius.

Compost químic	Pes molecular	Estructura química	Abreviatura
N-Butanoil-L-homoserina lactona	171		C4-HSL
N-3-hidroxi-Butanoil-L homoserina lactona	187		C4OH-HSL
N-Hexanoil-L-homoserina lactona	199		C6-HSL
N-3-oxo-Hexanoil-L-homoserina lactona	213		C6oxo-HSL
N-Octanoil-L-homoserina lactona	227		C8-HSL
N-3-oxo-Octanoil-L-homoserina lactona	241		C8oxo-HSL
N-Decanoil-L-homoserina lactona	255		C10-HSL
N-3-oxo-Decanoil-L-homoserina lactona	269		C10oxo-HSL
N-3-oxo-Dodecanoil-L-homoserina lactona	297		C12oxo-HSL

Cada sintasa es caracteritza per produir una o més AHLs diferents les quals, en general, degut a la seva naturalesa amfipàtica difonen lliurement a través de la membrana citoplasmàtica a favor del gradient de concentració i s'acumulen a l'espai extracel·lular.

## Introducció

Alternativament a això, hi ha evidències del transport actiu d'algunes AHLs de cadena llarga a través de les membranes en algunes espècies com per exemple *P. aeruginosa*, que utilitza les bombes de flux per transporatr la molècula C12oxo-HSL (Pearson, *et al.*, 1999, Chan, *et al.*, 2007).

Tot i que l'acumulació d'AHLs depèn de l'increment cel·lular, hi ha altres factors ambientals que estimulen l'acumulació/disminució d'aquestes. L'agregació bacteriana i la formació de biofilms augmenten la concentració local d'AHLs, mentre que condicions com l'elevat pH o la degradació enzimàtica disminueixen la concentració d'AHLs disponibles (Gonzalez & Marketon, 2003).

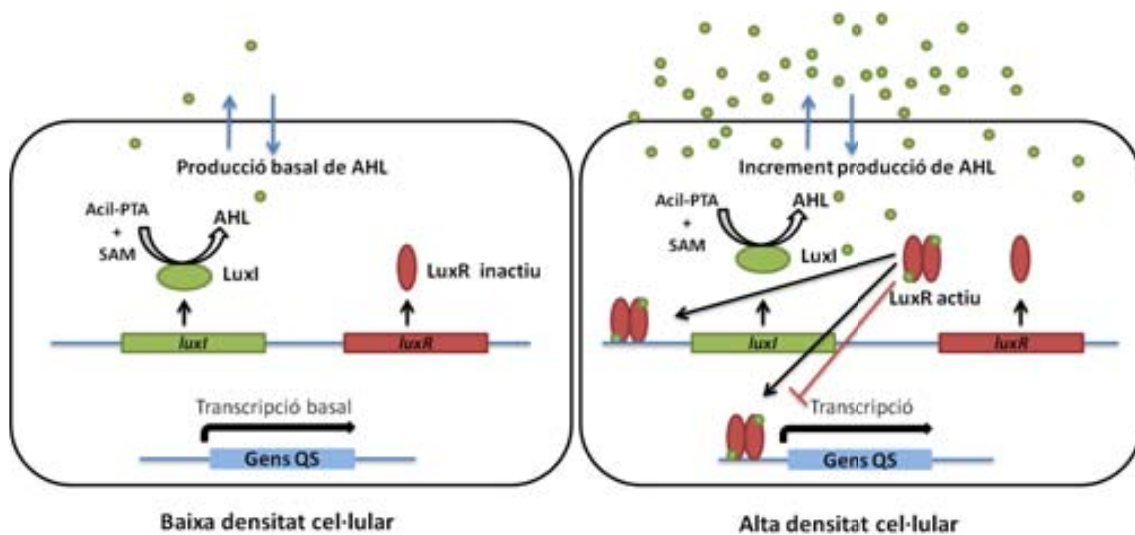
### 1.3.3. Proteïnes del tipus LuxR.

Les proteïnes del tipus LuxR actuen com a factors de transcripció que s'uneixen específicament a les molècules d'AHLs cognades i, majoritàriament, formen homodímers per activar-se. Malgrat que les proteïnes LuxR són específiques per algun/s tipus d'AHLs, algunes són capaces d'unir-se a un ampli rang d'AHLs diferents. El complex LuxR-AHL s'uneix a les regions promotores anomenades, de forma general, caixes del tipus lux, dels gens regulats pel QS i afecten la seva expressió. La primera caixa promotora descrita va ser la de *V. fischeri*, que presenta simetria invertida i consta de 20 bases de les quals s'ha demostrat que no totes elles són essencials pel reconeixement de LuxR. Hi ha certa conservació entre les caixes del tipus lux entre les diferents espècies bacterianes. Les caixes varien entre 18 i 22 bases i s'anomenen en funció de cada sistema de QS present en cada microorganisme. Per exemple, s'anomenen *lux* en (*V. fischeri*), *las* en (*P. aeruginosa*) o *tra* en (*Agrobacterium tumefaciens*) (Zhang, *et al.*, 2002, Schuster, *et al.*, 2004, Urbanowski, *et al.*, 2004).

Les alineacions realitzades entre els reguladors homòlegs del tipus LuxR, d'una llargada de 250 aminoàcids aproximadament, tenen un percentatge global d'identitat d'aminoàcids baix (~25 %). Aquestes alineacions demostren la presència de residus i/o aminoàcids conservats en els dominis N-terminal i C-terminal de la proteïna LuxR. Els 2 dominis funcionals serveixen per la unió a la molècula d'AHL i al DNA. L'extrem amino-terminal de la proteïna LuxR s'encarrega d'unir específicament les AHLs (un o diferents tipus) mentre que l'extrem carboxi-terminal amb un domini HTH, *helix-turn-helix*, s'uneix a les caixes de DNA compreses a les regions promotores dels gens que regula. La regulació dels gens diana depèn de l'acumulació de les molècules AI en el citoplasma (Stevens, *et al.*, 2011). La unió del regulador LuxR a l'AHL comporta un canvi conformacional d'aquest que li permet exposar el domini HTH per a la unió

al DNA. Aquest complex LuxR-AHL permet reclutar les RNA polimerases i activar la transcripció (Welch, *et al.*, 2000, Zhu & Winans, 2001). Els estudis genètics i estructurals realitzats sobre el regulador del tipus LuxR d'*A. tumefaciens*, anomenat TraA, han servit per identificar els aminoàcids que estan directament implicats amb la unió d'aquest a les AHLs i al DNA (Vannini, *et al.*, 2002, Zhang, *et al.*, 2002, Chai & Winans, 2004). Els alineaments realitzats entre el regulador TraR amb altres reguladors del tipus LuxR indiquen que hi ha nou residus conservats entre el 95 % de les proteïnes LuxR. Sis residus estan conservats en el domini d'unió a les AHL i els altres tres, en el domini d'unió al DNA (Whitehead, *et al.*, 2001, Zhang, *et al.*, 2002).

Vegeu l'esquematització i representació del típic sistema de QS regulat per les AHLs en bacteris gram negatius a la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Esquema de sistema de *quorum sensing* (QS) general regulat per les N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) en bacteris gram negatius. Les proteïnes del tipus LuxI són els principals enzims productors d'AHLs a partir dels precursors S-adenosil metionina (SAM) i proteïna transportadora d'acil (Acil-PTA). A baixes densitats cel·lulars el sistema produeix concentracions basals d'AHLs i la transcripció basal dels gens relacionats amb el QS. A mesura que incrementa la densitat cel·lular, les AHLs s'acumulen a l'espai extracel·lular fins a una concentració llindar que els permet interactuar i unir-se amb la proteïna de tipus LuxR. Això suposa un canvi conformacional (sovint la dimerització) que permet la unió del complex LuxR-AHL a les zones promotores (caixes del tipus lux) dels gens regulats pel QS activant o reprimint la seva transcripció. Figura adaptada del treball realitzat per Venturi i Subramoni, (2009)

En la majoria de sistemes de QS, la proteïna del tipus LuxR es comporta com un activador transcripcional, és a dir, en presència d'AHLs és capaç de reconèixer i unir-se a les caixes lux i així activar la transcripció com per exemple el regulador TraR d'*A. tumefaciens* o LasR de *P. aeruginosa* (Zhu & Winans, 2001, Bottomley, *et al.*, 2007, Nasser & Reverchon, 2007). Per altra banda existeixen reguladors que actuen com a repressors ja que s'uneixen a les regions promotores en absència d'AHLs i bloquegen l'accés a les RNA polimerases i s'alliberen en

presència d'AHLs , com per exemple els reguladors d'EsaR de *Pantonea stewartii* o ExpR de *Erwinia carotovora* (von Bodman, *et al.*, 1998, Andersson, *et al.*, 2000). Per tant, sigui activant o reprimint, les proteïnes del tipus LuxR serveixen per a modular el comportament de la comunitat bacteriana (Patankar & Gonzalez, 2009).

### **1.4. La producció d'AHLs és àmpliament estesa entre els bacteris gram negatius.**

El descobriment d'espècies bacterianes productores d'AHLs ha anat augmentant en les darreres dècades. Totes aquestes espècies ocupen un ampli rang de nínxols ecològics des del mar i aigües dolces fins al sòl, plantes i animals, a més a més s'inclouen molts bacteris patògens simbiòtics, extremòfils i bacteris promotors del creixement de plantes (Williams, *et al.*, 2007).

Els gens que codifiquen homòlegs del tipus LuxI i LuxR es localitzen en el cromosoma o en elements genètics mòbils (plasmidis i transposons) i sovint la posició entre aquests és adjacent com un tàndem en forma convergent o divergent (Williams, 2007). Tot i que també existeixen parelles de LuxI/R cognades que tenen una posició distant en el cromosoma o plasmidi. En els darrers anys s'han identificat en les bases de dades de genomes bacterians gram negatius més de 100 exemples corresponents a la família de proteïnes dels tipus LuxI ortòlogues entre si (Subramoni & Venturi, 2009).

Moltes espècies contenen diversos sistemes de QS del tipus LuxI/LuxR que detecten i produeixen diferents tipus d'AHLs. A part del sistema de QS-AHL anomenat LuxI/R que controla la bioluminescència en *V. fischeri*, altres sistemes han estat molt estudiats els darrers anys. Aquests inclouen, per exemple, el sistema TraI/R d' *A. tumefaciens*, que controla la conjugació del plasmidi Ti (Inductor de tumors). Aquest bacteri fitopatogen provoca, a través de la transferència genètica de fragments de DNA a la planta, el desenvolupament de tumors a les cèl·lules vegetals i indueix la producció de compostos anomenats opines que serveix com a font de nutrients als bacteris. Tots els gens necessaris per induir la tumorigènesis i transferència es troben en el plasmidi Ti, el qual conté també el sistema de QS anomenat TraI/R, que controla els gens encarregats de la conjugació (White & Winans, 2007).

Malgrat que els sistemes de QS han estat identificats en molts bacteris gram negatius, el rang de funcions que controlen en cada espècie encara ha de seguir sent molt estudiat. A la Taula 1.2 s'enumeren alguns sistemes de QS més rellevants degut al fet que contenen ben

caracteritzades les parelles d'homòlegs LuxI/R. S'especifiquen els sistemes de QS del tipus LuxI/R i el posicionament d'aquests en el genoma, les molècules d'AHLS més abundants que s'hi detecten i les funcions més importants regulades per aquests.

**Taula 1.2.** Exemples d'alguns sistemes de QS regulats per AHLs més ben caracteritzats

Organisme	LuxI/R homòlegs	Orientació adjacent dels gens LuxI/R	Molècules d'AHLS majoritàries	Funcions que regula el QS	Referència
<i>Acinetobacter baumannii</i> M2	Abal/R	←→	C12OH-HSL	Formació de Biofilm	(Niu, <i>et al.</i> , 2008)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tral/R	No adjacents	C8oxo-HSL	Virulència, conjugació plasmidi Ti	(Fuqua & Winans, 1994, White & Winans, 2007)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Cepl/R	←→	C6-HSL: C8-HSL	Factors de virulència i formació de biofilms, exoenzims i <i>swarming</i>	(Lewenza, <i>et al.</i> , 1999, Huber, <i>et al.</i> , 2001, Sokol, <i>et al.</i> , 2003, Malott, <i>et al.</i> , 2005)
	Ccil/R	→→	C6-HSL: C8-HSL		
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	PmII/R	←→	C10-HSL	Factors de virulència: producció de la proteasa MprA.	(Valade, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Cvil/R	→←	C6-HSL	Exoenzims, pigment antibacterià violaceïna, àcid cianhídric	(McClellan, <i>et al.</i> , 1997, Chernin, <i>et al.</i> , 1998)
<i>Erwinia carotovora</i>	Expl/R	→←	C6oxo-HSL	Exoenzims, carbapenem, i factors de virulència	(Bainton, <i>et al.</i> , 1992, Barnard & Salmond, 2007)
	Carl/R	→←	C6oxo-HSL		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/R	→→	C12oxo-HSL	Enzims extracel·lulars, formació de biofilms, ramnolípids, motilitat i factors de virulència	(Passador, <i>et al.</i> , 1993, Pearson, <i>et al.</i> , 1997, Jimenez, <i>et al.</i> , 2012)
	RhlI/R	→→	C4-HSL		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 10586	MupI/R	→←	C10oxo-HSL	Mupirocina i biocontrol	(El-Sayed, <i>et al.</i> , 2001, El-Sayed, <i>et al.</i> , 2003, Hothersall, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2P24	Pcol/R	→←	C6oxo-HSL, C8oxo-HSL	Biocontrol	(Wei & Zhang, 2006)
<i>Pseudomonas putida</i> WCS358*	Ppul/R	←←	C6oxo-HSL, C8oxo-HSL, C10oxo-HSL, C12oxo-HSL	Diverses funcions a la fase estacionària relacionades amb virulència	(Steidle, <i>et al.</i> , 2002, Bertani & Venturi, 2004)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Psyl/R	→←	C6oxo-HSL	Exopolisacàrids, <i>swimming</i> , factors de virulència	(Elasri, <i>et al.</i> , 2001)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	CinI/R	→→	C14OH-HSL	Funcions requerides per a la simbiosi, nodulació, transferència de plasmidis, inhibició de creixement, adaptació fases estacionària	(Rodelas, <i>et al.</i> , 1999, Lithgow, <i>et al.</i> , 2000, Wilkinson, <i>et al.</i> , 2002, Wisniewski-Dye & Downie, 2002)
	RhII/R	→→	C7-HSL		
	Tral/R	No adjacents	C8-HSL, C8oxo-HSL		
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrI/R	→←	C4-HSL, C6-HSL	<i>Swarming</i> , exoproteases, formació de biofilms, biotensioactius	(Eberl, <i>et al.</i> , 1996)
<i>Serratia marcescens</i>	Smal/R	→←	C4-HSL, C6-HSL	<i>Swarming</i> , biotensioactius, pigments, transposició, formació de biofilms	(Van Houdt, <i>et al.</i> , 2007)
	SpnI/R	→←	C6-HSL, C6oxo-HSL, C7-HSL, C8-HSL		
<i>Vibrio fischeri</i>	SwrI/R	→←	C4-HSL, C6-HSL	Bioluminescència	(Engebrecht & Silverman, 1984)
	LuxI/R	←→	C6oxo-HSL		

\*Sistema Ppul/R present a diferents soques de *P. putida*, en d'altres no existeix el sistema del tipus LuxI/R.

## Introducció

Entre els sistemes de QS més ben estudiats es troba el que presenta l'espècie *P. aeruginosa*, microorganisme d'elevada importància clínica degut a l'elevada incidència com a patògen oportunista que s'aïlla molt freqüentment en infeccions en pacients de FQ. De fet, *P. aeruginosa* conté dos sistemes de QS anomenats sistemes LasI/R i RhII/R. Aquests dos sistemes estan relacionats entre si i conjuntament regulen molts factors de virulència. Es coneix que la cascada de regulació d'aquests sistemes controla més de 300 gens diferents que afecten la seva expressió i que les soques deficientes en aquests sistemes de QS perden efectivitat infecciosa en diferents models animals. Això indica el rol important en la patogènesi que juguen aquests sistemes de QS (Hentzer, *et al.*, 2003, Smith & Iglewski, 2003).

### **1.5. Diversificació de múltiples sistemes de *quorum sensing* regulats per AHLs i altres molècules autoinductores.**

A mesura que s'estudien els sistemes de QS en bacteris gram negatius, s'ha vist que en moltes espècies coexisteixen diferents tipus de QS regulats per les AHLs tal i com s'ha pogut observar a la Taula 1.2. Aquests diferents sistemes de QS interactuen entre ells i la literatura deixa un clar exemple del que succeeix en espècies com *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* o *Rhizobium leguminosarum*. A més a més, en espècies com *V. harveyi*, coexisteixen sistemes de QS diversos regulats per tres molècules AI diferents (AHLs, AI-2 i CAI-2), les quals modelen les mateixes funcions cel·lulars com la bioluminescència (Taula 1.3).

Els exemples mostrats a les taules, Taula 1.2 i Taula 1.3, serveixen per centrar l'atenció a la gran diversitat de sistemes de QS que coexisteixen en les diferents espècies. Són molts estudis realitzats per desentrellar el rol i regulació de cada sistema en les diferents funcions cel·lulars així com la relació amb les altres vies de regulació. Són necessaris molts més estudis per anar desxifrant cadascuna d'aquestes xarxes degut a la diversitat davant la qual ens trobem.

En resum, els gens activats pels diferents sistemes de QS estan involucrats en tres grans tipus d'esdeveniments o processos fisiològics. Aquests són: 1) processos d'acció en massa on l'activitat d'un sol bacteri seria inútil des de la producció de bioluminescència fins a la iniciació de processos de virulència, 2) Competència per nutrients, funcions de disseminació i producció d'antibiòtics i 3) Processos involucrats en el desenvolupament bacterià com la formació de biofilms.



**Taula 1.3.** Altres sistemes de QS regulats per diferents tipus de molècules AI.

Organisme	Sintasa	Receptor	Molècula AI	Funcions que regula el QS	Referència
<i>Bacillus thuringiensis</i>	PapR NprRB	PlcR NprR	PapR NprX	Exoenzims Toxines, esporulació, necrotrofisme	(Rocha-Estrada, <i>et al.</i> , 2010, Dubois, <i>et al.</i> , 2012)
<i>Enterococcus faecalis</i>	CcfA	PrgX	cCF10	Adhesió i conjugació	(Rocha-Estrada, <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	HdtS	Desconeguda	C6-HSL, C10oxo-HSL, C14OH-HSL	Desconeguda	(Laue, <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PqsA-E i PqsH	PqsR	PQS,HHQ	Virulència producció de elastasa, piocianina, lectina i formació de biofilms	(Dubern & Diggle, 2008, Jimenez, <i>et al.</i> , 2012)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ArgD	ArgC	AIP	Virulència, exotoxines, dispersió de biofilms	(Kleerebezem, <i>et al.</i> , 1997, Thoendel, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Escherichia coli</i> / <i>Salmonella typhimurium</i>	LuxS Desconeguda	LsrB QscE	AI-2 AI-3	Virulència, motilitat i formació de biofilms	(Kendall & Sperandio, 2007, Moreira, <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. pneumoniae</i>	comC	comD	CSP	Virulència i competència	(Kowalko & Seibert, 2008)
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI AinS LuxS	LuxR AinR LuxP	C6oxo-HSL C8-HSL AI-2	Bioluminescència, motilitat i colonització	(Milton, 2006)
<i>Vibrio harveyi</i>	LuxM LuxS CqsA	LuxN LuxP CqsS	C4OH-HSL AI-2 CAI-1	Bioluminescència, sideròfors, proteases, exopolisacàrids, virulència	(Milton, 2006)
<i>Xanthomonas campestris</i>	RpfB,F	RpfC	DSF	Virulència, dispersió de biofilm i exopolisacàrids	(Deng, <i>et al.</i> , 2011)

## 1.6. AHLs i senyalització interespecie.

Les molècules d'AHLs produïdes per a cada espècie s'uneixen de forma específica al regulador LuxR. En termes generals, cada LuxI produeix les AHLs que s'uniran específicament al seu regulador cognat LuxR. A la natura els bacteris tenen més probabilitats de viure en comunitats microbianes que en monocultius. Les interaccions entre els membres de la comunitat són necessàries pel desenvolupament i manteniment d'aquesta. Més enllà de la senyalització intraespecífica, entre els membres d'una mateixa espècie, els quals utilitzen les mateixes molècules senyal per a comunicar-se, altres microorganismes poden interactuar modulant el seu comportament en funció de les senyals produïdes per altres espècies microbianes. Això succeeix degut al fet que diferents espècies comparteixen o colonitzen els mateixos nínxols ecològics, així poden comunicar-se de forma interespecífica mitjançant aquestes molècules.

Cada vegada és més evident que els bacteris poden detectar molècules senyal que no sintetitzen (Ryan & Dow, 2008). En els darrers anys, aquesta interacció interespecífica s'ha

anat descrivint entre diferents espècies i hàbitats. Aquest fet s'ha demostrat per exemple en biofilms formats per *B. cepacia* i *P. aeruginosa*. Aquestes espècies són filogenèticament distants però fenotípicament properes ja que colonitzen hàbitats similars, com per exemple els pulmons de pacients amb FQ, la rizosfera i arrels de plantes (Venturi & Subramoni, 2009). En el treball realitzat pels autors Riedel, *et al.*, (2001) es va demostrar que *B. cepacia* responia a les AHLs produïdes per *P. aeruginosa* amb qui conformava el biofilm.

També existeixen espècies en les quals no s'ha detectat la producció d'AHLs malgrat que presenten un regulador del tipus LuxR capaç de detectar i respondre a les AHLs produïdes per altres bacteris. Són poques espècies on s'ha estudiat aquesta interacció. Aquest és el cas d'*E. coli* i *S. enterica* les quals tenen un regulador del tipus LuxR anomenat SdiA capaç d'unir-se a AHLs produïdes per altres bacteris i afectar a l'expressió gènica (Ahmer, 2004).

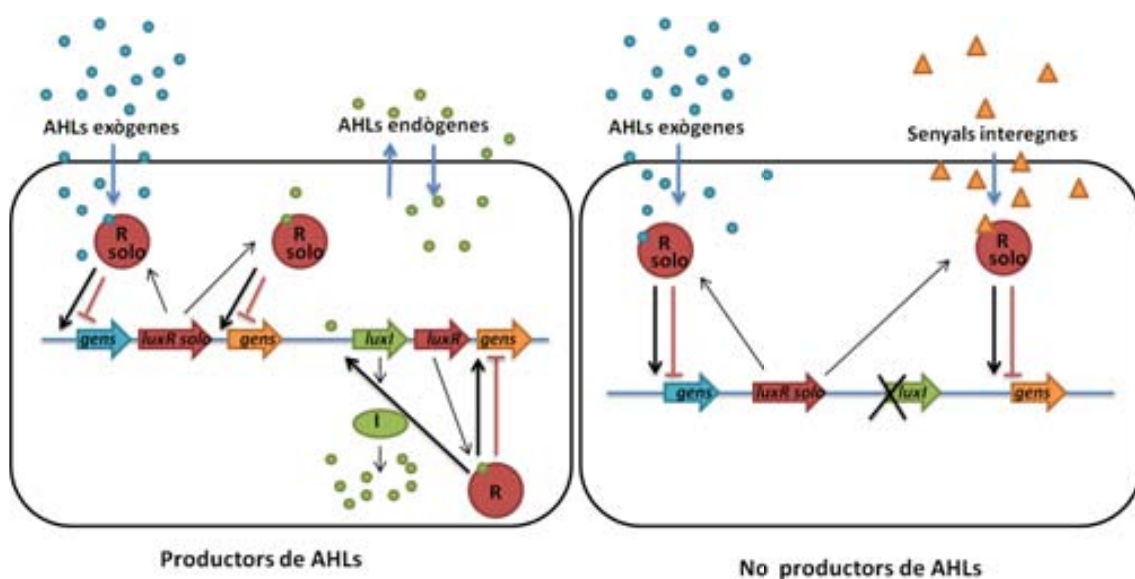
### 1.7. LuxR “solo”.

En els últims anys, s'ha identificat en els genomes seqüenciats dels proteobacteris, la presència de proteïnes del tipus LuxR sense proteïnes LuxI cognades en el mateix genoma. Aquests reguladors desaparellats primerament es van anomenar LuxR orfes per Fuqua (2006), els quals contenen la mateixa estructura de domini d'unió a AHLs en l'extrem N-terminal i un domini HTH, d'unió al DNA en l'extrem C-terminal. Alguns han perdut la llargada i altres han perdut els aminoàcids conservats en l'extrem d'unió a AHLs (Fuqua & Greenberg, 2002). A *posteriori*, Subramoni i Venturi (2009) van anomenar aquests reguladors, LuxR “solo” perquè van creure que aquest terme definia millor aquest tipus de reguladors ja que en genètica bacteriana el terme d'orfe es refereix a un gen sense una determinada funció.

Degut al fet que els sistemes LuxI/R només s'han descrit en els proteobacteris, els autors Case, *et al.*, (2008), van analitzar 265 genomes seqüenciats d'aquest grup. De tots, només 68 genomes posseïen almenys una parella cognada de tipus LuxI/R. El més interessant és que dels 68 genomes, 45 posseïen més LuxR homòlegs que LuxI, per tant aquests LuxR es podien catalogar com a LuxR “solo”. A banda dels 68 genomes que posseïen, almenys una parella cognada de LuxI/R amb o sense LuxR “solo”, 45 genomes no contenien cap gen homòleg a les sintases d'AHLs però sí que contenien un LuxR “solo” (Case, *et al.*, 2008). Tot i això, un genoma que no posseeixi un gen homòleg a *luxI* no significa que no pugui produir AHLs perquè ja ha estat demostrat que existeixen d'altres famílies encarregades de la síntesi d'AHLs com ja s'ha explicat anteriorment (Subramoni & Venturi, 2009). Per tant, els LuxR “solo” són presents tant

en bacteris que contenen una parella cognada del tipus LuxI/R, com en espècies que no s'ha detectat cap sintasa del tipus LuxI.

Els LuxR "solo" presents en bacteris productors d'AHLs, poden detectar les AHLs endògenes i aprofitar aquesta detecció per a la regulació d'altres gens. O bé, pot succeir que aquests reguladors puguin detectar altres AHLs sintetitzades per espècies amb qui cohabita. Els LuxR "solo" en bacteris no productors d'AHLs, poden detectar les AHLs produïdes per altres microorganismes que els permeti regular certes funcions a vegades de competitivitat o bé, per actuar en comunitat realitzant una resposta comunitària. Alguns LuxR "solo" que han perdut els aminoàcids conservats en el domini d'unió a AHLs, no deixen de ser funcionals, és a dir, la seva regulació pot estar vinculada a l'activació realitzada per altres lligands provinents de les comunitats on viuen ja siguin senyals interespecífiques o interregnes. A la Figura 1.5, basada en el treball de Subramoni i Venturi (2009), es resumeixen els possibles rols que poden adoptar els LuxR "solo" en funció de cada fons genètic, és a dir, en soques productores d'AHLs o no productores d'AHLs.



**Figura 1.5.** Possibles rols dels LuxR "solo" en proteobacteris productors d'AHLs i no productors d'AHLs. En bacteris productors d'AHLs, els LuxR "solo" poden unir-se a les AHLs endògenes i exògenes. En bacteris no productors d'AHLs els LuxR "solo" poden unir-se a AHLs exògenes o senyals produïdes per cèl·lules eucariotes. Els LuxR "solo" poden activar o reprimir la transcripció dels diferents gens diana. Figura adaptada del treball realitzat per Subramoni i Venturi, (2009).

### 1.7.1. LuxR "solo" en bacteris productors i no productors d'AHLs.

Fins al moment hi ha pocs LuxR "solo" estudiats. Alguns estudis s'han centrat en bacteris que contenen el típic sistema de QS del tipus LuxI/R i s'ha observat que la funcionalitat d'aquests LuxR "solo" està integrada amb el QS LuxI/R existent. D'altres estudis s'han basat en

## Introducció

els LuxR “solo” presents en bacteris no productors d’AHLs i que, per tant, no disposen del sistema LuxI/R en el genoma. En molts (dels pocs casos estudiats), s’ha demostrat que els LuxR “solo” interactuen amb les AHLs endògenes i/o exògenes permeten al bacteri expandir la xarxa de regulació genètica a partir de les AHLs produïdes per bacteris veïns. Alguns exemples ben estudiats es poden observar a la Taula.1.4, on s’enumeren diferents LuxR “solo” en diferents fons genètics, és a dir, amb o sense sistema LuxI/R, molècules senyal amb les quals interactua i funcions que s’ha estudiat que poden regular.

Per exemple, un regulador LuxR “solo” molt ben estudiat és el QscR de *P. aeruginosa*. Aquesta espècie conté dos sistemes de QS, el LasI/R i RhII/R, funcions que estan íntimament relacionades i conjuntament participen a la mateixa cascada de regulació. El regulador QscR, respon a l’AHL endògena C12oxo-HSL produïda per la sintasa LasI i un dels seus rols es basa en controlar i prevenir l’expressió primerenca de les AHLs endògenes i factors de virulència. Aquest també regula un conjunt de gens diferents als que regulen els sistemes del tipus LuxI/R del bacteri. Per tant, el LuxR “solo” QscR de *P. aeruginosa*, amplifica els gens diana regulats per les AHLs i l’ajuda a una resposta més eficient (Chugani, *et al.*, 2001, Lequette, *et al.*, 2006). A més a més s’ha demostrat que el lligand del regulador QscR a les AHLs és més inespecífic que els altres reguladors LasR i RhIR. Aquest fet indicaria que potser el QscR podria respondre a AHLs produïdes per bacteris veïns (Lee, *et al.*, 2006, Subramoni & Venturi, 2009).

D’altra banda, el regulador LuxR “solo” SdiA, present en *S. enterica* i *E. coli*, regula l’expressió gènica en resposta d’AHLs exògenes degut al fet que en cap d’aquestes espècies s’ha detectat la producció d’AHLs (Ahmer, 2004). Aquest regulador s’uneix a diferents tipus d’AHLs i per tant, té un paper clau en la regulació interespecífiques (Michael, *et al.*, 2001, Yao, *et al.*, 2006). A *S. enterica* és on millor s’ha comprès la funcionalitat de SdiA, on s’ha detectat que regula un operó anomenat *rck*, *resistance to complement killing*, que inclou gens encarregats de l’adhesió a la matriu extracel·lular i la resistència a cèl·lules hostes (Michael, *et al.*, 2001, Smith & Ahmer, 2003, Ahmer, 2004). En *E. coli* el regulador SdiA, té un efecte peliotròpic que dificulta la comprensió del rol de SdiA en aquesta espècie (Michael, *et al.*, 2001, Ahmer, 2004). En *E. coli* s’ha vist que el regulador SdiA podria estar implicat en la síntesi i exportació de la molècula senyal anomenada Indol, la qual s’ha vist que participa en la formació de biofilms en *E. coli*. Per tant, el regulador SdiA podria respondre a dos tipus de molècules senyal, les AHLs (exògenes) i l’Indol (endogen), tot i que calen més estudis per a comprendre aquesta regulació (Lee, *et al.*, 2007).

Taula.1.4. LuxR “solo” amb funció coneguda.

LuxR “solo”	Organisme	Molècules que s'uneixen al LuxR “solo”	Funcions que regula	LuxI/R homòlegs	Referència
<b>AviR i AvhR</b>	<i>Agrobacterium vitis</i>	ND*	Produeix necrosi en raïm i hipersensibilitat a la planta del tabac.	AvsI/R	(Zheng, <i>et al.</i> , 2003, Hao, <i>et al.</i> , 2005)
<b>BisR</b>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C14OH-HSL	Transferència del plasmidi encarregat de la simbiosi i inhibició del creixement	CinI/R, Rhil/R, Rail/R, Tral/R	(Danino, <i>et al.</i> , 2003)
<b>CarR</b>	<i>Serratia marcescens</i>	Independent de lligand	Producció de l'antibiòtic carbapenem	Smal/R	(Cox, <i>et al.</i> , 1998)
<b>OryR</b>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Molècules senyals de l'arròs	Virulència i l'expressió del gen <i>pip</i> (prolina iminopeptidasa)	Cap	(Ferluga, <i>et al.</i> , 2007, Ferluga & Venturi, 2009)
<b>PpoR</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	C6oxo-HSL	Funcions relacionades amb estrès oxidatiu i metabolisme del Fe <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Ppul/R*	(Subramoni & Venturi, 2009)
<b>PsoR</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf5 i CHAO	Molècules senyal de la planta	Biocontrol gràcies a la producció d'agents antibacterians	Diferents sistemes segons soca	(Haas & Defago, 2005, Subramoni, <i>et al.</i> , 2011)
<b>QscR</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C12oxo-HSL, C10oxo-HSL	Sincronització de la producció d'AHLS i factors de virulència	LasI/R, RhII/R	(Chugani, <i>et al.</i> , 2001, Lequette, <i>et al.</i> , 2006)
<b>SdiA</b>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> .	C4oxo-HSL, C6oxo-HSL, C8oxo-HSL, C10oxo-HSL, C12oxo-HSL, C6-HSL, C8-HSL	Funcions involucrades en adhesió i resistència	Cap	(Ahmer, 2004, Yao, <i>et al.</i> , 2006)
<b>TrlR</b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C8oxo-HSL	Inhibeix conjugació del plasmidi Ti	TraR/I	(Oger, <i>et al.</i> , 1998)
<b>XccR</b>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Molècules senyal de les plantes	Virulència i l'expressió del gen <i>pip</i> (prolina iminopeptidasa)	Cap	(Zhang, <i>et al.</i> , 2007)

\*ND: No determinat, Ppul/R no està present en totes es soques de *P. putida* mentre que el LuxR solo PpoR si.

Un dels millors exemples per a explicar la interacció dels reguladors LuxR “solo” amb senyals provinents d'altres regnes, com per exemple les plantes, succeeix en el gènere *Xanthomonas*. Els reguladors LuxR “solo” anomenats XccR i OryR, pertanyents als bacteris fitopatògens de Xcc i Xoo respectivament s'ha demostrat que responen a compostos alliberats per les plantes que infecten. Ambdós reguladors controlen factors de virulència. Aquests bacteris fitopatògens no s'ha detectat que produeixin AHLs ni la presència d'un sistema del tipus LuxI/R en els genomes seqüenciats. Els estudis realitzats amb el regulador OryR indiquen que modula l'expressió gènica en resposta a compostos presents en extractes de plantes i que aquest no respon a les AHLs exògenes. Per tant, sembla que aquests LuxR “solo” participen en la comunicació interregnes i que aquesta interacció amb senyals eucariotes facilita una infecció satisfactòria en les plantes que colonitza (Ferluga, *et al.*, 2007, Ferluga & Venturi, 2009). S'han identificat reguladors homòlegs a aquests en d'altres espècies fitopatògenes, fet que sustenta la rellevada importància d'aquestes interaccions (Zhang, *et al.*, 2007). No obstant això, no es coneix la naturalesa dels components en la planta que activen els reguladors OryR i XccR i

segueix sent una possibilitat que aquests tinguin estructures similars a les AHLs (Ryan & Dow, 2008).

D'altra banda, també existeixen reguladors LuxR "solo" que han patit una modificació en l'extrem C-terminal, el domini d'unió al DNA. Aquest és el cas del regulador solo TrlR d'*A. tumefaciens*, el qual és homòleg al regulador TraR del sistema de QS TraR/I d'aquesta espècie. El sistema TraR/I està implicat en la conjugació del plasmidi Ti i produeix molècules senyal del tipus C8oxo-HSL (vegeu Taula 1.2). El LuxR "solo" TrlR en l'extrem N-terminal, domini d'unió a AHLs, mostra una identitat del 88 % respecte el regulador homòleg TraR mentre que el domini d'unió al DNA en l'extrem C-terminal ha sofert una mutació que impedeix la unió al DNA. Per tant, la duplicació del regulador TraR l'ha fet divergir en el regulador TrlR. La funció de TrlR en *A. tumefaciens* és formar heterodímers amb el regulador TraR i impedir l'activitat del regulador TraR en condicions de baixa concentració de nutrients i, per tant, inhibeix la conjugació del plasmidi Ti (Chai, *et al.*, 2001).

### 1.7.2. Evolució dels LuxR "solo".

Dos mecanismes importants suposen l'expansió de reguladors LuxR "solo". El primer consisteix en una reorganització quan es produeix una duplicació genètica i divergència d'aquests (Cases & de Lorenzo, 2005). El segon mètode inclou la transferència genètica horitzontal (McAdams, *et al.*, 2004). Una combinació d'aquests dos factors conjuntament amb d'altres esdeveniments genètics hauran ocorregut durant l'evolució dels LuxR "solo".

Estudis filogenètics realitzats han posat de manifest els esdeveniments genètics anteriorment esmentats. Per exemple, els autors de Gray i Garey (2001) assenyalen que el regulador LuxR "solo" TrlR, és fruit d'una duplicació del regulador TraR d'*A. tumefaciens* els quals, tot i presentar elevada homologia han divergit l'un de l'altre. Un clar exemple de transferència horitzontal seria el cas del regulador LuxR "solo" SdiA, present en *S. enterica* i *E. coli*, el qual s'agrupa filogenèticament amb el regulador RhII de *P. aeruginosa* mentre que dista d'altres reguladors homòlegs presents en altres enterobacteris.

Diferents factors justifiquen l'elevada prevalença dels reguladors LuxR "solo" com a reguladors de QS en els bacteris. Per una banda, aquests reguladors poden usar les molècules senyals produïdes per la mateixa soca i alliberar a la cèl·lula del cost addicional de produir altres molècules senyals juntament amb el fet que la presència d'un nou regulador, amplificarà les vies de regulació gèniques (Patankar & Gonzalez, 2009). Això és el que succeeix amb el

regulador “solo” QscR de *P. aeruginosa*, el qual utilitza les AHLs produïdes per aquesta espècie i amplifica la regulació del sistema de QS presents a la cèl·lula regulant altres gens diana (Lequette, *et al.*, 2006).

Per altra banda es creu que la pressió selectiva, no ha permès la pèrdua dels reguladors LuxR “solo” ja que serveix perquè la cèl·lula pugui detectar les molècules senyals produïdes pels bacteris amb qui conviu, degut al fet que els bacteris no acostumen a viure en monocultiu sinó que ho fan en comunitats complexes. Per tant, “espïar” les molècules senyals produïdes per altres microorganismes, captar-les i regular una resposta gènica que les afavoreixi, els pot conferir avantatges per a la competència en el nínxol ecològic (Case, *et al.*, 2008).

### **1.8. Afectació del *quorum sensing* en el procés de formació de biofilm i motilitat.**

Generalment els bacteris a la natura tendeixen a adherir-se a superfícies i a desenvolupar biofilms que els protegeixen de les condicions de l'ambient. Diversos factors determinen aquest procés. En aquest apartat fem una revisió de com els bacteris utilitzen la senyalització cèl·lula-cèl·lula (també anomenada QS) i la motilitat durant aquest procés. Específicament es descriu la detecció del QS en processos fisiològics com la formació de biofilms en l'espècie de *P. aeruginosa*, microorganisme d'elevada ubiqüitat en el medi ambient que actua com a patògen oportunista en pacients immunocompromesos. *P. aeruginosa* utilitza les molècules d'AHLs per a controlar l'expressió gènica i produir polisacàrids, ramnolípid i altres factors de virulència. La seva motilitat afecta en l'arquitectura dels biofilms i alguns aspectes d'aquesta motilitat també estan regulats pel QS. Mentre que alguns gens i respectives funcions són específics de *P. aeruginosa*, molts altres aspectes del desenvolupament del biofilm es poden usar com a model per entendre com els bacteris colonitzen diferencialment les superfícies.

#### **1.8.1. Influència del *quorum sensing* en el procés de formació de biofilms.**

Els bacteris a la natura principalment, més del 80 %, es troben de forma sèssil, associats a les superfícies formant biofilms (Davies, 2003). Aquestes estructures els permeten viure com un organisme multicel·lular (Dickschat, 2010). Majoritàriament els biofilms a la natura estan formats per diferents espècies i rarament estan compostos per una única espècie. Els biofilms són estructures organitzades que permeten el transport de nutrients i residus dins i fora d'aquests i confereixen als bacteris resistència a l'estrès ambiental. El segell distintiu dels biofilms es basa en l'exquisida organització i la supervivència que confereixen a les diferents

espècies. Els biofilms bacterians són un problema clínic molt important en infeccions cròniques ja que exhibeixen elevada resistència als agents antimicrobians i mecanismes de defensa immune de l'hoste (Costerton, *et al.*, 1999, Hentzer, *et al.*, 2003). La formació de biofilms incrementa la tolerància enfront dels antibiòtics en comparació amb els bacteris que viuen de forma planctònica. Es coneix que els bacteris que creixen embeguts en un biofilm són 1000 vegades més tolerants als antibiòtics, biocides i metalls pesants que les cèl·lules que creixen de forma planctònica (Anwar, *et al.*, 1990, Teitzel & Parsek, 2003). En conseqüència, les concentracions requerides per a l'eradicació dels biofilms bacterians sovint excedeixen la dosi màxima autoritzada, la qual cosa impedeix el tractament eficaç basat en els antibacterians convencionals (Costerton, *et al.*, 1987, Drenkard, 2003). A més a més, els antibiòtics actuals corren el risc d'ésser cada vegada menys efectius amb l'aparició de soques multiresistents.

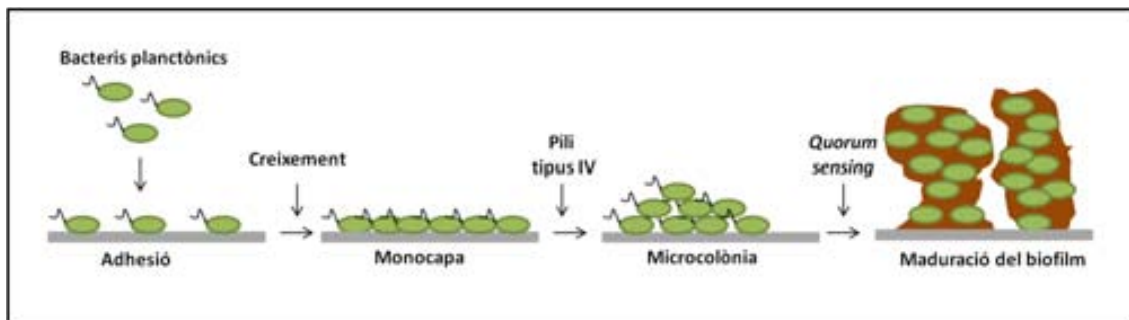
Diversos factors són els responsables de la tolerància dels biofilms als diferents agents antimicrobians. Un dels més importants, és la baixa penetració dels compostos a través d'aquests ja que queden units a la matriu extracel·lular. Un altre factor que ajuda a la tolerància del biofilm es deu a que l'activitat metabòlica entre les cèl·lules col·locades a diferents posicions o nivells del biofilm és molt heterogènia. A la superfície del biofilm els nutrients i l'oxigen estan fàcilment disponibles i les cèl·lules creixen activament. A les capes del biofilm més profundes, on els nutrients i l'oxigen són limitats, els bacteris creixen lentament o no creixen. Això explicaria perquè la majoria d'antimicrobians que actuen sobre cèl·lules (que s'anomenen actives metabòlicament) són insuficients per a l'eradicació dels biofilms bacterians (Lewis, 2001, Drenkard, 2003, Teitzel & Parsek, 2003). L'expressió de certs gens i el QS també s'ha vist que incrementen la tolerància dels biofilms a diferents compostos antibacterians (Davies, *et al.*, 1998, Bjarnsholt, *et al.*, 2005).

Totes aquestes raons demostren perquè l'estil de vida en forma de biofilm és avantatjosa pels microorganismes. L'elevada densitat cel·lular i l'estructura dels biofilms també promouen un elevat intercanvi genètic a través de la conjugació i transformació (Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

Molts bacteris són capaços de formar biofilms i *P. aeruginosa* ha estat l'exemple més ben estudiat per exemplificar els diferents estadis en el desenvolupament dels biofilms. El primer patró incloua diferents estadis. Primerament, la unió de les cèl·lules a una superfície sòlida. Després de l'adhesió, les cèl·lules formen una monocapa a la superfície sòlida. Posteriorment, es formen petits grups de cèl·lules anomenades microcolònies. La diferenciació d'aquestes



microcolònies esdevindrà un biofilm madur en forma de torres o més comunament anomenat com forma de *mushrooms*. En aquestes estructures les cèl·lules estan encaixonades dins d'una matriu d'exopolisacàrid o EPS (Costerton, *et al.*, 1999, Parsek & Greenberg, 2000). Aquestes estructures presumiblement serveixen per a portar nutrients i eliminar productes de rebuig a les cèl·lules (Stoodley, *et al.*, 2002). Vegeu el diagrama de la formació de biofilm dissenyada per *P. aeruginosa* a la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Diagrama de la formació de biofilm en *P. aeruginosa* especificant els diferents estadis. Els estadis inclouen l'adhesió de les cèl·lules a la superfície, el creixement i agregació en monocapa i microcolònies, maduració i manteniment de l'arquitectura del biofilm. Posteriorment a aquests estadis vindria el desprendiment dels bacteris de l'estructura del biofilm per a colonitzar altres ambients. Figura basada en Fuqua i Greenberg (2002) el col·loqui de Parsek i Greenberg (2000) .

Nombrosos estudis en *P. aeruginosa* han posat de manifest les bases genètiques i moleculars que podrien estar implicades en cadascuna de les etapes de la formació del biofilm. Per exemple, des dels inicis, els estudis realitzats per O'Toole i Kolter (1998) van demostrar que durant la fase inicial eren necessaris els flagels i el pili tipus IV per tal que les cèl·lules s'adherissin a les superfícies de plàstic on realitzaven els assaigs. Aquest pili tipus IV està relacionat amb a motilitat del tipus *twitching*, la qual van considerar necessària per a l'agregació i el desenvolupament de microcolònies. El *twitching* és una motilitat en superfície que requereix el pili tipus IV per al moviment. L'acció d'aquests pilis ajuda a l'extensió i retracció de les cèl·lules. També es va demostrar que l'expressió de l'EPS s'inicia un cop les cèl·lules s'havien adherit a la superfície (Davies & Geesey, 1995). En l'estadi de maduració que permet la diferenciació de microcolònies en biofilms madurs es va apuntar que intervenia el sistema de QS regulat per les AHLs (Davies, *et al.*, 1998).

La típica matriu del biofilm està composta principalment de polisacàrids extracel·lulars acompanyats possiblement de proteïnes i DNA. L'estructura i composició precisa de cada biofilm varia en funció de les espècies que hi resideixen i de les condicions ambientals (Dickschat, 2010). Per exemple, la presència de DNA extracel·lular en *P. aeruginosa* sembla necessària per a la formació de biofilms en estadis inicials, degut que el tractament amb

## Introducció

l'enzim DNAasa sobre biofilms joves dissolt aquestes estructures. (Whitchurch, *et al.*, 2002). Estudis posteriors han mostrat que el tractament amb DNAasa també degrada els biofilms madurs (Nemoto, *et al.*, 2003). Ambdós treballs demostren la importància del DNA extracel·lular en la interconnexió entre cèl·lules. Allesen-Holm, *et al.*, (2006), a més a més suggereixen que, la presència de DNA extracel·lular és un procés que depèn de les molècules senyals AHLs, per tant és un altre procés en la formació de biofilms que sembla estar regulat pel QS. Conjuntament amb el DNA extracel·lular inhibir la biosíntesi de l'EPS té un rol crític en els biofilms de *P. aeruginosa* (Matsukawa & Greenberg, 2004).

Diversos factors determinants genètics i ambientals han demostrat que influeixen en el biofilm de *P. aeruginosa*. El factor nutricional és clau per als canvis estructurals d'aquest, és a dir, la font de carboni sobre la qual *P. aeruginosa* es cultiva dicta com serà l'arquitectura del biofilm. S'ha vist que diversos gens estan implicats també en aquesta estructura, com per exemple els que codifiquen pel pili, el flagel o els EPS secretats.

En base a les condicions nutricionals s'han documentat dos tipus de morfologies de biofilms en *P. aeruginosa*. El biofilm clàssic i diferenciat descrit primerament en *P. aeruginosa* que presenta estructures en forma de *mushrooms* (vegeu Figura 1.6) o en forma de lamina llisa i uniforme (Shrout, *et al.*, 2011). Factors com la producció de ramnolípid, el QS i la disponibilitat de nutrients s'ha vist que controlen l'arquitectura del biofilm. Per tant, l'estructura i resistència del biofilm està controlada per un procés polifacètic, que implica la combinació de nutrients i reguladors com ara el QS (De Kievit, *et al.*, 2001, Conway, *et al.*, 2002, Christensen, *et al.*, 2002, Heydorn, *et al.*, 2002, Rice, *et al.*, 2005).

Des de la primera troballa en què es va veure que el QS controlava la formació de biofilms, es va creure que inhibint la senyalització es podrien eradicar els biofilms. No obstant això els treballs posteriors han demostrat que la detecció de QS i la regulació d'aquest en el procés de formació de biofilms era molt més complexa del que s'havia pensat. Nombrosos treballs publicats han demostrat múltiples funcions rellevants en el procés de formació de biofilms regulades per QS. Tot i això, en segons quines condicions de creixement les soques mutants respecte les salvatges no mostraven diferències. Fins i tot, en un moment donat alguns investigadors van informar que el QS no influenciava en la formació de biofilms (Heydorn, *et al.*, 2002), mentre que altres afirmaven completament el contrari (Davies, *et al.*, 1998, De Kievit, *et al.*, 2001). La literatura ha ocasionat confusió a la comunitat científica perquè no s'entenia el motiu pel qual mentre en alguns laboratoris es veia efecte en altres no.

Aquest fet avui en dia no és sorprenent, perquè ara es coneix que les condicions de creixement tenen un efecte profund en la formació dels biofilms i es coneix que el QS també juga un paper important. Per tant, el que sembla cert, i els científics més experts subratllen, és que la formació de biofilms en *P. aeruginosa* i en altres espècies està controlada pel QS en diferents etapes del desenvolupament dels biofilms i que al seu torn estan influenciades per a les condicions de creixement (Shrout, *et al.*, 2006, Shrout, *et al.*, 2011).

Els biofilms han estat molt estudiats durant les darreres dècades, en part per l'elevat impacte que suposen aquestes estructures en la virulència de moltes espècies patògenes. La comunicació cel·lular i el QS són els mecanismes proposats que es creu que podrien governar els desenvolupament i manteniment del biofilm (Hentzer, *et al.*, 2003, Kirisits & Parsek, 2006). Diverses espècies patògenes humanes s'ha vist que produeixen biofilms que depenen de les molècules senyal d'AHLs. Aquests patògens són particularment un greu problema entre els pacients de FQ. Dins d'aquest context, el patògen humà més important és *P. aeruginosa* (Singh, *et al.*, 2000, Colnaghi Simionato, *et al.*, 2007). *B. cepacia* és un altre patògen oportunista que forma biofilms sota el control de les AHLs en els pulmons de pacients amb FQ (Huber, *et al.*, 2001, Conway, *et al.*, 2002). Un altre exemple de patògen oportunista capaç de formar biofilms regulat pel sistema de QS-AHL és *S. marcescens* que en aquest cas produeix particularment infeccions oculars en pacients immunocompromesos entre altres espècies patògens (Rice, *et al.*, 2005). A continuació relacionarem aquestes estructures amb la motilitat en cadascuna de les espècies esmentades.

### **1.8.2. Influència del *quorum sensing* en la motilitat.**

Les diferents formes de motilitat que inclouen el *swimming* a *Yersinia enterocolitica* (Atkinson, *et al.*, 2006), *twitching* a *P. aeruginosa* (Glessner, *et al.*, 1999) i *swarming* a *S. liquefaciens*, *B. cepacia* i *P. aeruginosa* (Eberl, *et al.*, 1996, Kohler, *et al.*, 2000, Huber, *et al.*, 2001) s'ha descrit que estan regulades pel QS en diferents espècies bacterianes. Tot i així, existeix controvèrsia, ja que les motilitats del tipus *swimming* i *twitching* no semblen estar regulades pel QS en totes les espècies bacterianes estudiades (Huber, *et al.*, 2001, Shrout, *et al.*, 2011).

Nombrosos estudis han posat de manifest la importància del QS en la regulació de la motilitat del tipus *swarming* en moltes espècies bacterianes, entre les millor estudiades es troba *P. aeruginosa*. El *swarming* és un moviment multicel·lular especialitzat el qual està mediat per la flagel·lació cel·lular que facilita la colonització de superfícies de forma

coordinada (Henrichsen, 1972). Aquesta motilitat és generalitzada entre els bacteris flagel·lats incloent els gèneres de *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Serratia* i *Proteus* (Harshey, 2003, Daniels, *et al.*, 2004). Aquest fenomen implica diferenciació cel·lular, extensa flagel·lació i el contacte entre bacteris veïns durant la migració (Harshey, 1994). Un treball previ ha proporcionat proves i evidències que en molts bacteris aquesta motilitat està regulada pel QS (Daniels, *et al.*, 2004). No és sorprenent que en molts bacteris el *swarming* estigui acoblat al QS degut al fet que és necessari una elevada densitat cel·lular per iniciar aquest procés (Verstraeten, *et al.*, 2008). Per exemple en *S. liquefaciens*, *P. aeruginosa* i *B. cenocepacia* s'ha demostrat que el QS es requereix per aquesta motilitat (Ochsner & Reiser, 1995, Lindum, *et al.*, 1998, Huber, *et al.*, 2001, Wopperer, *et al.*, 2006).

Diferents estudis han posat de manifest que el *swarming* en *P. aeruginosa* està regulat pel QS a través del regulador RhIR que regula l'expressió de gens *rhlAB* els quals s'encarreguen de la producció de ramnolípid. Per tant, la motilitat en *P. aeruginosa* està influenciada a través de la producció de ramnolípid, ja que aquest biotensioactiu actua com a humectant disminuint la tensió superficial local que facilita la motilitat cel·lular (Kohler, *et al.*, 2000, Deziel, *et al.*, 2003).

### **1.8.2.1. El rol de la motilitat en el procés de formació de biofilms.**

Com ja hem vist en l'apartat anterior un altre factor important en el desenvolupament del biofilm en *P. aeruginosa* és la motilitat. Estudis realitzats per Shrout, *et al.*, (2006), pretenien esbrinar si la motilitat del tipus *swarming* afectava a la formació de biofilms en *P. aeruginosa*. En aquest treball s'adonen que aquest tipus de motilitat intervé en les primeres etapes del biofilm. També demostren que el rol del QS i la motilitat del tipus *swarming* afecten en la conformació dels biofilms en funció dels nutrients disponibles. Sembla doncs que la concentració de nutrients, és a dir, les condicions ambientals, poden dictar quan el sistema de QS és important per a la formació de biofilms. Aquests autors suggereixen que les diferents morfologies del biofilm, és a dir, en forma de una capa llisa uniforme o amb estructures en forma de *mushrooms* depèn de la motilitat del tipus *swarming* en les cèl·lules durant els estadis inicials del biofilm i de les condicions nutritives. Proposen un model en què si la motilitat del tipus *swarming* en els primers estadis és escassa, apareixerà una estructura del tipus *mushrooms* mentre que si el *swarming* està activat en els primers estadis l'estructura del biofilm esdevindrà de forma uniforme i plana. Aquest mateix fenotip s'ha estudiat per altres autors com Caiazza, *et al.*, (2007). Per tant, suggereixen que els factors ambientals/nutricionals

influeixen la motilitat del tipus *swarming* i que aquesta motilitat al seu torn influeix l'estructura del biofilm.

Per exemple, l'espècie de *S. marcescens*, important patògen oportunista, ha demostrat que el sistema de QS regulat per les AHLs controla la motilitat del tipus *swarming* a través de la producció del tensioactiu anomenat serrawetina (Lindum, *et al.*, 1998, Eberl, *et al.*, 1999). L'estructura del biofilm descrita en aquesta espècie és de forma filamentosa composta de cadenes de cèl·lules formant filaments i clústers de cèl·lules. Mutants per la síntesi de molècules senyal d'AHLs s'ha vist que perden l'estructura tridimensional filamentosa i són menys capaços d'adherir-se a les superfícies abiòtiques. Per tant sembla que l'adhesió, la motilitat del tipus *swarming* i l'estructura del biofilm està regulada pel QS (Labbate, *et al.*, 2004). Altres treballs realitzats en *S. marcescens* demostren que la morfologia del biofilm depèn dels nutrients. L'arquitectura filamentosa és afavorida per condicions que presenten un alt contingut de nutrients mentre que el clàssic biofilm amb estructura de microcolònia i *mushrooms* s'observa en condicions de baix contingut de nutrients. Paral·lelament aquest canvi fenotípic es va veure controlat pel sistema de QS regulat per les AHLs en diferents estadis del cicle de formació del biofilm en funció del medi utilitzat (Rice, *et al.*, 2005).

Una altra de les soques patògenes més ben estudiades és *B. cepacia*. Aquesta soca i *P. aeruginosa* sovint es detecten formant biofilms mixtes en els pulmons de pacients amb FQ. En aquesta soca també s'ha demostrat que la motilitat del tipus *swarming* i els biofilms estan regulats pel sistema de QS-AHL (Huber, *et al.*, 2001). La mutació en els reguladors de QS CepR/I suposa canvis en la maduració de biofilms. La mutació en aquest mateix sistema també disminueix la motilitat del tipus *swarming*, la qual és restaurada afegint biosurfactants provinents d'altres espècies bacterianes mentre que les motilitats del tipus *twitching* i *swimming* no es veuen afectades per aquesta mutació, per tant no depenen del sistema de QS regulat per les molècules AHLs.

### **1.9. L'ús d'inhibidors de *quorum sensing* com a diana terapèutica.**

En els bacteris gram negatius, les molècules AI del tipus AHLs, han estat molt estudiades els darrers anys degut a la persistència i la diversitat de processos que regulen. Per tant irrompre en aquest sistema de comunicació cel·lular pot esdevenir una estratègia molt útil i encoratjadora (Dickschat, 2010).

## Introducció

El QS és una diana atractiva per a la intervenció terapèutica d'infeccions bacterianes. Per tant, els inhibidors de *quorum sensing* (IQS) ja es consideren una nova classe de medicaments antimicrobians. S'han de considerar diversos factors a l'hora de dissenyar els IQS com a agents terapèutics a més a més dels típics exigits en qualsevol tipus de fàrmac, com serien: l'absorció, distribució, metabolisme i excreció. Un factor rellevant a considerar seria que el QS ajuda a coordinar el comportament bacterià en una població però no és crític en la supervivència *per se*. Per tant, l'ús dels IQS com a adjuvants ja que no tenen efectes bactericides o bacteriostàtics, ajudarien a atenuar la virulència, reduir la formació de biofilms i incrementar la sensibilitat a teràpies mèdiques. Un altre factor a tenir en compte a l'hora de dissenyar IQS és que existeixen diferents tipus de sistemes de QS com hem vist en seccions anteriors. Hi ha bacteris capaços d'utilitzar diferents tipus de QS regulats per diferents tipus de molècules AI, per tant, silenciar un sistema de QS, mitjançant IQS específics per un sistema de QS en particular, es pot compensar amb l'existència d'un altre sistema en la mateixa soca bacteriana. Tot i que s'han de valorar molt factors a l'hora de dissenyar un IQS com a medicament terapèutic, es considera que aquests tindran elevades aplicacions en un futur proper. Un dels motius pels quals es consideren molt atractius és perquè resulten molt adients per a les teràpies antimicrobianes ja que són menys propensos a generar resistències bacterianes, un gran obstacle que ha experimentat l'ús d'antibiòtics les darreres dècades (Ni, *et al.*, 2009, Bhardwaj, *et al.*, 2013).

Hi ha diferents maneres d'inhibir els diferents sistemes de QS explicats anteriorment. En aquest treball ens centrem només en el sistema de QS regulat per les AHLs i, per tant, farem un breu resum de les diverses metodologies que s'han estudiat per tal de bloquejar i intervenir aquest sistema.

### **1.9.1. Tipus d'inhibidors de *quorum sensing* regulat per AHLs.**

Els IQS són extrets de recursos naturals com plantes i fongs o de síntesi *de novo*. A mesura que s'han anat descobrint mecanismes d'interferència de QS, ja sigui interespecies o interregnes, s'ha obert un nou camp que pretén imitar el que succeeix a la natura.

Poden actuar inhibint el QS a partir de diferents llocs d'atac. Aquests es basen en interferir el procés de generació del senyal AHL, degradant les AHLs un cop sintetitzada o bloquejant la regulació d'aquesta (a nivell de recepció LuxR-AHL) (Uroz, *et al.*, 2009).

### 1.9.1.1. Interferir en la generació de la senyal AHL.

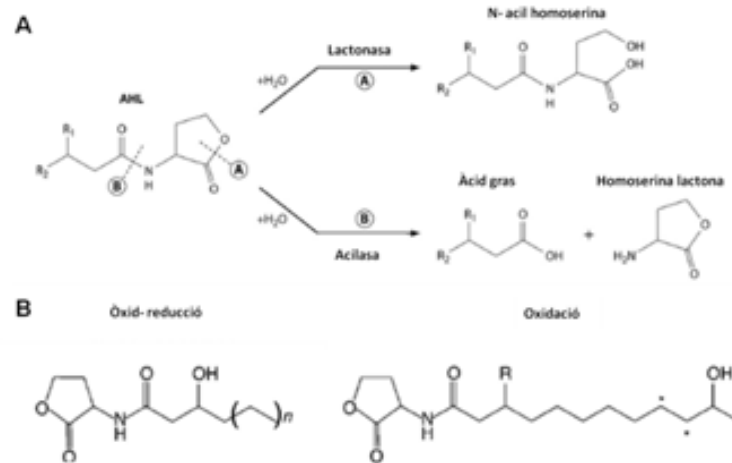
La interferència en la producció d'AHLs es realitza utilitzant compostos que inhibeixin la biosíntesi d'àcids grassos, SAM, proteïnes del tipus LuxI o bombes de flux (que impedirien el pas de les molècules de cadena llarga a través de la membrana). Treballs realitzats a *Burkholderia pseudomallei* a partir de mutants en bombes de flux disminueixen l'acumulació d'AHLs a l'espai extracel·lular (Chan & Chua, 2005). Substrats anàlegs als precursors d'AHLs s'ha vist que bloquegen la producció d'AHLs *in vitro*, tot i que no s'ha provat *in vivo* perquè és probable que afectin les vies centrals del metabolisme d'aminoàcids i d'àcids grassos (Rasmussen & Givskov, 2006).

### 1.9.1.2. Degradar les AHLs.

La inactivació o degradació de la molècula senyal AHL es pot ocasionar a partir de diferents metodologies com ara la degradació química, destrucció enzimàtica i metabolisme de les AHLs. Una simple forma d'inactivar les AHLs és basificant el medi a pH superior a 7, que causa una lactonolisis de l'AHL (obertura de l'anell lactona). Una gran varietat d'organismes utilitzen aquesta estratègia per defensar-se davant de bacteris invasors que utilitzen el sistema de QS per a controlar gens de virulència. Com més curta és la llargada de la cadena acil més sensible és la molècula a patir aquesta lactonolisis (Byers, *et al.*, 2002, Yates, *et al.*, 2002).

La lactonolisis també es produeix per activitat enzimàtica. Membres del gènere *Bacillus* produeixen un enzim anomenat AiiA específic per a la degradació d'AHLs. L'activitat d'aquest enzim suposa una disminució de la quantitat de molècula senyal bioactiva degut a la catàlisi que provoca l'obertura de l'anell lactona (Figura 1.7-A) (Dong, *et al.*, 2000, Dong, *et al.*, 2001, Wang, *et al.*, 2004). L'enzim AiiA lactonasa s'ha utilitzat per prevenir malalties en plantes, provocades per *E. carotovora* i *A. tumefaciens* gràcies a l'expressió gènica del gen *aiiA* en l'hoste o en l'espècie invasora (Dong, *et al.*, 2000, Molina, *et al.*, 2003). Tot i que les lactonases del tipus AiiA, presents en el gènere *Bacillus*, van ser les primeres descrites a la bibliografia, diverses espècies bacterianes patògenes com per exemple *A. tumefaciens* i *Klebsiella pneumoniae* s'ha vist que produeixen enzims homòlegs al gen *aiiA* com a mecanisme de defensa per a competir contra bacteris productors d'AHLs (Carrier, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2003, Park, *et al.*, 2003). Aquesta classe d'enzims podria tenir moltes aplicacions tot i que existeix un inconvenient en la reacció de lactonolisis ja que és reverible a pH àcid (Camara, *et al.*, 2002).

## Introducció



**Figura 1.7. A,** Mecanisme d'acció dels enzims lactonasa i acilasa que degraden les AHLs. Les línies discontinúes sobre l'AHL indiquen el lloc d'escissió de l'enllaç de la molècula d'AHLs produït per l'enzim: lactonasa (A) i acilasa (B). També s'indiquen els subproductes d'aquesta degradació. **B,** Mecanisme d'acció dels enzims òxid-reductors que modifiquen les AHLs. Figura adaptada de LaSarre i Federle (2013) i de Uroz, *et al.*, (2009).

La degradació enzimàtica de les AHLs també es produeix mitjançant enzims anomenats acilases, que hidrolitzen les AHLs separant la cadena acil de l'anell homoserina lactona (Figura 1.7-A). Aquesta degradació és irreversible i homòlegs a aquests enzims són presents en diferents espècies bacterianes com *P. aeruginosa* (Leadbetter & Greenberg, 2000, Lin, *et al.*, 2003). Mentre que les lactonases hidrolitzen qualsevol tipus d'AHLs ja que actuen a l'anell homoserina lactona, les acilases són específiques de substrat, és a dir, la seva activitat és específica en funció de la llargada de la cadena acil i la possible substitució en el carboni 3 de la molècula d'AHL (LaSarre & Federle, 2013). Per exemple, mitjançant aquests enzims les espècies com *Variovorax paradoxus* o *P. aeruginosa* són capaces de metabolitzar les AHLs com a font de carboni i nitrogen (Leadbetter & Greenberg, 2000, Huang, *et al.*, 2003).

També existeixen enzims òxid-reductors en bacteris capaços de modificar les AHLs a partir de la reducció o oxidació de la cadena acil (Figura 1.7-B). Tot i que aquests enzims no inactiven la molècula com els anteriors esmentats, sí que influeixen en l'activitat d'aquesta, ja que la modificació de les AHLs pot interferir en l'especificitat i reconeixement i per tant interferir en la regulació de les funcions del QS. Aquest grup d'enzims és menys abundant entre els estudiats fins ara (Uroz, *et al.*, 2005).

### 1.9.1.3. Bloquejar el receptor.

S'han dissenyat anàlegs a les AHLs per tal de bloquejar el receptor i interferir en la senyal. Els anàlegs impossibiliten la unió LuxR-AHL i impedeixen la regulació dels gens de QS. Alguns d'aquests anàlegs són produïts per alguns organismes superiors, com per exemple les



furanones secretades per l'alga *Delisea pulchra* que desplacen les AHLs dels receptors i inhibeixen la colonització, el *swarming* i la formació de biofilms d'alguns bacteris gram negatius (Givskov, *et al.*, 1996, Manefield, *et al.*, 1999). Els fongs també sintetitzen IQS anomenats patulin i àcid penicillic que actuen a nivell del regulador LuxR en el QS de *P. aeruginosa* (Rasmussen, *et al.*, 2005). Els extractes d'aills també contenen tres antagonistes d'AHLs que interfereixen en els reguladors del tipus LuxR com és el cas de *P. aeruginosa*, on s'ha detectat que la unió d'aquets anàlegs amb el regulador de QS LasR provoca que els biofilms siguin més susceptibles als antibiòtics i detergents que en condicions normals (Hentzer, *et al.*, 2003, Persson, *et al.*, 2005). Han estat dissenyats antagonistes d'AHLs similars als que es produeixen a la natura com per exemple les furanones o AHLs amb estructura modificada (modificacions que es produeixen en l'anell, la cadena o ambdues parts) i s'ha vist que són efectius com a IQS en diferents estudis (Wu, *et al.*, 2004, Ni, *et al.*, 2009).

### **1.9.2. Aplicacions dels inhibidors de *quorum sensing*.**

Els estudis en QS i en IQS tenen un significatiu impacte econòmic degut a la diversificació d'aplicacions que pot aportar el coneixement en aquest àmbit. Molts exemples els trobem per exemple en l'agricultura com és el cas de *Rhizobium* que fa simbiosis amb plantes lleguminoses i ajuda en la fixació de nitrogen. En la indústria alimentària per evitar el deteriorament d'aliments ocasionat per exemple pels gèneres de *Pseudomonas* o *Erwinia* i per a prevenir el creixement de bacteris contaminants en els aliments envasats. En la indústria energètica per a la generació d'energia, en la indústria paperera o en el tractament d'aigües residuals entre altres exemples.

Una de les aplicacions més importants dels IQS és el seu ús com agents antimicrobians. El desenvolupament d'un agent antimicrobià que no inhibeixi el creixement bacterià sinó que inhibeixi la seva virulència i no provoqui la generació de resistències per a la supervivència de l'espècie és un fàrmac molt prometedor. Molts estudis que utilitzen diferents tipus d'IQS han demostrat la seva utilitat en el control de patògens en plantes i infeccions en models animals com en nemàtodes i infeccions pulmonars en ratolins (Hentzer, *et al.*, 2003, Bjarnsholt, *et al.*, 2005, Rasmussen, *et al.*, 2005). Aquests compostos no només inhibeixen la virulència del patògen sinó que, a més a més, aporten avantatges en l'afebliment dels biofilms bacterians i fan que aquestes estructures siguin més sensibles als antibiòtics i a la resposta immunitària de l'hoste. Els IQS no maten els patògens sinó que actuen sinèrgicament amb els antibiòtics i el sistema immune de l'hoste i ajuden sobre el control dels bacteris invasors (Dong, *et al.*, 2007).

## Introducció

Els darrers anys han aparegut un nombre creixent de patents arran de la creixent investigació en aquest camp (Kalia & Purohit, 2011, Romero, *et al.*, 2012, Bhardwaj, *et al.*, 2013). Tot i això l'aparició de resistències ja s'ha descrit (Maeda, *et al.*, 2012). Molts compostos patentats podrien patir limitacions *in vivo* degut a diferents problemes. Per exemple, com s'ha demostrat en *P. aeruginosa*, la hidròlisi de l'anell lactona en els anàlegs de les AHLs degut a la presència de lactonases detectades en els epitelis de les vies respiratòries en humans que són capaces d'apagar el senyal (Chun, *et al.*, 2004, Hastings, 2004). Els IQS tenen molt bons resultats *in vitro* i en diferents models animals però calen molts més estudis per tal que arribin a superar els assaigs clínics i puguin ser comercialitzats com a tractaments efectius en humans (Bhardwaj, *et al.*, 2013).

Atès el gran ventall d'aplicacions que poden oferir els estudis en IQS és molt important entendre l'estructura, funció i els mecanismes d'acció d'aquests. Afavorir un millor disseny d'IQS, entre ells, amb finalitats terapèutiques entre moltes altres aplicacions és un camp que encara ha de seguir sent molt explorat (Bhardwaj, *et al.*, 2013).

### **1.10. Detecció d'AHLs mitjançant bacteris biosensors.**

Un biosensor és una eina o sistema analític compost per un material biològic (com per exemple un enzim, anticòs, cèl·lula, orgànul o combinacions d'aquests) i una part transductora que convertirà el senyal bioquímic en un senyal quantificable.

Durant les darreres dècades, ha estat possible identificar un gran nombre de sistemes de QS regulat per les molècules del tipus AHLs gràcies a l'ús de bacteris biosensors. Els bacteris biosensors no produeixen AHLs però són capaços de detectar la presència d'AHLs exògenes gràcies al fet que contenen una proteïna funcional del tipus LuxR clonada conjuntament amb un promotor fort. Quan la proteïna LuxR de la soca biosensora detecta la presència d'AHLs exògenes, procedents de la soca problema, un cop es forma el complex LuxR-AHL es regula positivament l'expressió d'un gen indicador com podrien ser els gens que codifiquen per enzims com la  $\beta$ -galactosidasa, *Green fluorescent protein* (Gfp), producció del pigment de la violaceïna o luciferases.

El primer pas per a determinar si un bacteri conté un sistema de QS del tipus LuxI/R és testar si la soca produeix o no molècules AHLs. Cada soca biosensora d'AHL conté un tipus de LuxR homòleg el qual té especificitat per diferents tipus d'AHLs (o el que hem anomenat anteriorment AHL cognada). Degut al fet que cada soca biosensora respon específicament a un

tipus d' AHLs, és molt important l'ús de diferents soques biosensores quan volem determinar si una espècie bacteriana és productora o no d' AHLs. Com que els diferents homòlegs de LuxR tenen diverses afinitats a les diferents AHLs, no es pot comparar la intensitat de resposta d'una AHL amb la resposta obtinguda amb una altra diferent. Les soques biosensores es poden utilitzar de diferents maneres per a detectar les AHLs en la soca problema (Steindler & Venturi, 2007).

### 1.10.1. Mètodes i usos de les soques biosensores.

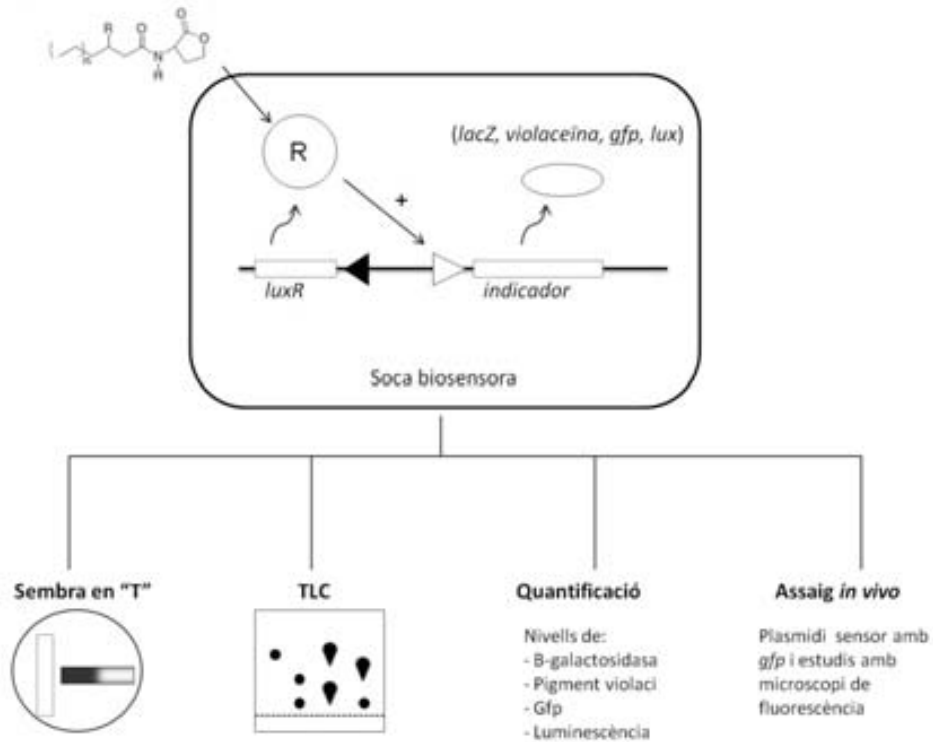
La detecció d' AHLs més senzilla es basa en enfrontar la soca biosensora amb la soca problema realitzant una estria en forma de "T" en una placa de Petri (Figura 1.8). Si la soca problema produeix AHLs aquestes difondran en el medi i seran detectades per la soca biosensora. El canvi fenotípic en la soca biosensora (pigment violaci, degradació del compost X-gal originant un color blau, activitat *gfp* o luminescència) serà màxim en el punt de contacte més proper amb la soca problema i gradualment perdrà intensitat a mesura que s'allunyi de la soca productora d' AHLs.

Una altra metodologia per a detectar la presència d' AHLs es basa en l'extracció orgànica de les AHLs presents en els sobrenedants saturats de la soca problema, concentrar-los i realitzar una caracterització parcial sobre una Cromatografia en Capa Fina (CCF) per tal de separar les AHLs en funció de les seves característiques estructurals (Figura 1.8). Un cop finalitzada la CCF es diposita sobre aquesta una capa d'agar on creixerà la soca biosensora. Aquest bioassaig permetrà detectar la mobilitat de cada molècula d' AHL perquè apareixeran taques fruit de l'expressió de gen indicador que permetran detectar les AHLs separades en cadascun dels carrils de la cromatografia. La quantitat d' AHLs produïdes i alliberades a l'espai extracel·lular per la soca problema és molt variable i depèn de diferents factors ambientals. Per tant, quan es realitza l' extracció orgànica de les molècules presents en el sobrenedant, el que es pretén és augmentar el senyal, concentrant la mostra moltes vegades, per tal d'afavorir la sensibilitat de l'assaig (McClellan, *et al.*, 1997, Shaw, *et al.*, 1997, Schaefer, *et al.*, 2000).

Les molècules d' AHLs amb substitució -oxo en el tercer carboni produeixen taques en forma de llàgrima mentre que les AHLs que no presenten cap substitució en el tercer carboni formen una taca arrodonida. La separació de les AHLs a la CCF acoblada al bioassaig ofereix una visió ràpida i directa de les AHLs produïdes per la soca problema. Tot i que les AHLs no poden ésser identificades sense ambigüitats a la CCF, aquesta metodologia ajuda a fer una primera caracterització del tipus d' AHLs presents en els sobrenedants de la soca problema. La

## Introducció

CCF permet separar les AHLs en funció de la seva polaritat (llargada de la cadena i substitució en el tercer carboni) i comparar les migracions de les taques obtingudes amb els estàndards. Les AHLs es determinen de forma inequívoca en funció de les propietats electroscòpiques que inclouen l'espectrometria de masses (MS) o la ressonància magnètica nuclear (Schaefer, *et al.*, 2000).



**Figura 1.8.** Esquema general de la construcció i usos de les soques biosensores d'AHLs. A la part superior de la figura es mostra l'estructura d'una molècula AHL. Aquesta està representada per un anell homoserina lactona invariable, una cadena acil de 4 carbonis amb una "n" degut a la llargada variable i una "R" en el carboni 3 per a destacar la possibilitat d'una substitució per un grup -oxo o -hidroxil. L'AHL exògena al interaccionar amb el regulador dins la soca biosensora (que és deficient en la síntesi d'AHLs) l'activa i permet la regulació de la transcripció del gen indicador gràcies a l'especificitat d'unió en el promotor d'aquest (triangle blanc). Normalment el regulador s'expressa de forma constitutiva gràcies a la fusió amb un promotor constitutiu (triangle negre). A la part inferior es mostren els diferents usos que es poden realitzar amb les soques biosensores: sembra en forma de "T", separació en Cromatografia en Capa Fina o TLC, quantificació i assaigs *in vivo*. Vegeu detalls d'aquests usos en el text. Figura adaptada de la revisió feta per Steindler i Venturi (2007).

D'altra banda, algunes soques biosensores es poden utilitzar per a quantificar les AHLs produïdes per la soca problema mesurant l'activitat del gen indicador present en la soca biosensora. Aquesta eina també serveix per a determinar la dosi-resposta d'una soca biosensora a determinades concentracions d'AHLs a més a més que proporciona una aproximació acurada en l'estudi de la producció d'AHLs en funció de les condicions de creixement de la soca problema. Les soques biosensores basades en el gen indicador *gfp* s'han

dissenyat per a fer un seguiment *in vivo* de la producció d'AHLs en les cèl·lules gràcies a la microscòpia de fluorescència (Steindler & Venturi, 2007).

### 1.10.2. Tipus de soques biosensores.

#### 1.10.2.1. Soques biosensores d'AHLs de cadena curta.

Algunes soques biosensores han estat construïdes amb un regulador del tipus LuxR capaç de detectar AHLs de cadena acil curta, compreses entre 4 i 8 carbonis. La soca biosensora més comuna d'aquest grup seria el bacteri *Chromobacterium violaceum* CV026.

*C. violaceum* és un bacteri gram negatiu que produeix un pigment violeta antibacterià anomenat violaceïna. Aquest pigment es produeix a través del sistema de QS-AHL regulat per les proteïnes Cvil/R el qual produeix i respon a la molècula senyal C6-HSL. McClean, *et al.*, (1997) van construir la soca biosensora *C. violaceum* CV026 productora de violaceïna però deficient en la síntesi de molècules AHLs gràcies a la realització d'una mutació en el gen de la sintasa d'AHLs *cvil* mitjançant la inserció per un transposó Tn5. Aquesta soca és adient per a la detecció de molècules d'AHLs de cadena curta (Steindler & Venturi, 2007). Quan la soca biosensora *C. violaceum* CV026 s'exposa amb les AHLs exògenes que siguin capaces d'interaccionar amb el regulador CviR es produeix un canvi de coloració de la soca perquè produeix un pigment violaci. L'AHL més activa per aquest bioassaig és la C6-HSL, fet no sorprenent degut que l'AHL natural produïda per la soca salvatge de *C. violaceum* és la C6-HSL. Aquesta soca biosensora també és capaç de detectar altres AHLs però amb menor sensibilitat. Vegeu la Taula 1.5 per a més especificacions de les AHLs detectades i usos de la soca biosensora.

El sistema indicador d'altres soques biosensores es basa en el sistema LuxI/R de *V. fischeri* que permet la detecció d'AHLs mitjançant la luminescència. Aquest sistema recau en la construcció d'un plasmidi biosensor que conté el gen *luxR* i l'operó *luxCDABE* sota el promotor del gen *luxI*. Aquest tipus de construcció normalment l'alberga *E. coli* la qual no produeix AHLs. També s'han dissenyat plasmidis com per exemple el plasmidi pBS403, que conté la construcció anteriorment esmentada però aquesta està clonada en un vector d'ampli espectre, és a dir, que és replicatiu en un gran nombre de bacteris gram negatius. El regulador LuxR de *V. fischeri* detecta AHLs de cadena curta. És més sensible per la C6oxo-HSL cognada, tot i que també detecta amb menor sensibilitat la C6-HSL, C8oxo-HSL i C8-HSL. No detecta C4-HSL o AHLs de cadena llarga. Aquest tipus de plasmidis biosensors tenen diferents usos (vegeu Taula

## Introducció

1.5), a destacar que també s'usen per la quantificació de la luminescència, però és necessari un luminòmetre (Winson, *et al.*, 1998).

**Taula 1.5.** Conjunt d'AHLS biosensores. Taula basada en la revisió feta per Steindler i Venturi (2007).

Soca/ plasmidi biosensor	Hoste	Basat en Sistema de QS	Gen indicador/detecció	Respon millor a les AHL	Bona detecció per les AHL:	Usat en bioassaig del tipus:	Referència
CV026	<i>C.violaceum</i>	Cvii/R ( <i>C.violaceum</i> )	violaceïna/pigment de violaceïna	C6-HSL	C6oxo-HSL, C8-HSL, C8oxo- HSL,C4-HSL	T.E,CCF	(McClellan, <i>et al.</i> , 1997)
pSB403	Ampli ventall d'hostes	LuxI/R ( <i>V.fischeri</i> )	<i>luxCDABE</i> / bioluminescència	C6oxo-HSL	C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL	CCF, Q	(Winson, <i>et al.</i> , 1998)
pAL101	<i>E. coli</i> (mutant sdiA)	RhlI/R ( <i>P.aeruginosa</i> )	<i>luxCDABE</i> / bioluminescència	C4-HSL		CCF, Q	(Lindsay & Ahmer, 2005)
pSB1075	<i>E.coli</i>	Lasi/R ( <i>P.aeruginosa</i> )	<i>luxCDABE</i> / bioluminescència	C12oxo-HSL	C10oxo-HSL, C12-HSL	CCF,Q	(Winson, <i>et al.</i> , 1998)
pKDT17	<i>E.coli</i>	Lasi/R ( <i>P.aeruginosa</i> )	B-galactosidasa /degradació compost X-gal	C12oxo-HSL	C10oxo-HSL, C10- HSL,C12-HSL	CCF,Q	(Pearson, <i>et al.</i> , 1994)
pJBA132	Ampli ventall d'hostes	LuxI/R ( <i>V.fischeri</i> )	<i>gfp</i> /fluorescència	C6oxo-HSL	C6-HSL, C8- HSL, C12oxo- HSL	T.E, CCF, marcatge cèl·lules aïllades	(Andersen, <i>et al.</i> , 2001)
pJBA89	Ampli ventall d'hostes	LuxI/R ( <i>V.fischeri</i> )	<i>gfp</i> /fluorescència	Com l'anterior però amb major sensibilitat	C6-HSL, C8- HSL, C12oxo- HSL	T.E, CCF, marcatge cèl·lules aïllades	(Andersen, <i>et al.</i> , 2001)
pZLR4	<i>A.tumefaciens</i> NT1	Tral/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	B-galactosidasa /degradació compost X-gal	C8oxo-HSL	C6-HSL, C8- HSL, C10- HSL,C12-HSL, C6H-HSL, C8H- HSL,C10H- HSL i totes les 3-oxo- AHL.	T.E, CCF, Q	(Farrand, <i>et al.</i> , 2002)
pCF218+ pCF372	<i>A.tumefaciens</i> WCF47	Tral/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	B-galactosidasa /degradació compost X-gal	Com l'anterior però amb major sensibilitat	Com l'anterior però amb major sensibilitat	CCF,Q	(Zhu, <i>et al.</i> , 1998)
pJZ384+ pJZ410+ pJZ372	<i>A.tumefaciens</i> KYC55	Tral/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	B-galactosidasa /degradació compost X-gal	Com l'anterior però amb major sensibilitat	Com l'anterior però amb major sensibilitat	CCF, Q	(Zhu, <i>et al.</i> , 2003)

T.E es refereix a estria en forma de "T"; CCF es refereix a Cromatografia en Capa Fina; Q es refereix a quantificació.

Una altra soca biosensora que és interessant esmentar és la *E. coli* deficient pel regulador homòleg SdiA. Aquesta soca biosensora es basa en el sistema de QS RhlI/R de *P. aeruginosa* per a la detecció de molècules C4-HSL. La construcció del plasmidi pAL101 està compost pel gen *rhIR* i l'operó *luxCDABE* fusionat amb el promotor de la sintasa *rhII*. Aquest plasmidi funciona millor en un fons genètic en *E. coli* deficient pel regulador SdiA perquè aquest podria interferir en la detecció de C4-HSL activant el promotor de *rhII* (Lindsay & Ahmer, 2005). Vegeu usos i aplicacions especificades a la Taula 1.5.

### 1.10.2.2. Soques biosenores d'AHLS de cadena llarga.

Hi ha plasmidis que s'han dissenyat directament per a detectar AHLs de cadena llarga. Aquests sistemes es basen en la construcció d'un plasmidi biosensor basats en el sistema de QS de *P. aeruginosa* LasI/R però amb l'operó indicador de luminescència *luxCDABE*. Per exemple el plasmidi pBS1075 conté el gen *lasR* i el promotor del gen *lasI* que controla l'expressió de l'operó *luxCDABE*. Aquest regulador LasR respon a AHLs de cadena llarga com C12oxo-HSL, C10oxo-HSL i C12-HSL (Winson, *et al.*, 1998). Una altra soca biosensora d'*E. coli* també basada en el sistema LasI/R és la que conté el plasmidi biosensor pKDT17. Aquest plasmidi es diferencia de l'anterior perquè com a gen indicador conté el gen *lacZ* que codifica per a l'enzim  $\beta$ -galactosidasa sota el promotor del gen *lasB*. El gen *lasB* codifica per una elastasa la qual està regulada en *P. aeruginosa* pel sistema de QS LasI/R (Pearson, *et al.*, 1994). Vegeu especificacions dels usos d'aquests plasmidis a la Taula 1.5.

### 1.10.2.3. Soques biosenores d'AHLS amb ampli rang de detecció.

Les soques biosenores d'AHLS estan limitades als requeriments d'especificitat a les diferents AHLs segons el tipus de regulador LuxR utilitzat. La majoria de reguladors estan restringits a un rang d'AHLS a les quals poden respondre. Les soques biosenores d'*A. tumefaciens* basades en el sistema de QS TraI/R detecten un ampli rang d'AHLS i tenen major sensibilitat per a aquests compostos que les anteriorment esmentades (Cha, *et al.*, 1998, Farrand, *et al.*, 2002, Zhu, *et al.*, 2003).

El sistema de QS regulat per AHLs TraI/R en *A. tumefaciens* està involucrat en la regulació de la transferència de plasmidis per conjugació. Aquests dos gens estan localitzats en el plasmidi Ti, el qual està molt ben estudiat i produeix i respon a la molècula senyal C8oxo-HSL (Farrand, *et al.*, 2002, Von Bodman, *et al.*, 2003). Diferents autors han dissenyat diferents soques biosenores d'*A. tumefaciens* basant-se en el sistema de QS TraI/R com es pot veure a la Taula 1.5. Per exemple, la soca biosensora *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) té curat el plasmidi Ti, per tant, no produeix AHLs. El plasmidi pZLR4 conté el gen *traR* i la fusió del promotor *traG* amb el gen indicador *lacZ* que codifica per a la  $\beta$ -galactosidasa (*PtraG-lacZ*). El promotor *traG* està regulat pel sistema de QS TraR/I per tant en presència d'AHLS exògenes el complex TraR-AHL s'unirà al promotor *traG* i permetrà la transcripció del gen indicador *lacZ*. De totes les soques biosenores d'AHLS, *A. tumefaciens* és la que presenta major sensibilitat per les AHLs a baixes concentracions. El sistema indicador basat en la  $\beta$ -galactosidasa s'utilitza sobretot per l'anàlisi de les AHLs en les CCF. Però també s'usa en bioassaigs més simples com per exemple a partir d'inòculs de colònia, sobrenedants concentrats o altres mostres testades sobre una

## Introducció

placa d'agar que contingui el compost X-gal i la soca biosensora crescuda. La presència d'AHLs en cadascun dels bioassaigs esmentats es detectarà per l'aparició d'un halo blau fruit de la hidròlisi del compost X-gal realitzat per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa després d'un cultiu de nit. Aquesta soca detecta AHLs de fins a 12 carbonis amb o sense substitucions en el tercer carboni a excepció de la molècula C4-HSL (Farrand, *et al.*, 2002).

Una soca similar és l'*A. tumefaciens* WCF47 (PCF218)(pCF372) dissenyada per Zhu, *et al.*, (1998). Aquesta soca es diferencia de l'anterior perquè enlloc de tenir curat el plasmidi Ti, tan sols conté una mutació pel gen que codifica la sintasa TraI, per tant, no produeix AHLs. Aquesta soca a més a més conté els plasmidis pCF218 i pCF372, els quals contenen respectivament el gen *traR* sota el promotor *tetR* (*PterR-TraR*) i la fusió del promotor de *tral* amb el gen *lacZ* (*Ptral-lacZ*). Es pot usar com l'anterior soca esmentada (vegeu les especificacions a la Taula 1.5).

La soca biosensora que presenta major sensibilitat a baixes concentracions i variabilitat davant un rang més ampli d'AHLs exògenes és la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 (Steindler & Venturi, 2007). Aquesta soca té curat el plasmidi Ti i conté 3 plasmidis (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372). Va ésser dissenyada per Zhu, *et al.*, (2003) amb la intencionalitat de disposar d'una soca ultrasensible la qual es diferencia de les anteriors bàsicament perquè conté sobreexpressat el regulador TraR, que permet a la soca una millor detecció de les AHLs exògenes gràcies a l'alta concentració d'aquest regulador dins la cèl·lula. El plasmidi pJZ384 conté el regulador TraR sota el promotor del sistema d'expressió del fag T7 (*PT7-TraR*), el plasmidi pJZ410 conté el gen que codifica per la T7 RNA polimerasa i el plasmidi pJZ372 conté la fusió entre el promotor del gen *tral* i el gen *lacZ* (*Ptral-lacZ*). Es pot utilitzar en bioassaigs com les altres soques biosensores d'*A. tumefaciens* anteriorment esmentades (vegeu Taula 1.5).

### 1.10.2.4. Soques biosensores d'AHLs utilitzades *in vivo*.

Els plasmidis pJBA132 i pJBA89 s'han dissenyat per tal de comprendre els sistemes de QS-AHL no només en anàlisis *in vitro*, sinó també per poder realitzar un monitoratge *in vivo* en les soques problemes que es vol determinar la síntesi de les molècules d'AHLs. Andersen, *et al.*, (2001), van dissenyar els plasmidis pJBA132 i pJBA89 els quals contenen components del sistema de QS de *V. fischeri* i el gen indicador *gfp*. Aquests plasmidis contenen un ampli rang de replicons que els permeten ser estables en soques com *E. coli* i *P. aeruginosa* i permeten l'estudi d'expressió *in vivo* en cadascuna de les cèl·lules aïllades. Aquests plasmidis sensors



responen a la molècula C6oxo-HSL i en menor sensibilitat detecten les molècules C6-HSL, C8-HSL i C12oxo-HSL. Les soques d'*E. coli* portadores d'aquests plasmidis també es poden utilitzar com a soques biosensores fent una sembra en forma de "T" (Steindler & Venturi, 2007).

### **1.11. El quorum sensing en *Stenotrophomonas maltophilia*.**

En *S. maltophilia* s'ha descrit el sistema de QS mediat per la molècula DSF i presenta el cluster *rpfBFCG* genèticament molt relacionat al descrit a Xcc (Fouhy, *et al.*, 2007, Huang & Lee Wong, 2007).

El sistema *rpf*/DSF a Xcc està involucrat en la regulació de diverses funcions biològiques i processos com la producció d'enzims extracel·lulars o EPS, la formació de biofilms, síntesi de flagel, resistència a toxines i estrés oxidatiu, comunicació interregnes i virulència (Dow, *et al.*, 2003, Crossman & Dow, 2004, Wang, *et al.*, 2004, He, *et al.*, 2006).

Mitjançant l'estudi del mutant pel gen *rpfF* en la soca clínica de *S. maltophilia* K279a, Fouhy, *et al.*, (2007), han demostrat que el sistema DSF regula un gran ventall de funcions que contribueixen en a la resistència antibiòtica i virulència posant de manifest la importància d'aquest sistema de QS en la patogènia de *S. maltophilia*. El fenotip mutant  $\Delta rpfF$ , suposa la reducció en la motilitat del tipus *swimming*, una menor producció de proteases extracel·lulars, alteracions en el LPS i major sensibilitat a antibiòtics i metalls pesants. Els mateixos autors demostren la importància del DSF en la virulència de *S. maltophilia* K279a fent assaigs d'infecció sobre el model de nemàtode *Caenorhabditis elegans* N2.

Per contra, estudis realitzats per Huang i Wong (2007) indiquen que el sistema *rpf*/DSF en *S. maltophilia* no juga un paper clau en la formació de biofilms, síntesi de LPS i enzims extracel·lulars com ho fa a *Xanthomonas*. Atribueixen aquestes diferències a al fet que cada sistema *rpf*/DSF s'ha adaptat en funció del nínxol ecològic. Aquests mateixos autors han vist que el sistema *rpfF*/DSF juga un rol important en la virulència de *S. maltophilia* a nivell proteolític i hemolític.

El sistema DSF no està restringit al gènere de *Xanthomonas* o *Stenotrophomonas*. Boon, *et al.*, (2008) han demostrat que *B. cenocepacia*, important patogen oportunista, sintetitza una molècula del tipus DSF que han anomenat BDSF (cis-2-dodecenoic àcid), la qual és capaç de restaurar fenotips com el biofilm i el polisacàrid extracel·lular en el mutant *rpf*/DSF en Xcc.

## Introducció

Treballs realitzats han demostrat la implicació en la patogènia i virulència del sistema del tipus DSF en aquest grup (Deng, *et al.*, 2009, Ryan, *et al.*, 2009, McCarthy, *et al.*, 2010). Recentment, s'ha detectat que *P. aeruginosa* sintetitza un àcid gras anomenat 2-cis-decenoic, el qual està estructuralment relacionat amb el DSF però no és tan semblant a aquest com el BDSF produït per *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) (Davies & Marques, 2009).

Més enllà del sistema DSF, els autors McCarthy, Dow i Ryan (2011) han demostrat el paper potencial de la molècula peptídica AX21 per a la regulació de la motilitat, la formació de biofilms incloent la virulència en el model animal de larva *Galleria mellonella* com a molècula senyal en *S. maltophilia* K279a. Recentment el nostre laboratori ha detectat per proteòmica la presència de la molècula AI del tipus Ax21 en tres soques clíniques diferents de *S. maltophilia* i s'ha correlacionat la intensitat d'aquest senyal amb la ràtio de mortalitat obtinguda en els estudis d'infecció realitzats en un model animal de peix zebra *Danio rerio* (Ferrer-Navarro, *et al.*, 2013).

Dos estudis previs realitzats en *S. maltophilia* no han detectat que aquesta espècie sintetitzi AHLs. Aquests bioassaigs s'han realitzat a partir de sembra en forma de "T", emprant les soques biosensores *C. violaceum* CV026 i *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Zhu, *et al.*, 2001, Veselova, *et al.*, 2003).

Malgrat aquests pocs resultats, alguns autors sostenen que *Xanthomonas* sp i *S. maltophilia* només disposen del sistema de QS regulat per la molècula senyal DSF i que no produeixen AHLs ja que no s'ha anotat cap sintasa del tipus LuxI en els seus genomes (Ferluga, *et al.*, 2007, Crossman, *et al.*, 2008). Tot i així, diversos treballs han detectat que el gènere de *Xanthomonas* sp. (bacteri fitopatogen molt proper taxonòmicament a *S. maltophilia*) produeix AHLs a partir d'extractes de sobrenedants concentrats i sembra en forma de "T" (Cha, *et al.*, 1998, Veselova, *et al.*, 2003).

A més a més, els genomes de *Xanthomonas* spp i *S. maltophilia* codifiquen per un regulador del tipus LuxR amb domini d'unió a AHLs, malgrat que cap proteïna sintasa del tipus LuxI, Hdts o LuxM ha estat descrita (Crossman, *et al.*, 2008). Els treballs realitzats amb els reguladors OryR i XccR, reguladors homòlegs a LuxR a *Xanthomonas*, corresponents a les espècies de *X. oryzae* i *X. campestris* suggereixen que no s'uneixen a AHLs però que aquests interaccionen amb components alliberats per les plantes, tot i que mantenen conservat el domini d'unió a AHLs en l'extrem N-terminal (exceptuant 2 residus) (Ferluga, *et al.*, 2007, Zhang, *et al.*, 2007).

Recentment, estudis realitzats amb IQS per Ding, *et al.*, (2011) sobre les espècies *P. aeruginosa* i *S. maltophilia* demostren el blocatge ocasionat en el procés de formació de biofilms per 5 compostos diferents que actuen com a IQS, els quals són escollits mitjançant el programa de DOCK. Aquests IQS demostren unir-se al regulador TraR d'*A. tumefaciens* i inhibeixen la unió de les AHLs al regulador TraR. El compost corresponent a l'emodin, compost similar a les furanones, és el que major inhibeix l'adhesió i formació de biofilms en ambdues espècies, inclosa la *S. maltophilia*. Els autors suggereixen que aquest compost penetra dins del biofilm i interfereix en la comunicació cel·lular. Aquest compost provoca la proteòlisi del regulador TraR, quan aquest és sobreexpressat en *E. coli* tal i com ja s'havia mostrat en el treball de Zhu i Winans (2001), mentre que en presència d'AHLs no s'observa aquesta acció proteolítica de l'emodin en els estudis realitzats per Ding, *et al.*,(2011). Per tant, els autors Ding, *et al.*,(2011) suposen que l'acció del compost emodin provoca la proteòlisi sobre el regulador LasR i podria explicar l'efecte inhibitori del biofilm corroborant estudis previs realitzats amb furanones (Manefield, *et al.*, 2002).



*Objectius*

---



## 2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral ha estat:

**Determinar si existeix en *Stenotrophomonas maltophilia* el sistema de senyalització de *quorum sensing* basat en les N-acil-L-homoserina lactona i estudiar-ne la possible relació amb la virulència d'aquest microorganisme.**

Els objectius específics s'han basat en investigar:

1. Detectar la presència de molècules del tipus AHLs en el sobrenedant en diferents aïllats clínics de *S. maltophilia* emprant diferents bioassaigs.
2. Caracteritzar les AHLs presents en el sobrenedant de *S. maltophilia* mitjançant tècniques de cromatografia i espectrometria de masses.
3. Cercar la sintasa (*luxI*) i el regulador (*luxR*) implicats en el sistema de *quorum sensing* mediat per les AHLs.
4. Determinar si la proteïna reguladora anotada en el genoma de *S. maltophilia* com a proteïna del tipus LuxR amb domini d'unió a AHLs és capaç d'unir-se a aquestes molècules.
5. Localitzar el promotor del gen *luxR* i estudiar l'expressió d'aquest gen sota diferents condicions de creixement.
6. Analitzar la participació del sistema de *quorum sensing* regulat per AHLs a *S. maltophilia* en fenotips de virulència com la formació de biofilms i la motilitat i, posteriorment, valorar com afecten els inhibidors de *quorum sensing* (lactonases) a ambdós processos.
7. Estudiar la influència de les AHLs i dels boitensioactius produïts per altres microorganismes (*Pseudomonas aeruginosa*), en la motilitat de *S. maltophilia*.

Aquesta tesi doctoral s'ha emmarcat dins dels projectes:

- **AntiPathoGN: Identification and validation of novel drug targets in Gram-negative bacteria by global search: a trans-system approach.** Seventh Research Framework Programme of the European Union, 2010-2014 (Ref. HEALTH-F3-2009-223101).
- **Aproximación proteómica para la determinación y análisis de factores de virulencia en *Stenotrophomonas maltophilia* (STENOVIR).** Ministerio de Ciencia e Innovación, 2010-2014 (Ref. BFU2010-17199).





## *Materials i Mètodes*

---



### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. Soques bacterianes i plasmidis.

##### 3.1.1. Condicions de creixement de les soques bacterianes.

Els cultius de les diferents soques d'*E. coli*, *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* i s'han realitzat en medi líquid LB a 37 °C, mentre que els cultius de nit de les soques biosensores *C. violaceum* o *B. subtilis* A24 i *A. tumefaciens* s'han obtingut a 30 °C en els medis LB i medi AT respectivament. S'afegeix antibiòtic quan és necessari segons les concentracions descrites a la Taula 3.9.

Les soques bacterianes i plasmidis utilitzats en aquest treball s'enumeren i es detallen a la Taula 3.6 i la Taula 3.7 respectivament.

##### 3.1.2. Condicions de conservació i manteniment de les soques bacterianes.

Per a les soques d'*E. coli*, *S. maltophilia* i soques biosensores emprades en aquest treball, s'han realitzat glicerinars al 20 % de glicerol emmagatzemats de dues maneres diferents. Així, en un crio-vial es mesclen 500 µL de glicerol al 50% estèril i 750 µL de cultiu de nit saturat. Es barreja suament i es congelen ràpidament en neu carbònica els crio-vials que es guardaran a -20 °C, mentre que els crio-vials que es guardaran a -80 °C, es congelen de forma esglaonada (primer 2 h a 4 °C i després 2 h a -20 °C). Per a les soques de *P. aeruginosa* els glicerinars es guarden a -80 °C i es preparen amb el 5 % DMSO en 1 mL de cultiu de nit saturat.

Taula 3.6. Soques bacterianes utilitzades en aquest treball.

Soques	Característiques/Genotip	Font o Referència
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 supE44 thi-1 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169 deoR \Phi 80\Delta lacZ\Delta M15$	Clontech
DH5 $\alpha$ (pBBR1MCS-5 Amplicó E77)	Per a la seqüenciació amplicó E77	Aquest treball
BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal [dmc] [lon] hsdSB (rB-mB-)</i> amb el $\lambda$ DE3	Novagen
BL21 (DE3) (pET22b-LuxR)	Sobreproducció LuxR	Aquest treball
MT102 (pJBA132)	Mutant restricció-negativa derivat de MC1000 ( <i>araD139 (ara-leu)7697</i> $\Delta lac$ <i>thi hsdR</i> ) Soca biosensora d' AHL; conté plasmidi pJBA132 (Tc <sup>R</sup> ; pME6031- <i>luxR-P<sub>luxR</sub></i> -RBSII- <i>gfp</i> (ASV)-T0-T1); AHL <sup>-</sup>	(Andersen, <i>et al.</i> , 2001)
JM105 (pJBA89)	F' <i>traD36 lacI<sup>q</sup> \Delta(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/thi rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA sbcB15 sbcC hsdR4 (r<sub>K</sub>m<sub>K</sub>)</i> $\Delta(lac-proAB)$ Soca biosensora d' AHL; conté plasmidi pJBA89 (Ap <sup>R</sup> ; pUC18Not- <i>luxR-P<sub>luxR</sub></i> -RBSII- <i>gfp</i> (ASV)-T0-T1); AHL <sup>-</sup>	(Andersen, <i>et al.</i> , 2001)
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>		
KYC55 (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372)	Soca biosensora d' AHL; derivada de R10, (sense Ti plasmidi); AHL <sup>-</sup> Conté pJZ384 (Sp <sup>R</sup> ; PT7- <i>TraR</i> ), pJZ410 (Gm <sup>R</sup> ; <i>RNApol T7</i> ) i pJZ372 (Tc <sup>R</sup> ; <i>P<sub>tral</sub>-lacZ</i> );	(Zhu, <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>Chromobacterium violaceum</i></b>		
CV026	Soca biosensora d' AHL; derivada de la soca ATCC 31532 amb mutació al gen <i>cvil</i> per inserció del transposó Tn5 ( <i>cvil::Tn5</i> ); AHL <sup>-</sup>	(McClellan, <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
MPAO1	Wt, AHL <sup>+</sup>	(Jacobs, <i>et al.</i> , 2003)
MPAO1pME600	Soca Wt que conté plasmidi de clonació; Tc <sup>R</sup>	Aquest estudi
MPAO1pME- <i>Plac::aiiA</i>	Soca Wt que conté plasmidi pME6863 amb la fusió <i>Plac::aiiA</i> (A24); Tc <sup>R</sup>	Aquest estudi
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>		
M30	Soca clínica origen úlcera de decúbit	A. Calderon- l'Hospital Municipal de Badalona
K279a	<i>S. maltophilia</i> MDR, soca clínica del Regne Unit de referència. Genoma seqüenciat.	(Crossman, <i>et al.</i> , 2008)
E77	Soca clínica origen esput	A. Calderon- l'Hospital Municipal de Badalona
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i>	E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> Qerm	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt4572</i>	E77 $\Delta$ <i>smlt4572</i> Qerm	Aquest treball
E77pBBR1MCS-5- <i>lacZ</i>	Control expressió <i>PluxR</i>	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> pBBR1MCS-5- <i>lacZ</i>	Control expressió <i>PluxR</i>	Aquest treball
E77pBBR1MCS-5- <i>PluxR::lacZ</i>	Expressió <i>PluxR::lacZ</i>	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> pBBR1MCS-5- <i>PluxR::lacZ</i>	Expressió <i>PluxR::lacZ</i>	Aquest treball
E77pMP7605	Expressió proteïna mCherry	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> pMP7605	Expressió proteïna mCherry	Aquest treball
E77pBBR1MCS-5	Control de complementació	Aquest treball
E77pBBR1MCS-5 Amplicó E77	Control de complementació	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> pBBR1MCS-5	Control de complementació	Aquest treball
E77 $\Delta$ <i>smlt1839</i> pBBR1MCS-5 Amplicó E77	Complementació en trans soca mutant	Aquest treball
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>		
A24	Aïllat que degrada AHLs	(Reimann, <i>et al.</i> , 2002)

Taula 3.7. Plasmidis utilitzats en aquest treball.

Plasmidis	Característiques/Genotip	Font o Referència
pGEMT <sup>®</sup> -T easy	Plasmidi de clonació A/T, 3 kb; Amp <sup>R</sup>	Promega
pET22b(+)	Plasmidi d'expressió de proteïnes induïble per IPTG, 5,5 kb; Amp <sup>R</sup>	Novagen
pEX18Tc	Plasmidi per a la generació de mutants; <i>oriT</i> + <i>sacB</i> +,MCS del pUC18, 6,3 kb; Tc <sup>R</sup>	(Hoang, <i>et al.</i> , 1998)
pNZerm	Plasmidi llançadora que conté el gen <i>erm</i> que codifica per la resistència a la Erm,	(Podbielski, <i>et al.</i> , 1992)
pBBR1MCS-5	Plasmidi de clonació d'àmplia gamma d'hostes d'acollida, 4.9 kb; Gm <sup>R</sup>	(Kovach, <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-5- <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> clonat en el plasmidi pBBR1MCS-5, 7.9 kb; Gm <sup>R</sup>	(Fried, <i>et al.</i> , 2012)
pEX18Tc-Mut_ <i>smlt1839</i>	Plasmidi per a generar mutant; Tc <sup>R</sup> i Erm <sup>R</sup>	Aquest treball
pEX18Tc-Mut_ <i>smlt4572</i>	Plasmidi per a generar mutant; Tc <sup>R</sup> i Erm <sup>R</sup>	Aquest treball
pET22b-LuxR	Plasmidi de sobreproducció del regulador LuxR; Amp <sup>R</sup>	Aquest treball
pBBR1MCS-5 Amplicó E77	Plasmidi de complementació; Gm <sup>R</sup>	Aquest treball
pBBR1MCS-5- <i>PluxR::lacZ</i>	Plasmidi d'expressió <i>PluxR::lacZ</i> ; Gm <sup>R</sup>	Aquest treball
pME6000	Plasmidi de clonació; 7,2 kb; Tc <sup>R</sup>	(Maurhofer, <i>et al.</i> , 1998)
pME6863	<i>aiaA</i> ( <i>Bacillus subtilis</i> A24) sota el control del promotor constitutiu <i>lac</i> ( <i>Plac::aiaA</i> ) clonat en el plasmidi pME6000; Tc <sup>R</sup>	(Reimann, <i>et al.</i> , 2002)
pMP7605	<i>ptac::mCherry</i> clonat en ek plasmidi pBBR1MCS-5, 5,5kb; Gm <sup>R</sup>	(Lagendijk, <i>et al.</i> , 2010)

## 3.2. Medis de cultiu, antibiòtics, AHLs i altres solucions.

### 3.2.1. Medis de cultiu.

#### 3.2.1.1. Medi LB (Luria Bertani).

Per a preparar medi LB sòlid, dissoldre en 1 L d'aigua destil·lada 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl i 17 g d'agar i esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121 °C. Dispensar en plaques de petri, esperar a que s'hagin solidificat i emmagatzemar-les a 4 °C. En el cas de preparar medi líquid (sense agar), dispensar en ampolles abans d'autoclavar. Afegir els antibiòtics corresponents en funció de cada soca bacteriana.

Per a preparar medi LB-tou, pesar 0,8 g d'agar per 100 mL LB en comptes de 1,7 g d'agar en 100 mL LB. Dispensar aquesta solució abans que es refredi en tubs de 5 mL, esperar a que s'hagin solidificat i emmagatzemar-los a 4 °C. Cada tub es fondrà, quan es requereixi, al bany tèrmic abans de dipositar la doble capa d'agar en la placa de petri.

#### 3.2.1.1. Medi AT.

Per a preparar 100 mL de medi AT líquid, afegir a 88 mL d'aigua destil·lada estèril, 5 mL de la Solució de Sals 20X, 5 mL Tampó AT 20X i 2 mL glucosa al 25 % [wt/vol] preparats tal i com es mostra a la Taula 3.8. Per a preparar plaques de medi AT, autoclavar 1,7 g d'agar en 88 mL d'aigua destil·lada. Afegir els antibiòtics corresponents per a la soca *A. tumefaciens* KYC55 (vegeu Taula 3.9).

**Taula 3.8.** Solucions *stock* medi AT.

<b>Tampó AT 20X</b>	214 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> S'enrasa a volum final de 200 mL de H <sub>2</sub> O destil·lada. Ajustar el pH a 7,3 amb lleties de KOH. Esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121 °C.
<b>Solució de Sals 20X</b>	1,56 g de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,152 g CaCl <sub>2</sub> 0,100 g FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,044 g MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 40 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> S'enrasa a volum final de 200 mL amb H <sub>2</sub> O destil·lada. S'esterilitza a l'autoclau durant 15 min a 121 °C.
<b>Solució de Glucosa (25 %)</b>	12,5 g D-glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) S'enrasa a volum final de 50 mL de H <sub>2</sub> O destil·lada. Esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121 °C.

**3.2.1.2. Medi BM2.**

El medi BM2 conté dissolts en aigua destil·lada una concentració de 62 mM del tampó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ajustat a pH 7, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 µM de FeSO<sub>4</sub>, 0,4 % D-Glucosa [wt/vol] i 0,5 % de Casaminoàcids [wt/vol] (Difco™). Es preparen al laboratori diferents concentracions *stock* una per a cada component i s'autoclaven per separat a 121 °C durant 15 min. Per a preparar BM2-agar s'autoclava l'agar Noble al 0,5 % [wt/vol] (Difco™) conjuntament amb l'aigua destil·lada.

**3.2.1.3. Medi FABL.**

El medi FABL està format per un 97 % de medi FAB i un 3 % de medi L. Un litre de medi FAB conté dissolts en aigua destil·lada 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g de NaCl, 93 mg de MgCl<sub>2</sub> i 11 mg de CaCl<sub>2</sub>. Un litre de medi L conté dissolts en aigua destil·lada 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 5 g de NaCl i 1 g de D-glucosa.

**3.2.2. Antibiòtics.**

La majoria d'antibiòtics es preparen dissolent-los en aigua destil·lada, excepte la tetraciclina i eritromicina que s'ha de dissoldre en etanol al 70 %. Posteriorment s'esterilitzen per filtració mitjançant filtres de 0,22 µm. És aconsellable preparar solucions *stock* dels antibiòtics 1000X (1000 vegades concentrades) que s'emmagatzemen a -20 °C les quals s'afegeixen directament als medis sòlids per a preparar plaques amb antibiòtic just abans de plaquejar i un cop s'hagin refredat fins a 50-60 °C. Les solucions *stock* es dilueixen 10 vegades per obtenir una solució *stock* de treball 100X (100 vegades concentrada) que es conservava a 4 °C i que s'afegeix directament als medis líquids. Un resum dels antibiòtics i concentracions usats en aquest treball es mostren a la següent Taula 3.9.

**Taula 3.9.** Concentracions d'antibiòtics utilitzats en aquest treball.

Antibiòtic	Abreviatura	Solvent	Concentració stock 1000X (mg/mL)	Concentració final (µg/mL)		
				<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i> KYC55	<i>S. maltophilia</i>
Espectinomicina	Spc	Aigua	10	100	100	-----
Gentamicina	Gm	Aigua	10	10	100	40
Tetraciclina	Tc	Etanol 70 %	17	*17	2	-----
Ampicilina	Amp	Aigua	10	50-100	-----	-----
Eritromicina	Erm	Etanol 70 %	50/500	50	-----	500

\*Concentració utilitzada per *P. aeruginosa* MPAO1.

### 3.2.3. Molècules N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) sintètiques.

Les AHLs sintètiques d'ús en el laboratori han estat les AHLs sintètiques C4-HSL, C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL del proveïdor Cayman®.

Els stocks d'AHLs en el laboratori els emmagatzemem a concentració final de 10 mM en acetat d'etil i els conservem al congelador de -20 °C. Per a treballar amb les AHLs en els diferents assaigs eliminem per evaporació al buit l'acetat d'etil en el SpeedVac i resuspenem la mostra amb Acetonitril (ACN) o bé amb etanol absolut (segons experiment), basant-nos en els procediments de AL-Ghoniaiem *et al.*, (2009).

Quan ens referim directament a una molècula específica d'AHL les anomenarem de la següent forma. Primer, farem referència a la llargada de la cadena acil. En segon lloc, especificarem si hi ha una substitució en el tercer carboni de la cadena per un grup carbonil (oxo) o hidroxil (OH). En tercer terme afegirem l'acrònim HSL (es refereix a l'anell homoserina lactona) el qual és constant en totes les molècules AHLs.

### 3.2.4. Altres solucions.

#### 3.2.4.1. Solució salina de NaCl 0,9 % [wt/vol]-(Ringer).

Dissoldre en 1 L d'aigua destil·lada 9 g de NaCl, dispensar en ampolles i esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121 °C

#### 3.2.4.2. 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid (X-gal).

El compost X-gal usat en aquest treball ha estat de la casa Roche®.

Aquest producte s'ha utilitzat dissolt en N,N dimetil formamida (DMF) per suplementar plaques de medi AT o LB a una concentració final de 40 µg/mL o 60 µg/mL pels bioassaigs realitzats en placa o CCF. Per a dissoldre 1 mg de X-gal són necessaris 20 µl DMF al 100 %.

### **3.3. Bioassaig per a detectar AHLs mitjançant soques biosensores.**

#### **3.3.1. Soques biosensores seleccionades.**

##### **3.3.1.1. *C. violaceum* CV026.**

La soca *C. violaceum* CV026 ha estat cedida per la Dra. Reimann de la Universitat de Lausanne (Suïssa), la qual és adient per a la detecció de molècules d'AHLs de cadena curta (McClellan, *et al.*, 1997, Steindler & Venturi, 2007). S'ha escollit com a soca biosensora d'aquest treball degut a la facilitat de treball que comporten els seus bioassaigs. La detecció d'AHLs exògenes després d'un cultiu de nit és molt senzilla gràcies a l'aparició d'un halo violeta. Aquesta soca biosensora és molt usada per a detectar molècules d'AHLs fent una sembra en forma de "T" (vegeu esquema Figura 3.9-A) i en bioassaigs en doble capa de LB-agar tou (vegeu exemple a la Figura 3.10-A).

##### **3.3.1.2. *E. coli* MT102 pJBA132 i *E. coli* JM105 pJBA89.**

Les soques d'*E. coli* portadores del plasmidi pJBA132 o bé pJBA89 han estat cedides pel Dr. Jens Bo Andersen de la Universitat de Copenhaguen (Dinamarca). S'han utilitzat en aquest treball per a la detecció d'AHLs de cadena llarga fent una sembra en forma de "T" Aquests plasmidis sensors responen a la molècula C6oxo-HSL i en menor sensibilitat detecten les molècules C6-HSL, C8-HSL i C12oxo-HSL (Andersen, *et al.*, 2001, Steindler & Venturi, 2007). La presència d'AHLs exògenes es visualitza amb el gen indicador *gfp*. Per a la visualització és necessari l'ús del microscopi de fluorescència. Vegeu esquema Figura 3.9-B.

##### **3.3.1.3. *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372).**

La soca d'*A. tumefaciens* KYC55 (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372) ha estat cedida pel Dr. Winans de la Universitat de Ithaca (USA). S'ha escollit per un ampli rang de bioassaigs realitzats en aquest treball, ja que presenta major sensibilitat a baixes concentracions d'AHLs i variabilitat davant un rang més ampli d'AHLs exògenes (Zhu, *et al.*, 2003, Steindler & Venturi, 2007). El gen indicador *lacZ* ens permetrà detectar la presència d'AHLs exògenes a partir de l'aparició d'un halo blau, gràcies a la hidròlisi produïda per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa del compost X-gal present en el medi on es realitza el bioassaig. Aquesta soca biosensora és molt usada per a testar la presència d'AHLs en les soques problema a partir de tips de colònia o dipositant sobrenedants concentrats en una placa de medi AT-agar tou on hi ha una suspensió de la soca biosensora i el compost X-gal (vegeu Figura 3.10-B). També s'usa per a l'anàlisi de la CCF (vegeu esquema Figura 3.12).



### 3.3.2. Bioassaigs per a detectar AHLs en placa de Petri.

#### 3.3.2.1. *C. violaceum* CV026.

##### Sembra en forma de "T":

Sembra en placa LB en forma de "T" enfrontant l'estria de la soca problema contra la soca biosensora *C. violaceum* CV026. Incubació d'un cultiu de nit de la placa a 30 °C. La presència de molècules exògenes en el bioassaig en forma de "T" es detecta amb el canvi de coloració de l'estria de *C. violaceum* CV026 en la zona més propera a la soca problema, perquè les AHLs exògenes difonen pel medi (McClellan, *et al.*, 1997). Vegeu Figura 3.9-A.

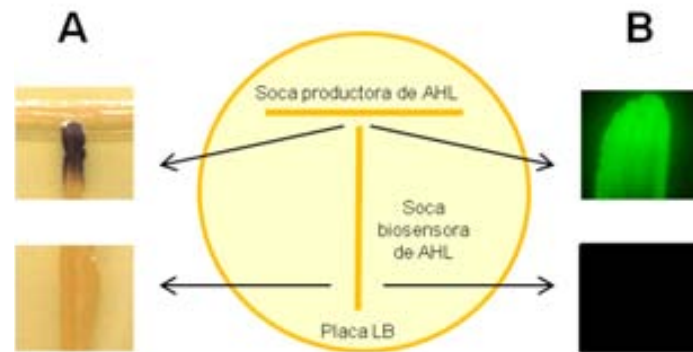
##### Doble capa de LB-agar tou:

Per a realitzar el bioassaig en doble capa es necessita fondre un tub estèril amb 5 mL de LB-agar tou i esperar a que la temperatura del medi no sigui superior a 40 °C per afegir 50 µL de cultiu de nit saturat de la soca *C. violaceum* CV026 crescuda en LB a 30 °C i agitació. Abocar aquesta suspensió sobre una placa de LB i deixar solidificar. Un cop la doble capa està sòlida podem disposar-hi a sobre diferents mostres problema (com ara sobrenedants concentrats o fraccions de HPLC que es desitgin estudiar). Després del cultiu de nit, la soca biosensora creixerà de forma confluent en tota la placa i la presència de molècules exògenes en les mostres problema es detectaran amb un halo violeta al voltant del lloc on s'hagin dipositat (McClellan, *et al.*, 1997). Vegeu Figura 3.10-A.

#### 3.3.2.2. *E. coli* MT102 pJBA132 i *E. coli* JM105 pJBA89.

##### Sembra en forma de "T":

Sembra en placa LB en forma de "T" enfrontant l'estria de la soca problema contra les soques d'*E. coli* biosensores. Cultiu de nit de la placa a 37 °C. La presència de molècules exògenes en el bioassaig en forma de "T" es detecta observant en el microscopi de fluorescència la zona de contacte entre les estries en forma "T" gràcies a la fluorescència emesa pel gen indicador *gfp* degut a la difusió pel medi de les AHLs exògenes (McClellan, *et al.*, 1997, Andersen, *et al.*, 2001). Vegeu Figura 3.9-B.



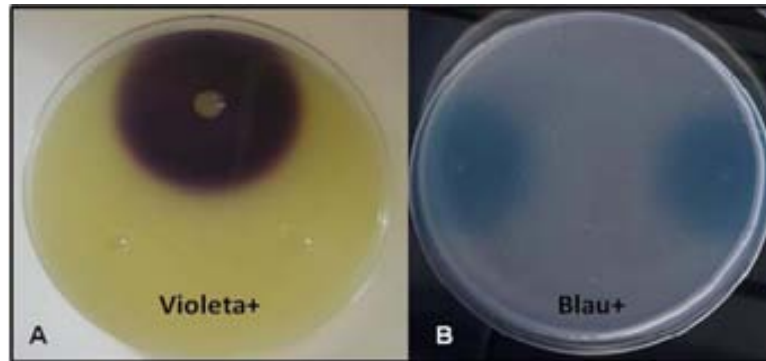
**Figura 3.9.** Esquema de la sembra en forma de "T" en placa de LB de la soca productora d'AHLs davant la soca biosensora. **A**, Violaceïna produïda per la soca biosensora *C. violaceum* CV026. **B**, Activitat *gfp*<sup>+</sup> detectada amb microscopi de fluorescència produïda per la soca biosensora *E. coli* MT102 (pJBA132) o *E. coli* JM105 (pJBA89). La sembra més allunyada a la zona de contacte "T" no detecta activitat AHL.

### 3.3.2.3. *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ384) (pJZ410) (pJZ372).

#### En placa de AT-agar tou i X-gal:

Preparar un cultiu de nit de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 en 20 mL de medi AT a 30 °C i agitació. Afegir els antibiòtics, Spc (100 µg/mL), Tc (2 µg/mL), Gm (100 µg/mL) pel manteniment dels tres plasmidis que ens permetran la detecció de les AHLs exògenes. L'endemà centrifugar els 20 mL a 3500 rpm durant 15 min a 4 °C per tal d'eliminar els antibiòtics del medi i resuspendre el *pellet* en 10mL de medi AT. Per a preparar 2 plaques per fer el bioassaig, barrejar els 10 mL de cultiu de nit resuspès en medi nou, amb 20 mL de medi AT estèril, 20 mL d'agar al (2 %) i solució de X-gal a concentració final en placa de 40 µg/mL. És molt important que l'agar no estigui molt calent per tal de no degradar el compost de X-gal i tenir cura amb la viabilitat de la soca biosensora. Deixar solidificar la placa i després fer l'assaig corresponent tenint en comte que la soca biosensora creixerà confluent en tota la placa. En aquest treball s'han analitzat una gran varietat de mostres en aquestes plaques. Es pot fer detecció d'AHLs exògenes a partir de tips de colònia i dipositant sobrenedants concentrats o fraccions provinents de HPLC. La detecció d'AHLs exògenes en les mostres problema dipositades sobre la placa després del cultiu de nit a 30 °C l'identificarem amb un halo blau. (Figura 3.10-B). Aquest canvi de coloració es deu a la hidròlisi del compost X-gal generada per l'enzim β-galactosidasa. Aquest enzim és el gen indicador regulat pel complex TraR-AHL gràcies a les molècules AHLs exògenes que difonen en el medi (Farrand, *et al.*, 2002, Zhu, *et al.*, 2003).

Les plaques de bioassaig s'han escanejat utilitzant l'escàner Epson perfection V5000 photo amb programari Epson Scan v.3.74ES.



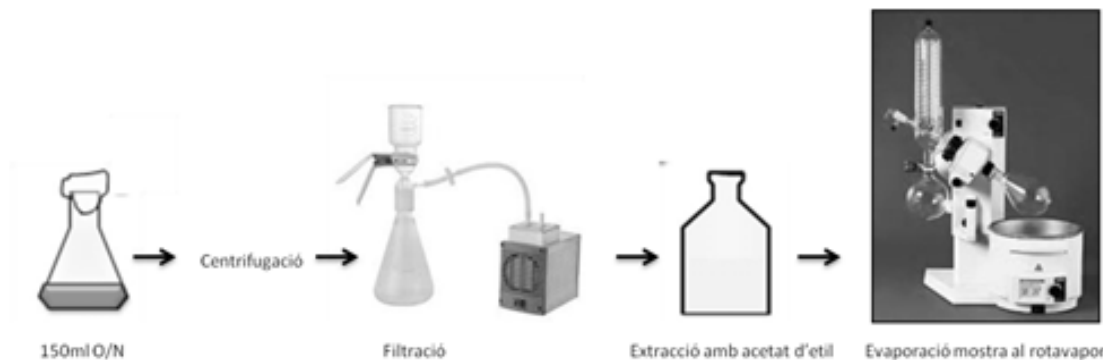
**Figura 3.10.** Bioassaig en placa per a la detecció d’AHLs exògenes en les mostres problema dipositades dins d’un pouet fet a la placa de medi-agar o directament a la superfície de la placa. Exemple de detecció d’AHLs positiva emprant les soques biosensores *C. violaceum* CV026 amb halo violeta (A) i *A. tumefaciens* KYC55 amb halo blau (B).

### 3.4. Tractament i extracció de sobrenedant.

L’extracció de sobrenedants concentrats de les soques de les quals es vol estudiar la producció d’AHLs s’ha realitzat fent un cultiu de nit saturat a densitat òptica (OD) de 2 en 150 mL de LB a 37 °C o 30 °C i agitació en matràs Erlenmeyer de 500 mL. Centrifugar 150mL del cultiu a 9000 *g* durant 15 min a 4 °C per tal de separar les cèl·lules del sobrenedant. Filtrar els 150 mL de sobrenedant amb la finalitat d’eliminar les cèl·lules romanents mitjançant l’ajuda d’un matràs Kitasatos i bomba de buit usant primer un filtre de 0,80 µm i posteriorment un de 0,22 µm. Durant el cultiu en medi líquid s’ha produït un augment de pH que produeix la ruptura de l’anell lactona d’AHLs presents en els cultius bacterians. Per revertir la hidròlisis acidificar el sobrenedant a pH 6 amb gotes de HCl al 32 %. Extreure les molècules d’AHLs presents en el sobrenedant filtrat i acidificat barrejant vigorosament 150 mL amb 150 mL d’acetat d’etil (afegir 12,5 µl d’àcid glacial acètic per cada 150 mL d’acetat d’etil). Esperar que es separi el solvent de la fase líquida i retirar la fase menys densa (acetat d’etil amb molècules AHLs extretes). Repetir aquest pas un altre cop. Ajuntar els 2 volums de 150 mL extrets en els passos anteriors i deshidratar amb anhidre sulfat magnesi (afegir fins que el solut no s’expandeixi més, aproximadament 4 cullerades). Filtrar els 300 mL utilitzant filtres de 0,22 µm resistents a l’acetat d’etil (Pall GH Polipro (GHP), Pall Corporation) amb l’ajuda d’una bomba de buit i del matràs Kitasatos. Els filtres GHP són de membrana de polipropilè hidròfila amb màxima compatibilitat química per a la filtració de solucions aquoses i dissolvents agressius. Assecar a 40 °C, l’extracte orgànic d’acetat d’etil en un rotavapor fins a obtenir un volum de 5 mL aproximadament (netejar prèviament el matràs de baló amb acetat d’etil). Recuperar els 5 mL del baló i liofilitzar l’extracte al complet en el SpeedVac. Resuspensar l’extracte amb un petit volum de 1 mL d’aigua Chromasolv® grau HPLC al 10 % ACN [wt/vol] i al 0,1 % de

trifloroacètic (TFA) [wt/vol] (Sigma). La mostra 150 vegades concentrada està llesta per a la detecció de molècules d'AHLS ja sigui en bioassaig en placa, separació i caracterització en CCF o HPLC (per aquesta cromatografia cal filtrar la mostra en filtres de 0,22 µm per tal d'evitar introduir impureses de l'extracció dins la columna de HPLC) (Shaw, *et al.*, 1997, Schaefer, *et al.*, 2000). Vegeu un breu esquema d'aquest mètode a la Figura 3.11.

Aquesta metodologia s'ha usat tant per les soques de *S. maltophilia* com per les soques de *P. aeruginosa* utilitzades en aquest treball. Els sobrenedants obtinguts s'han usat per a la detecció d'AHLS com per a l'estudi de biotensioactius presents en aquests.



**Figura 3.11.**Breu esquema de l'extracció de sobrenedant de 150ml d'un cultiu de nit saturat de la soca a testar.

### 3.5. Cromatografia líquida d'alta resolució o de fase reversa (RP-HPLC).

El procés de cromatografia es considera un conjunt de forces que competeixen de forma selectiva per un compost. Aquests forces són entre la columna o fase estacionària que retindrà aquets compost i els solvents líquids que passen a través de la columna o fase mòbil.

La cromatografia de fase reversa consisteix en una fase estacionària apolar i una fase mòbil polar que permet cromatografiar una ampla varietat de compostos. El temps de retenció és major per a les molècules de naturalesa apolar, mentre que les molècules de caràcter polar elueixen més ràpidament, per tant l'ordre d'elució anirà de compostos més hidrofílics a més hidrofòbics (de polar a no polar). La cromatografia de fase reversa és tant utilitzada que sovint se l'anomena HPLC sense cap més especificació. Les característiques del compost juguen un paper molt important en la retenció. En general, un compost amb una cadena alquil llarga s'associa amb un temps de retenció major perquè augmenta la hidrofobicitat de la molècula. Cada pic es correspon amb els temps de retenció on s'han alliberat cadascuna de les molècules segons l'afinitat amb la fase mòbil de la cromatografia.

### 3.5.1. Separació de sobrenedants i AHLs sintètiques mitjançant HPLC.

AHLs sintètiques i sobrenedants concentrats extrets de cultius de nit saturats s'han separat per HPLC (Waters Alliance HPLC) utilitzant una columna C<sub>8</sub> fase reversa (Waters Nova-Pak®; 3.9x150 mm) amb un gradient de 10-70 % v/v de ACN en aigua Chromasolv® grau HPLC (Sigma), a una velocitat de flux de 1 mL/min i monitoritzat a 210 nm durant 50 min. Abans de passar les mostres d'AHLs sintètiques o sobrenedants es fa un blanc del mètode explicat mitjançant la injecció manual de 1 mL d'aigua Chromasolv® grau HPLC i es recullen totes les fraccions per ésser estudiades com a control negatiu en posteriors bioassaigs (McClean, *et al.*, 1997, Càmara, *et al.*, 1998, Laue, *et al.*, 2000)

Per a l'estudi d'AHLs sintètiques es prepara la mostra de la següent manera: 20µl de la concentració *stock* 10 mM de l'AHL sintètica s'assequen al SpeedVac i es resuspenen amb 1 mL d'aigua Chromasolv® grau HPLC al 10% ACN [wt/vol] i TFA al 0,1% [wt/vol] (Sigma).

Per a l'estudi dels sobrenedants concentrats es prepara la mostra de la següent manera: es filtren 200 µl de sobrenedant en filtres de 0,22 µm i es resuspenen en 800 µl d'aigua Chromasolv® grau HPLC al 10 % ACN [wt/vol] i TFA al 0,1 % [wt/vol] (Sigma).

### 3.5.2. Bioassaig de les fraccions provinents de HPLC.

Cadascuna de les fraccions obtingudes del HPLC de 1mL de volum, recollides entre els temps 1-50 min, s'assequen per evaporació al buit al SpeedVac i són resuspeses amb 100 µl de ACN al 100 % (concentrant 10 cops la fracció) pel que fa a aquelles provinents de sobrenedants i controls negatius.

Posteriorment s'assajen 10 µl de cada fracció en plaques de bioassaig on creixen confluentment les soques biosensores escollides per l'assaig. Cadascuna de les plaques de Petri es divideixen en quadrants per a testar entre 1-20 fraccions provinents del HPLC.

Aquesta metodologia s'ha usat tant per les soques de *S. maltophilia* com per les soques de *P. aeruginosa* utilitzades en aquest treball

## 3.6. Cromatografia en Capa Fina (CCF).

La Cromatografia en Capa Fina (CCF), en anglès anomenada *Thin Layer Chromatography* (TLC), és una tècnica cromatogràfica formada per una fase estacionària (capa fina adsorbent mantinguda sobre un suport inert com per exemple el vidre) i una fase mòbil o dissolvent que

es desplaça per capil·laritat per la làmina. La diferència d'adsorció (segons la polaritat de la mostra) es tradueix en un major o menor desplaçament de cada component per la capa fina, permetent la seva separació i identificació.

Durant la cromatografia, la capa fina queda verticalment recolzada dins d'una cambra de vidre que conté el solvent (vegeu Figura 3.12-A).

### **3.6.1. Separació dels sobrenedants i AHLs sintètiques mitjançant CCF.**

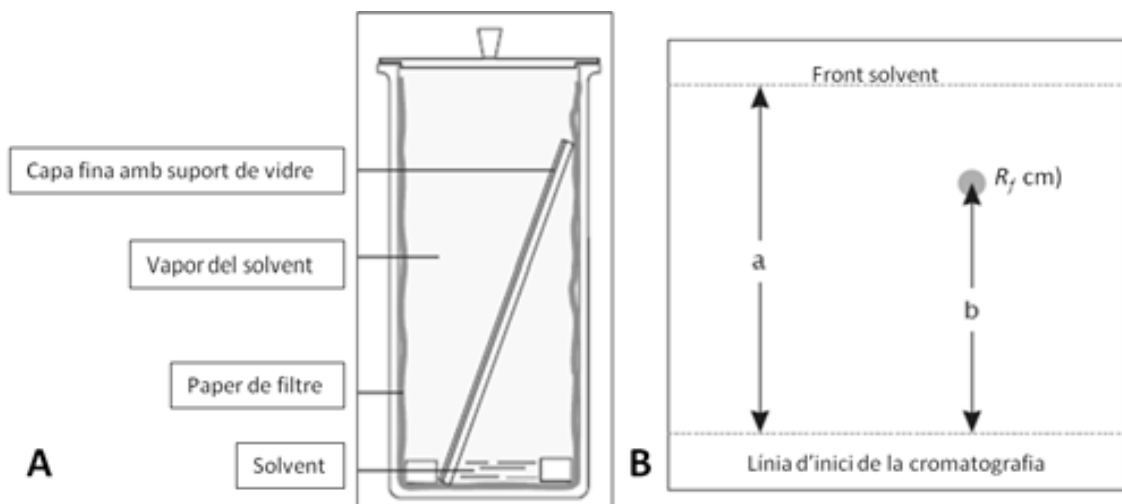
La separació i caracterització preliminar de molècules del tipus AHLs presents en els sobrenedants extrets amb acetat d'etil, AHLs sintètiques i fraccions positives de HPLC s'han realitzat en dos tipus de suports. Les cromatografies amb els suports del tipus de *Silica gel* 60 (Laue, *et al.*, 2000) i de C<sub>18</sub> de fase reversa (Merck) (Shaw, *et al.*, 1997) s'han desenvolupat dins d'una cambra de vidre (ben segellada amb parafina) amb els solvents d'acetona-hexà (55:45, v/v) i metanol-aigua (60:40, v/v) respectivament amb un volum final de 200 mL dins de la cambra (vegeu Figura 3.12-A). Amb l'ajuda d'un regle i un llapis es faran dues línies a la CCF, marcant la línia d'inici de la cromatografia a 2 cm del marge inferior i la línia de front de solvent a 1 cm del marge superior (Figura 3.12-B). La línia d'inici de la cromatografia es dividirà en funció del número de mostres a analitzar. En totes les cromatografies realitzades es recomana posar una AHL sintètica (com a patró de la cromatografia) per tal de poder comparar la seva migració amb els resultats obtinguts de les mostres problemes. Els volums dipositats sobre la CCF de les mostres problema varien en funció d'aquesta entre 2-100 µl. Es recomana dipositar sobre la CCF les següents concentracions d'AHLs sintètiques: 2 µl de la concentració *stock* 10 mM per la molècula C6-HSL, 2 µl de la concentració *stock* 10 µM per la molècula C8oxo-HSL, 2 µl de la concentració *stock* 1 mM per la molècula C8-HSL i 2 µl de la concentració *stock* 100 µM per la molècula C10-HSL.

Un cop finalitzada la cromatografia (quan el solvent arriba a la línia del front), s'extreu la CCF de la cambra i es deixa assecar durant 2 h a temperatura ambient. La mobilitat de les AHLs a través de la CCF depèn de la llargada de la molècula i la possible substitució en el tercer carboni de la cadena. La detecció de molècules senyal un cop finalitzada la cromatografia s'analitzarà mitjançant un capa de bioassaig amb la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 sobre el suport de CCF.

### 3.6.2. Detecció d'AHLS mitjançant bioassaig sobre les plaques de CCF.

Les AHLs separades mitjançant CCF són detectades mitjançant una capa de bioassaig que s'aboca sobre la CCF. Aquest bioassaig es prepara amb una suspensió de 100 mL de medi AT-agar tou (0,8 %) i X-gal (60 µg/mL), juntament amb el *pellet* resuspès d'un cultiu de nit de 100 mL en medi AT de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 (Shaw, *et al.*, 1997, Zhu, *et al.*, 1998, Zhu, *et al.*, 2003). Després del cultiu de nit a 30 °C, es mesuraran les taques blaves aparegudes en cadascun dels carrils en funció de la migració o valor  $R_f$  (Ràtio o front). Aquesta distància es defineix com la distància recorreguda per la mostra des de la línia d'inici de la cromatografia dividida per la distància recorreguda pel solvent (fins la línia de front). Els valors obtinguts es compararan sempre amb els valors dels patrons (AHLs sintètiques) que s'hagin utilitzat. Vegeu esquema del revelat a la Figura 3.12-B.

Les CCF s'han escanejat utilitzant l'escàner Epson perfection V5000 photo amb programari Epson Scan v.3.74ES.



**Figura 3.12.** A, Esquema de la cromatografia de capa fina dins la cambra on s'especifiquen els diferents components. B, Revelat de la CCF mitjançant la capa de bioassaig per a calcular el temps de retenció de les AHLs presents en cada carril (exemplificat amb una cercle gris en el carril b).

### 3.7. Identificació d'AHLS amb l'espectrometre de masses.

L'espectrometria de masses (MS) es basa en la separació en el buit d'ions en fase gasosa en funció de la seva massa/càrrega ( $m/z$ ). Aquest aparell permet analitzar i identificar amb gran precisió la composició de diferents elements químics que formen un compost. Els espectròmetres de masses inclouen els elements següents: un sistema d'introducció de la mostra, un sistema d'ionització, un accelerador d'ions mitjançant un camp elèctric, un

analitzador que dispersi els ions en funció de la seva massa/càrrega i un detector d'ions unit a un processador del senyal. En aquest treball s'ha usat l'espectròmetre de masses anomenat maXis high resolution Q-TOF (Bruker), acoplat a un sistema nano-HPLC (Proxeon, Denmark). S'ha utilitzat aquesta metodologia per a comparar els espectres obtinguts de les mostres positives en els bioassaig provinents del HPLC amb els espectres obtinguts dels patrons (AHLs sintètiques), per tal de corroborar la presència d'AHLs presents en cadascuna de les fraccions.

L'analitzador de masses del tipus Q-TOF (quadrupol-temps de vol), permet obtenir valors de massa molt exactes dels ions (MS) i seleccionar determinats ions que posteriorment es podran fragmentar i analitzar en espectroscòpia de masses en tàndem (MS/MS).

Les mostres provinents de la cromatografia HPLC, es tornen a cromatografiar un cop més. Primerament es dissolen en aigua (5 % ACN i 0,1 % d'àcid fòrmic) i es concentren dins d'una columna Proxeon nanotrapping (100  $\mu\text{m}$  x 2 cm). La mostra concentrada es carrega a una columna  $\text{C}_{18}$  fase reversa (Acclaim PepMap nanoseparation column- Dionex®; 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm). La cromatografia es realitza amb un gradient de 0-60 % v/v de ACN en aigua (0.1 % d'àcid fòrmic) a una velocitat de flux de 300 nL/min durant 10 min. La columna de HPLC s'acobla a l'espectròmetre de masses mitjançant una font d'ionització del tipus Captive Spray (Bruker).

L'adquisició dels espectres de masses es va fer alternant cicles de MS (1 Hz) amb cicles de MS/MS (0.5-2 Hz) per a unes determinades masses o ions precursors. Aquestes masses, presents en la llista d'inclusió, són les masses esperades per als ions de les AHLs. La intensitat mínima de fragmentació és de 1000 counts. S'ha seleccionat una energia de col·lisió de 7 eV. Tots els espectres s'han adquirit en el rang de masses de 50-700 Da.

L'anàlisi dels resultats obtinguts per LC-MS/MS s'ha fet amb el software Data Analysis 4.0 (Bruker). Els ions pare corresponents amb la mateixa massa/càrrega que les AHLs esperades a cada fracció, s'han fragmentat per tal d'observar i corroborar les relacions massa/càrrega corresponents a l'ió de l'anell homoserina lactona invariable (102.1  $m/z$ ) i a l'ió corresponent a la cadena acil variable (la seva  $m/z$  depèn de la llargada de la cadena). Aquest anàlisi també s'ha dut a terme amb els patrons (AHLs sintètiques) per a determinar els ions característics d'aquestes molècules. (Shaw, *et al.*, 1997, Laue, *et al.*, 2000, Gould, *et al.*, 2006, Niu, *et al.*, 2008, Chan, *et al.*, 2011).

Aquesta metodologia es va dur a terme en el laboratori de Proteòmica de l'Institut de Recerca Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (edifici Collserola) de Barcelona.



### 3.8. Mètodes de manipulació del DNA.

Molts d'aquests mètodes descrits en aquest apartat es basen en el manual de *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook, 1989), tot i que en alguns hi ha certes modificacions.

Les extraccions de DNA cromosòmic s'han dut a terme mitjançant el *Kit GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma). Per les extraccions de DNA plasmídic d'elevat número de còpies s'ha utilitzat el *Kit* de E.Z.N.A.<sup>®</sup> *Plasmid Miniprep* (Omega, bio-tek) com per exemple els plasmidis derivats de pGEM-Teasy<sup>®</sup>. Mentre que el *Kit* d'extracció de DNA plasmídic *GeneJet<sup>®</sup> Plasmid Miniprep* (Fermentas), s'ha usat pels plasmidis amb necessitat d'extreure DNA a major escala degut al baix número de còpies (com per exemple pBBR1MCS-5 o pEX18Tc) des de soques d'*E. coli* com per *S. maltophilia*. En tots dos casos, seguint les especificacions del fabricant. L'electroforesi de DNA en gels d'agarosa s'ha realitzat amb l'agarosa (LM-sieve, Pronadisa) al 0,8 % i tenyits amb Bromur d'etidi (BrEt). El marcador de pes molecular (MW) utilitzat ha estat el GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas) amb fragments entre 0,075 y 20 kb.

Per a la purificació de DNA, en solució o a partir de gels d'agarosa, s'ha utilitzat el *kit* comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> *Gel Extraction* (OMEGA, bio-tek) seguint les especificacions del fabricant. Els enzims de restricció utilitzats en aquest treball són de la casa comercial Roche i s'han usat els tampons específics per cada enzim seguint les especificacions del fabricant per a dur a terme les digestions enzimàtiques. La lligació de fragments de DNA productes d'una restricció en plasmidis linealitzats s'ha dut a terme mitjançant la T4 DNA lligasa (New England BioLabs) i la desfosforilació per tal d'evitar possibles recircularitzacions s'ha realitzat amb l'enzim fosfatasa alcalina (Roche) seguint les instruccions del fabricant. Els fragments de PCR purificats s'han lligat directament amb el plasmidi pGEM<sup>®</sup>-t easy (Promega) seguint les instruccions del fabricant.

L'amplificació de fragments de DNA mitjançant PCR (*Polymerase chain reaction*) s'ha realitzat amb el *Kit* de la polimersa Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche) que conté tampó adient per a l'amplificació de fragments de DNA amb alta concentració de GC com és el cas de *S. maltophilia*. Els dNTPs (Thermo Scientific) i els oligonucleòtids (Invitrogen) utilitzats en cada reacció de PCR (vegeu Taula 3.10) es van afegir a concentració final de 0,2 mM i 500 nM respectivament. Els oligonucleòtids s'han dissenyat amb el programa (<http://www.oligo.net>) i el termociclador usat el MJ Mini<sup>™</sup> Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD).

**Taula 3.10.** Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

Núm	Nom	Seqüència 5'→3'	Diana	Aplicació
<b>Per a la generació de mutants</b>				
p1	BEluxR_up	aagcttTGCCCGTTTCGGTATCGG	HindIII	Mutació LuxR-Braç esquerre
p2	BEluxR_dw	ggatccTCGCGGCGAGGCACTTCC	BamHI	Mutació LuxR-Braç esquerre
p3	BDluxR_up	ggatccCCGGTTCAGCGCCCGCC	BamHI	Mutació LuxR-Braç dret
p4	BDluxR_dw	gaattcCCCAGCCGCCAGCCAGC	EcoRI	Mutació LuxR-Braç dret
p13	BEluxI_up	ggatccGCACGAGATCAAGGAATTG	BamHI	Mutació LuxI-Braç esquerre
p14	BEluxI_dw	CATCACCATGTTGACCAGC	-----	Mutació LuxI-Braç esquerre
p15	BDluxI_up	aagcttGGAATGTGAAACCTGCACAC	HindIII	Mutació LuxI-Braç dret
p16	BDluxI_dw	ggatccGGCGGCCAGCGCCA	BamHI	Mutació LuxI-Braç dret
p9	Erm5'	ggatccGAAACGTAAAAGAAGTTATG	BamHI	Amplificació eritromicina pNZerm
p10	Erm3'	ggatccTACAAATCCCGTAGGC	BamHI	Amplificació eritromicina pNZerm
<b>Per a la comprovació de mutants</b>				
p5	extBEluxR	GTACGTCGGGCGTATCG	-----	Comprovació flanquejant braç esquerre
p6	extBDluxR	GCCCTTATGCTGG	-----	Comprovació flanquejant braç dret
p7	luxRup_flanq	TCCTTGCTTTCTGCAATCGCGCA	-----	Comprovació flanqueig <i>smlt1839</i>
p8	luxRdw_flanq	AGCAGGGCGTGCAGATCGTCAAT	-----	Comprovació flanqueig <i>smlt1839</i>
p17	extBEsint	GCATGGTCGATCACCTC	-----	Comprovació flanquejant braç esquerre
p18	extBDsint	CGGTGCCGCTGTTGAC	-----	Comprovació flanquejant braç dret
p11	Erm5'rev	GATACTGCACTATCAACACAC	-----	Comprovació inserció <i>erm</i> en soca mutant
p12	Erm3'rev	CTTCCAAGGAGCTAAAGAGGT	-----	Comprovació inserció <i>erm</i> en soca mutant
<b>Per a l'estudi del promotor LuxR</b>				
p19	pluzRlacZ_up	tctagaCGCACACGCATGGACCG	XbaI	Fusió promotor LuxR amb <i>lacZ</i>
p20	pluxRlacZ_dw	ggatccGAAGGCGTCGCGCTCGG	BamHI	Fusió promotor LuxR amb <i>lacZ</i>
p21	lacZ_up	GGATCCATGACCATGATTACG	-----	Comprovació clonatge en pBBR1MCS-5- <i>lacZ</i>
p22	lacZ_dw	AAGCTTTTATTTTGACACCA	-----	Comprovació clonatge en pBBR1MCS-5- <i>lacZ</i>
<b>Per a la sobreproducció de la proteïna LuxR</b>				
p23	NdeI LuxR_up	catatgAGCGATCTGGTGCAGGCG	NdeI	Sobreproducció regulador LuxR
p24	XhoSTOPLuxR_dw	ctcgagTCAGTCTTCGATCTGCCT	XhoI	Sobreproducció regulador LuxR
p25	T7_up	TAATACGACTCACTATAGGG	-----	Comprovació clonatge en pET22b
p26	T7_dw	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	-----	Comprovació clonatge en pET22b
<b>Per a la complementació del mutant</b>				
p27	Comp_up	ATCtctagaCACAGCAGCATCACCAGC	XbaI	Amplicó 5,5 kb
p28	Comp_dw	GACaagcttGGCCAGTTGCAGTTTCAT	HindIII	Amplicó 5,5 kb
p29	M13_Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	-----	Comprovació clonatge
p30	M13_Rev	CATGGTCTAGCTGTTTCT	-----	Comprovació clonatge
<b>Per a la seqüenciació de l'amplicó</b>				
p31	Amplicó_dw1	GAAGGCGTCGCGCTCG	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p32	Amplicó_up1	CGAGCGGACGCCTTC	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p33	Amplicó_dw2	CGGCCATTCTATGGTGG	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p34	Amplicó_dw3	GATCAGCAGCAGCTCGCC	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p35	Amplicó_dw4	CCGGCAGGAAGGTGAG	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p36	Amplicó_dw5	CTTGTCTAGCGGTCGTG	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p37	Amplicó_dw6	CCGATCCAGCGGCCAG	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb
p38	Amplicó_up2	CGGTCTCAAGCCAC	-----	Seqüenciació amplicó 5,5 kb

\*les seqüències dels enzims de restricció estan en minúscules

### 3.9. Seqüenciació de DNA.

La confirmació de les construccions plasmídiques, clons transformants i mutants i generació de seqüències *contig* s'ha dut a terme mitjançant PCR amb oligonucleòtids específics i/o mitjançant digestió amb enzims de restricció. La seqüenciació de les mostres d'aquest treball s'han realitzat en el Servei Genòmica Bioinformàtica (SGB) de la UAB amb l'equip ABI 3730x (Applied Biosystems) i a MacroGen Korea (<http://dna.macrogen.com>).

### 3.10. Mètodes de transferència de DNA plasmídic.

El procés de transformació es basa en la incorporació de DNA forani per part d'una cèl·lula bacteriana. Aquest procés es pot dur a terme bàsicament emprant dues metodologies de transformació induïda. En una s'utilitza una solució de  $\text{CaCl}_2$  100 mM mitjançant xoc tèrmic i en l'altre per electrotransformació mitjançant l'aplicació d'un pols elèctric.

El procés de transformació induïda amb  $\text{CaCl}_2$  s'ha utilitzat per a introduir DNA plasmídic a *E. coli*, mentre que l'electrotransformació ha estat el mètode emprat per a introduir DNA plasmídic a *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* per tal d'augmentar l'eficiència de transformació.

El mètode de transformació induïda utilitzant cèl·lules competents tractades amb  $\text{CaCl}_2$  mitjançant xoc tèrmic s'ha realitzat seguint els protocols descrits en el manual de *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook, 1989).

El mètode de preparació de cèl·lules electrocompetents per a la transformació per electroporació s'especifica a continuació.

#### 3.10.1. Preparació d'electrocompetents de *S. maltophilia* i *P. aeruginosa*.

El mètode de l'electotransformació és una bona alternativa a la transformació pel mètode de  $\text{CaCl}_2$ , ja que ofereix una major eficiència de transformació. Aquest mètode utilitza un impuls elèctric que despolaritza la membrana plasmàtica i hi crea uns porus transitoris per on pot entrar-hi el DNA. L'impuls elèctric el genera un electroporador GenePulser XCell de BioRad i les condicions emprades dependran del microorganisme que s'electropori. Per tal d'obtenir una bona freqüència de transformants és imprescindible que les cèl·lules estiguin en un bon estat fisiològic i ben exemptes de sals, així com la utilització de DNA en una solució de baixa força iònica. El protocol usat en *S. maltophilia* es realitza a temperatura ambient tal i com es descriu per Choi, *et al.*, (2006).

La preparació de cèl·lules electrocompetents es realitza:

1. Fer 4 alíquotes de 1 mL de cultiu de nit crescut en LB en medi LB.
2. Centrifugar el cultiu a 16000 x *g* durant 5 min a temperatura ambient.
3. Descartar el sobrenedant i resuspendre cuidadosament el *pellet* de cèl·lules en 1 mL de sucrosa 300 mM estèril i centrifugar a 16000 *g* durant 5 min.
4. Eliminar el sobrenedant i repetir el rentat amb sucrosa 300 mM dos vegades més.

5. Un cop fet l'últim rentat, es resuspèn el *pellet* de cèl·lules de cada alíquota amb 100  $\mu$ L de sucrosa 300 mM.

### 3.10.2. Electroporació de *S. maltophilia* i *P. aeruginosa*.

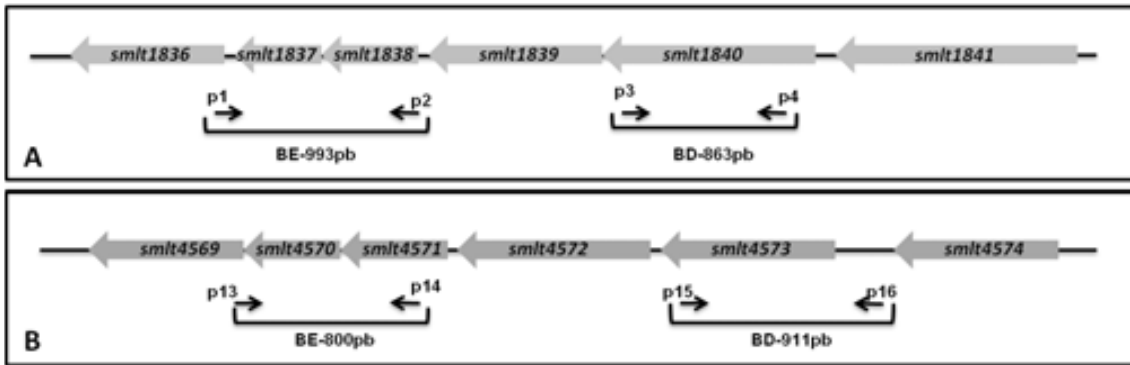
1. Barrejar 100  $\mu$ L de les cèl·lules electrocompetents amb la concentració de DNA adient segons si el plasmidi és replicatiu (10-50 ng) o no replicatiu (300-500 ng).
2. Transferir les cèl·lules amb el DNA a la cubeta d'electroporació de 0,2 cm i deixar les cubetes 10 min en gel.
3. Procedir a l'electroporació mitjançant l'electroporador GenePulser XCell™ de BioRad segons el protocol descrit per Choi, *et al.*, (2006):
  - Potencial elèctric: 2,5 kV
  - Resistència: 200  $\Omega$
  - Capacitància: 25  $\mu$ F
4. Resuspendre les cèl·lules electroporades en 1 mL de LB, transferir-les a un tub ependorff i incubar-les durant 2 h a 37°C.
5. Sembrar en plaques selectives en funció del plasmidi introduït i incubar tota la nit a 37 °C.

### 3.11. Mutagènesi en *S. maltophilia* E77.

Per l'obtenció de mutants en *S. maltophilia* E77 s'ha usat l'electroporació del plasmidi no replicatiu pEX18Tc en *S. maltophilia* (Hoang, *et al.*, 1998), que permet la generació de mutants a partir de la doble recombinació homòloga i introducció per intercanvi al·lèlic el gen de resistència a la Erm en el lloc del gen que volem delectonar.

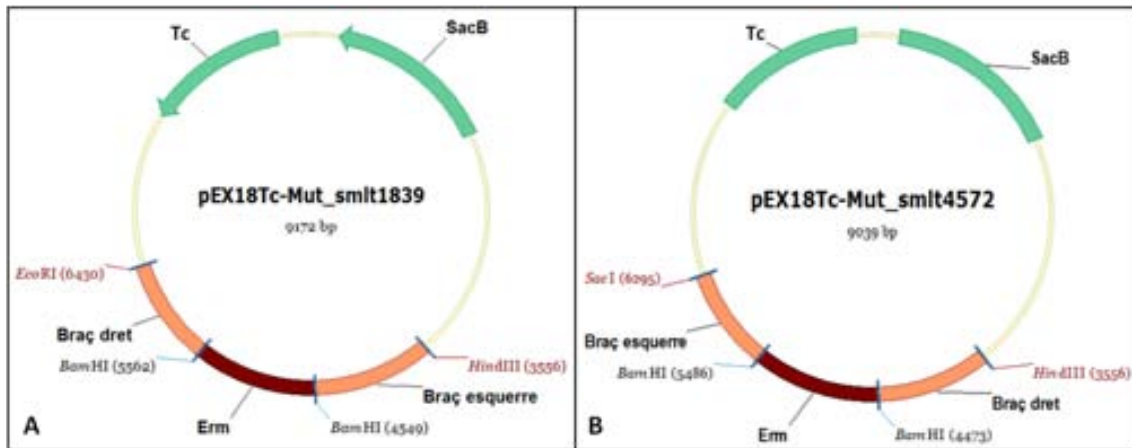
En aquest treball s'han delectonat els ORFs corresponents a *smlt1839* i *smlt4572* de *S. maltophilia* E77. L'estratègia de mutagènesi ha estat la mateixa per ambdós mutants i s'explica més detalladament a continuació.

1. Amplificació de dos amplicons corresponents a les regions flanquejants al gen que volem delectonar anomenats braç esquerre (BE) i braç dret (BD) tal i com s'esquematitza a la Figura 3.13. S'han utilitzat per la amplificació els nucleòtids p1 i p2 pel braç esquerre i p3 i p4 pel braç dret per a la delectió de l'ORF *smlt1839* i els nucleòtids p13 i p14 pel braç esquerre i p15 i p16 pel braç dret per a la delectió de l'ORF *smlt4572*.



**Figura 3.13.** Amplicons dels braços flanquejants als gens *smlt1839* (A) i *smlt4572* (B) usats per la clonació en el plasmidi pEX18Tc i que serviran per a generar la doble recombinació homòloga entre el plasmidi i el genoma de *S. maltophilia* E77.

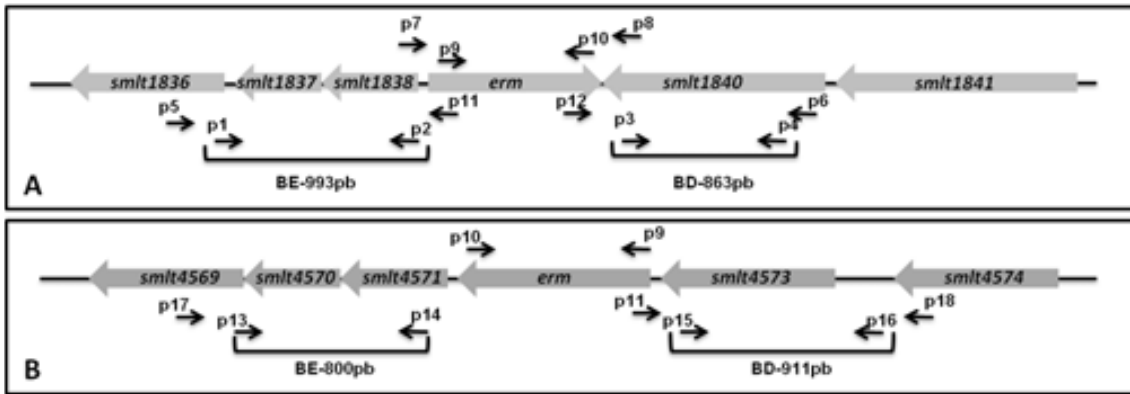
2. Clonació dels amplicons BE i BD flanquejants als ORFs *smlt1839* i *smlt4572* en el plasmidi pGEM-Teasy®.
3. Alliberar cada fragment amb els enzims de restricció adients per tal de ser clonats en el lloc de clonació múltiple (MCS) del plasmidi pEX18Tc. Les digestions han estat les següents: BE*smlt1839* alliberat amb HindIII i BamHI, BD*smlt1839* amb BamHI i EcoRI, BE*smlt4572* amb SacI i BamHI i BD*smlt4572* amb BamHI i HindIII.
4. Clonació dels amplicons BE i BD en el plasmidi pEX18Tc prèviament digerit amb els enzims de restricció (EcoRI i HindIII) pels braços flanquejants al ORF *smlt1839* i (SacI i HindIII) pels braços flanquejants al ORF *smlt4572*. Per totes dues estratègies de clonació els braços queden lligats entre si amb la diana BamHI. Es generen els plasmidis pEX18Tc-BE::BD per cadascuna de les estratègies.
5. Amplificació del gen *erm* que codifica pel gen de resistència a la Erm amb els oligonucleòtids p9 i p10 sobre plasmidi pNZerm i clonació en el pGEM-Teasy® i alliberar el gen *erm* amb dianes BamHI.
6. Digestió amb BamHI el plasmidi pEX18Tc-BE::BD per tal d'introduir el marcador de resistència *erm* entre el BE i BD. Vegeu esquema dels dos plasmidis que ens serviran per la mutació a la Figura 3.14. La correcta construcció dels plasmidis s'ha comprovat per seqüenciació.
7. Electroporació dels plasmidis no replicatius sobre cèl·lules electrocompetents de *S. maltophilia* tal i com s'ha descrit anteriorment en l'apartat de Materials i Mètodes 3.10.
8. Les cèl·lules un cop electroporades es sembren en plaques que continguin l'antibiòtic de Erm (LB-Erm) i s'incuben a 37 °C.



**Figura 3.14.** Representació esquemàtica del plasmidi no replicatiu per a la generació de mutants en *S. maltophilia*. **A**, pEX18Tc-Mut\_smlt1839 pel mutant *smlt1839* i **B**, pEX18Tc-Mut\_smlt4572 pel mutant *smlt4572*. S'indiquen per a cada constructe el braç esquerre i dret, les dianes de clonació del MCS del plasmidi pEX18Tc i els marcadors de resistència Erm i Tc. Imatges generades amb el programa Vector NT1.

La mutació elimina completament l'ORF del gens *smlt1839* i *smlt4572* i es produeix un intercanvi al·lèlic entre el gen que volem delectar i el gen *erm*, que ens servirà per a seleccionar els clons mutants dels clons salvatges en el medi selectiu (LB-Erm). Per tal de diferenciar entre els clons resistents a l'antibiòtic de la Erm on s'ha produït o bé la doble recombinació o la simple recombinació, es sembren tots els clons apareguts en les plaques de LB-Erm en plaques de LB-Tc per tal de separar els clons candidats mutants pel gen E77 mutant ( $Erm^R/Tc^S$ ) dels que el plasmidi s'ha integrat en el genoma sent fenotípicament E77 wt ( $Erm^R/Tc^R$ ).

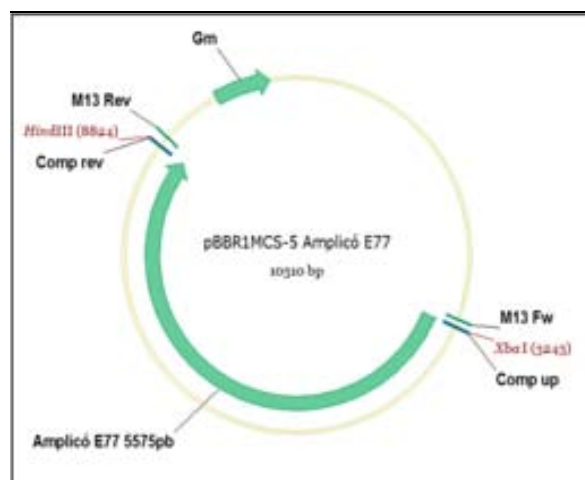
Els clons mutants candidats de *E77Δsmlt1839* i *E77Δsmlt4572* s'han de comprovar per seqüenciació que permetrà corroborar la correcta delectió del gen. Les amplificacions per PCR s'han realitzat a partir d'oligonucleòtids interns complementaris al gen *erm* conjuntament amb els oligonucleòtids complementaris a les regions flanquejades dels braços (BE o BD) que s'han usat per a la doble recombinació. Vegeu esquema dels oligonucleòtids usats per aquesta metodologia a la Figura 3.15.



**Figura 3.15.** Esquematització de l'entorn genètic de la regió mutada a la soca *S. maltophilia* E77 mutant pel gen *smlt1839* (A) i *smlt4572* (B) substituït pel gen de resistència *erm*. S'observen les regions corresponents als braços esquerre (BE) i dret (BD) que serveixen per a la doble recombinació homòloga i tots els oligonucleòtids (marcats amb una fletxa) usats durant la mutagènesi i la comprovació dels mutants.

### 3.12. Complementació de mutacions en *S. maltophilia* E77.

La complementació de la mutació en el gen *smlt1839* que codifica per la proteïna reguladora del tipus LuxR s'ha abordat a partir de la clonació d'un amplicó de 5,5 kb. en el plasmidi pBBR1MCS-5 (Kovach, *et al.*, 1995) el qual és replicatiu en *S. maltophilia*. S'ha escollit clonar in fragment llarg per evitar efectes polars. L'amplificació amb els nucleòtids p27 i p28 sobre el DNA genòmic de la soca *S. maltophilia* E77 ha generat un amplicó de 5,5pb. Aquest s'ha clonat mitjançant les dianes del MCS, XbaI i HindIII, del plasmidi pBBR1MCS-5 generant el plasmidi pBBR1MCS-5-Amplicó E77 mostrat a la Figura 3.16.



**Figura 3.16.** Representació esquemàtica del plasmidi pBBR1MCS-5 Amplicó E77 per a la complementació de la mutació en el gen *luxR* de la soca de *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*. S'indiquen les dianes de clonació presents en el MCS del plasmidi pBBR1MCS-5 utilitzades per a clonar l'amplicó de 5,5 kb. ORF del marcador de resistència Gm. S'especifiquen els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació de l'amplicó (Comp\_up i Comp\_rev) i els universals M13 Rev i M13 Fw utilitzats per a la comprovació del clonatge. Imatge generada amb el programa Vector NT1.

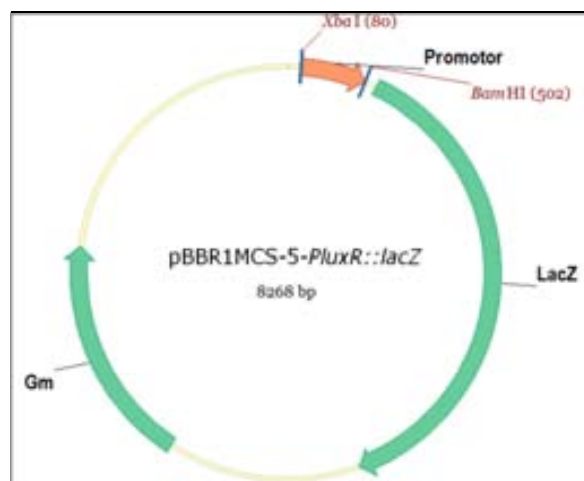
### 3.13. Anàlisi de l'expressió gènica.

#### 3.13.1. Construcció de fusions transcripcionals amb el gen indicador *lacZ*.

S'ha construït en la soca d'*E. coli* DH5 $\alpha$  una fusió transcripcional de la regió promotora del gen *smt1839* que codifica pel regulador del tipus LuxR amb el gen indicador *lacZ* clonada en el plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ* (Fried, *et al.*, 2012).

Hem amplificat la regió promotora hipotètica del gen *luxR* utilitzant els oligonucleòtids p19 i p20 i l'hem clonat amb les dianes XbaI i BamHI presents en el MCS del plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ* per tal de construir una fusió transcripcional entre aquests fragments generant el plasmidi pBBR1MCS-5-*PluxR::lacZ* (vegeu Figura 3.17).

La fusió s'ha transferit per electroporació a les soques wt de *S. maltophilia* E77 i *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smt1839*. Paral·lelament també s'ha electroporat sobre aquestes dues soques el plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ* per tal d'obtenir soques control de l'expressió.



**Figura 3.17.** Representació esquemàtica del plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ* on s'ha realitzat la fusió transcripcional del promotor del gen *luxR* (*PluxR*) amb el gen *lacZ* en el plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ*. S'indiquen les dianes de clonació presents en el MCS del plasmidi pBBR1MCS-5-*lacZ* utilitzades per a clonar el *PluxR* davant del gen *lacZ* generant la fusió *PluxR::lacZ* i l'ORFs del marcador de resistència Gm. Imatge generada amb el programa Vector NT1.

#### 3.13.2. Assaig de l'activitat de la $\beta$ -galactosidasa.

L'assaig de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa és un sistema indirecte per a calcular l'expressió gènica. Es basa en el mètode descrit per Miller (Miller, 1972).

És un mètode quantitatiu en el que es mesura indirectament la quantitat de  $\beta$ -galactosidasa expressada sota el control del promotor del gen d'interès. L'activitat de l'enzim



$\beta$ -galactosidasa (codificada pel gen *lacZ*) es mesura detectant la producció d'un producte de color groc (o-nitrofenol) a partir de la hidròlisi del compost incolor o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactòsid (ONPG) a 28 °C i pH 7. El compost o-nitrofenol pot ser detectat espectrofotomètricament.

Mitjançant la següent fórmula es poden calcular les Unitats Miller (UM) que són un valor indirecte del grau d'expressió del gen d'interès:

$$\text{Unitats Miller} = 1000 \times \left( \frac{(A_{420\text{nm}} - (1,75 \times A_{550\text{nm}}))}{(\Delta t \times 0,2 \text{ ml (volum mostra)} \times \text{OD}_{550\text{nm}} (\text{cultiu}))} \right)$$

### 3.13.2.1. Procediment d'expressió i anàlisi activitat $\beta$ -galactosidasa.

S'han realitzat diferents experiments en medi LB i BM2 a 30 °C i 37 °C per tal d'analitzar les millors condicions d'activitat  $\beta$ -galactosidasa. S'ha escollit el medi de LB i temperatura de 30 °C en cadascun dels experiments que es detallen a continuació (a, b i c). En cada experiment s'ha estudiat l'activitat  $\beta$ -galactosidasa de la soca problema i control realitzant en paral·lel els cultius de les soques portadores de la fusió del promotor del gen d'interès amb el gen *lacZ* (en el nostre cas pBBR1MCS-5-*PluxR::lacZ*) i de les soques que només contenen el plasmidi control pBBR1MCS-5-*lacZ* sense el promotor *luxR*.

#### Les soques de treball les hem anomenat:

S'ha treballat amb 3 clons diferents les soques problema: *S. maltophilia* E77 (pBBR1MCS-*PluxR::lacZ*) i *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* (pBBR1MCS-5-*PluxR::lacZ*) i les soques control: *S. maltophilia* E77 (pBBR1MCS-5-*lacZ*) i *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* (pBBR1MCS-5-*lacZ*).

#### a) Activitat $\beta$ -galactosidasa sota el promotor *PluxR* -Corba de creixement:

1. Realitzar un cultiu de nit de 10 mL a 30 °C en agitació amb l'antibiòtic necessari de les soques problema i control.
2. Fer una resembra 1/100 en LB amb l'antibiòtic necessari per a obtenir una absorbància inicial de  $A_{550\text{nm}}$  de 0,05.
3. Incubar 64 h a 30 °C i prendre mostres a diferents temps per a determinar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa de la cinètica d'expressió.

#### b) Activitat $\beta$ -galactosidasa del promotor *PluxR* amb sobrenedants filtrats:

1. Realitzar un cultiu de nit de 10 mL a 30 °C en agitació amb l'antibiòtic necessari de les soques problema i control.
2. Fer una resembra 1/100 en LB amb l'antibiòtic necessari per a obtenir una absorbància inicial de  $A_{550\text{nm}}$  de 0,05. El 40 % o 10 % del volum final de LB prové

del sobrenedant del cultiu de nit filtrat. En el cas de les soques control el volum de sobrenedant prové de la soca problema i no de la control amb el mateix fons genètic (Niu, *et al.*, 2008).

3. Incubar 24 h i 48 h a 30 °C i prendre mostres a 24 h i 48 h.

c) Activitat  $\beta$ -galactosidasa del promotor *PluxR* amb AHLs sintètiques:

1. Realitzar un cultiu de nit de 10 mL a 30 °C en agitació amb l'antibiòtic necessari de le soques problema i control.

2. Fer una resembra 1/100 en LB amb l'antibiòtic necessari per a obtenir una absorbància inicial de  $A_{550nm}$  de 0,05. Afegir AHLs exògenes a concentració 100 nM i 10  $\mu$ M. Les AHLs sintètiques utilitzades han estat la C4-HSL, C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL les quals s'han assecat al SpeedVac i ressuspès amb 20  $\mu$ l de etanol al 100 % (Egland & Greenberg, 2000, Niu, *et al.*, 2008, Gamage, *et al.*, 2011).

3. Incubar 24 h a 30 °C i prendre mostra a 24 h.

**3.13.2.2. Presa de mostres.**

1. Tub de cèl·lules: Prendre 0,8 mL de cultiu afegir-hi 0,1 mL de formol 10 % [wt/vol]. Fer un tub de control on es barrejaran 0,8 mL de LB + 0,1 mL de formol 10 %. Barrejar vigorosament la mostra amb el vòrtex. Mesurar la OD a 550 nm.

2. Tub de l'assaig  $\beta$ -galactosidasa: Prendre 0,2 mL de cultiu i afegir-hi 0,8 mL de Tampó Z i 5  $\mu$ L de toluè. Preparar un tub com a blanc utilitzant LB. Seguir els següents passos:

3. Barrejar vigorosament les mostres amb el vòrtex.

4. Evaporar el toluè durant 1 h a 37 °C en agitació.

5. Incubar les mostres a 28 °C per atemperar-les.

6. Afegir 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL, es prepara dissolent-lo en tampó fosfat 0,1 M pH 7). Comptar el temps que triga la mostra a tornar-se de color groc.

7. Aturar la reacció afegint 0,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M.

8. Agitar i guardar en la foscor.

9. Mesurar-ne la OD a 550 nm i a 420 nm.

10. Fer el càlcul de les UM amb la fórmula descrita anteriorment.

**Taula 3.11.** Solucions assaig  $\beta$ -galactosidasa

<b>Tampó Z</b>	4,26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (60mM) 2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (40 mM) 0,372 g KCl (10 mM) 0,123 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mM) 1,75 mL $\beta$ -mercaptoetanol (50 mM) Dissoldre en aigua destil·lada, enrasar a un volum final de 500 mL i ajustar el pH a 7.
<b>Tampó fosfat</b>	1,42 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,1 M) 1,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0,1 M) Dissoldre en aigua destil·lada, enrasar a un volum final de 100 mL. i ajustar a pH 7. Guardar a 4 °C.
<b>ONPG</b>	Es pesa a una concentració de 4 mg/mL i es dissol en tampó fosfat 0,1 M a pH 7. Es prepara de nou cada cop que s'ha d'utilitzar i es manté protegit del contacte amb la llum.
<b>Carbonat de sodi</b>	6,2 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (1 M) Es dissol en 50 mL d'aigua destil·lada i es prepara de nou per a cada experiment.

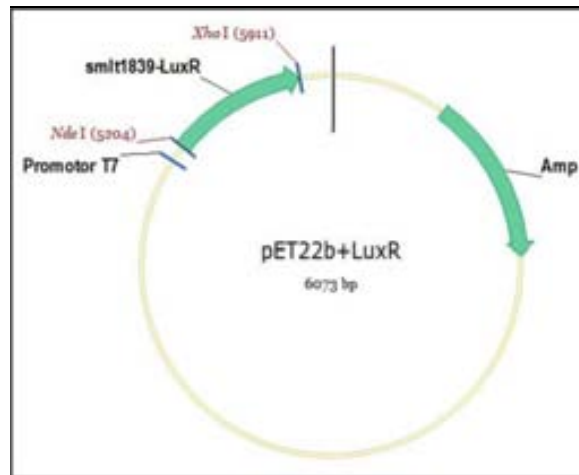
### 3.14. Mètodes de manipulació de proteïnes.

#### 3.14.1. Sobreproducció de proteïnes recombinants en *E. coli* BL21 (DE3).

La proteïna recombinant LuxR que s'ha generat en aquest treball s'ha produït en *E. coli*, mitjançant plasmidis d'expressió de la sèrie pET (Novagen). Aquests plasmidis es caracteritzen per a presentar un promotor fort com és el promotor del fag T7. Per tal que es pugui expressar la proteïna, és necessari transformar el plasmidi en una soca portadora de la T7 RNA polimerasa que es troba sota el control del promotor *lac* i que s'indueix per IPTG. En aquest treball s'han utilitzat les cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) que porten el  $\lambda$ DE3 lisògen que conté el gen de la T7 RNA polimerasa.

Aquest sistema de plasmidis d'expressió també permet generar fusions entre la proteïna d'interès i varis tipus de cues peptídiques (His-Tag<sup>®</sup>, S-Tag<sup>™</sup>, T7-Tag<sup>™</sup>, HSV-Tag<sup>™</sup>) per a facilitar-ne la posterior detecció o purificació. En el nostre cas, no ens interessava la purificació per l'anàlisi que volíem realitzar.

En aquest treball s'ha produït una proteïna recombinant amb el regulador del tipus LuxR, codificat en l'ORF *smlt1839* de la soca de *S. maltophilia* E77. S'han utilitzat els nucleòtids p23 i p24 per tal d'amplificar el gen *smlt1839* i posteriorment clonar-lo en el plasmidi d'expressió pET22b digerit amb les dianes NdeI i XhoI. Afegir la diana NdeI en el primer p23 aporta la primera Metionina de la proteïna, així ens assegurem del correcte patró de lectura i per tant prescindim de les tres primeres bases (ATG) de l'ORF *smlt1839*. Per tal que no es produeixi una fusió transcripcional amb la cua de 6xHis en l'extrem C-terminal i no afecti posteriors anàlisis no hem prescindit del codó STOP de l'ORF *smlt1839*. A la següent Figura 3.18 s'esquematitza com s'ha produït aquesta construcció en el plasmidi pET22b.



**Figura 3.18.** Representació esquemàtica del plasmidi que ens permetrà la sobreproducció de la proteïna LuxR en la soca d'*E. coli* BL21 (DE3). S'indiquen les dianes de clonació NdeI i Xho amb les quals s'ha clonat el gen *smt1839* presents en el MCS del plasmidi pET22b. ORF del marcador de resistència Amp. Imatge generada amb el programa Vector NT1.

#### 3.14.1.1. Procediment de sobreproducció proteïna LuxR.

1. Sembrar un cultiu de nit de la soca BL21 (DE3) portadora del plasmidi d'expressió pET22b-proteïna LuxR recombinant en 10 ml LB-Amp (100 µg/mL). Deixar incubant amb agitació a 37 °C. durant tota la nit.
2. Realitzar una resembra 1/100 del cultiu de nit en 10 mL de LB fresc-Amp (100 µg/mL) i incubar a 37 °C en agitació.
3. Controlar l'absorbància del cultiu a 550 nm i quan aquesta arribi a 0,5 induir el cultiu amb IPTG a una concentració final de 1 mM.
4. Deixar induint durant 3,5 h.
5. Analitzar les mostres en funció de l'assaig realitzat i guardar les mostres per l'electroforesi de proteïnes.

#### 3.14.2. Electroforesi de proteïnes.

Els extractes proteics s'han separat mitjançant gels de poliacrilamida i SDS (SDS-PAGE), tècnica bàsica per a separar les proteïnes en funció del seu pes molecular descrita per Laemmli (1970), emprada en aquest treball amb algunes modificacions. Les proteïnes es desnaturalitzen a 100 °C en presència de SDS i β-mercaptoetanol. El detergent aniònic SDS permet que les proteïnes adquireixin una càrrega superficial negativa que fa que migren cap a l'ànode en presència d'un camp elèctric, i el β-mercaptoetanol és un agent reductor que trenca els ponts disulfur. D'aquesta manera, les proteïnes migren en funció del seu pes molecular. La visualització dels gels s'obté mitjançant la tinció amb el colorant blau de Commassie.

En aquest treball s'han realitzat gels SDS-PAGE al 12,5 % d'acrilamida. La identificació per empremta peptídica s'ha realitzat a partir de la digestió amb tripsina d'una de les bandes provinents del gel SDS-PAGE. L'anàlisi i identificació de la proteïna sobreproduïda s'ha realitzat per espectrometria de masses en l'equip Ultraflex Extreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics) en el Servei de Proteòmica i Biologia Estructural (SepBioEs), de la UAB.

### 3.15. Assaig d'unió a AHLs.

Mitjançant la sobreproducció de la proteïna reguladora LuxR en presència d'AHLs sintètiques i posterior anàlisi per CCF, ens ha permès identificar quines molècules d'AHLs s'uneixen al regulador LuxR.

El procediment realitzat en aquest treball s'ha fet tal i com descriu Subramoni i Venturi (2009), amb algunes modificacions que es descriuen més detalladament a continuació:

1. Fem créixer en agitació 10 mL de LB-Amp (100 µg/mL) a 37 °C un cultiu de nit d'*E. coli* BL21 (DE3) amb el plasmidi pET22b o bé el plasmidi pET22b-LuxR.
2. L'endemà es fa una ressebra 1/100 en 20 mL de LB-Amp (50 µg/mL) a 37 °C.
3. Quan la OD a 550 nm és de 0,1, afegim les AHLs que volem estudiar a concentració final de 10 µM o 20 µM. S'elimina el solvent d'acetat d'etil al SpeedVac de la solució *stock* 10 mM i es ressuspèn la mostra amb 20 µl d'etanol.
4. Quan la OD a 550 nm és de 0,6 afegim al cultiu IPTG a concentració final 1 mM. Els cultius s'incuben durant 3,5 h.
5. Després de 3,5 h es mesuren les absorbàncies dels cultius i es processen el mateix nombre de cèl·lules per a cada mostra.
6. S'agafa petit volum de mostra pel gel SDS-PAGE corresponent a OD de 1 (aproximadament 500 µl)
7. La resta de cultiu 19,5 mL es centrifuga 3000 *g* per separar les cèl·lules del sobrenedant per tal de rentar el *pellet* de cèl·lules amb 20 ml de PBS al 1 % [wt/vol] i eliminar les restes d'AHLs que no s'hagin unit al regulador LuxR. Aquest pas es repeteix quatre vegades i cada cop es canvia el tub on es centrifuguen i netegen els botons de cèl·lules.
8. Finalment resuspenem el *pellet* de cèl·lules amb 10 mL de PBS al 1 % [wt/vol] i es fa una extracció de les AHLs amb 10mL d'acetat d'etil (amb 0,1 % àcid glacial acètic) per tal d'extreure les AHLs que s'hagin pogut unir al regulador LuxR.

9. Els extractes d'acetat d'etil s'assequen al SpeedVac i es resuspenen amb ACN per tal de ser analitzats per CCF i realitzar un bioassaig per a detectar AHLs (vegeu com es realitzen aquests assaigs a l'apartat de Materials i Mètodes 3.6).

Cadascuna de les molècules d'AHLs sintètiques escollides per aquest assaig (C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL) les hem estudiat per separat tant en les soques problema BL21 (DE3) pET22b-LuxR com en les soques control BL21 (DE3) pET22b. Aquest assaig s'ha repetit en tres experiments independent per a cada molècula i concentració d'AHLs sintètiques emprades.

### **3.16. Assaigs de formació de biofilms.**

#### **3.16.1. Biofilms en plaques de poliestirè de 96 pous.**

En aquest assaig la formació de biofilms es determina per l'habilitat de les cèl·lules a adherir-se a les parets i la base dels pous de les plaques de poliestirè. La quantificació de biofilms formats per les soques de *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* estudiades, s'ha realitzat a partir de la tinció amb cristall violeta (CV) en plaques de poliestirè de 96 pous amb algunes modificacions respecte els protocols de O'Toole i Kolter (1998) i Ferrer-Navarro, et al., (2013).

Primerament es fan créixer les soques a testar en cultius de nit en medi LB i 37 °C en agitació. L'endemà es realitzen alíquotes de 200 µl en cadascun dels pous després d'igualar tots els inòculs inicials a OD a 550 nm de 0,1. El biofilm s'incuba el temps i temperatura necessari per a cada experiment. Abans de començar la tinció amb CV es mesura a 620 nm la densitat òptica de cadascun dels pous per tal de normalitzar *a posteriori* el creixement de cada soca respecte l'absorbància obtinguda de la tinció amb el CV. Després es renta la placa de poliestirè tres vegades amb aigua destil·lada, es fixa i s'asseca el biofilm durant 1 h aproximadament a l'estufa de 60 °C i es tenyeix cada pou durant 15 min amb 200 µl CV 0,1 % [wt/vol] a temperatura ambient. Passat aquest temps s'elimina l'excedent de CV rentant la placa de poliestirè tres cops en aigua destil·lada i s'asseca de nou durant 30 min a l'estufa de 37 °C. Per a dissoldre el CV unit al biofilm format s'afegeixen a cada pou 250 µl d'àcid glacial acètic 33 % [wt/vol] durant 15 min i es quantifica l'absorbància a 550 nm.

L'aparell utilitzat per a la quantificació de l'absorbància ha estat el VictorV31420 multilabel counter Wallac amb programari wallac 1420 workstation. S'han realitzat vuit rèpliques per a cada soca en tres experiments independents per a cada condició de cultiu estudiada.

### 3.16.1.1. Activitat IQS en plaques de poliestirè de 96 pous.

L'estudi de la degradació de biofilm estudiat en plaques de poliestirè de 96 pous mitjançant l'addició del sobrenedant de *B. subtilis* A24 s'ha realitzat tal i com descriuen Ramli, *et al.*, (2012) amb algunes modificacions.

S'ha afegit un 1 % o 10 % de sobrenedant filtrat de la *B. subtilis* A24 en cadascun dels pous que contenia 200 µl de volum final amb el cultiu de la soca d'estudi a OD inicial de 0,1 mesurat a 550 nm. S'ha incubat el biofilm el temps necessari per analitzar l'activitat IQS del sobrenedant en funció de l'adhesió de les soques d'estudi a les parets de poliestirè. La quantificació de biofilms s'ha realitzat com s'ha explicat en l'apartat 3.16.1. S'han realitzat vuit rèpliques per a cada soca en tres experiments independents per a cada condició de cultiu estudiada.

### 3.16.2. Biofilms en tubs de vidre.

Per tal d'estudiar el la pel·lícula superficial formada en el biofilm (anomenada *pellicle*), s'han realitzat cultius en tubs de vidre estèrils on hem dipositat 3 mL de medi LB o BM2 a OD inicial de cultiu de 0,1 mesurada a 550 nm i incubat a 30 °C i 37 °C durant 48 h sense agitació. Passat aquest temps s'aboca el contingut del tub i es fan tres rentats amb molta cura amb aigua destil·lada. Posteriorment es tenyeix cada tub amb 3,5 mL de CV al 0,1 % [wt/vol] durant 15 min. Es retira el colorant i es renten amb molta cura cadascun dels tubs amb aigua per tal d'avaluar la pel·lícula de biofilm formada a la part més superficial del tub. En aquest experiment no hem quantificat l'absorbància emesa pel CV adherit a les cèl·lules ja que ens interessava estudiar la pel·lícula. S'han realitzat tres rèpliques per a cada soca en tres experiments independents per a cada condició de cultiu estudiada.

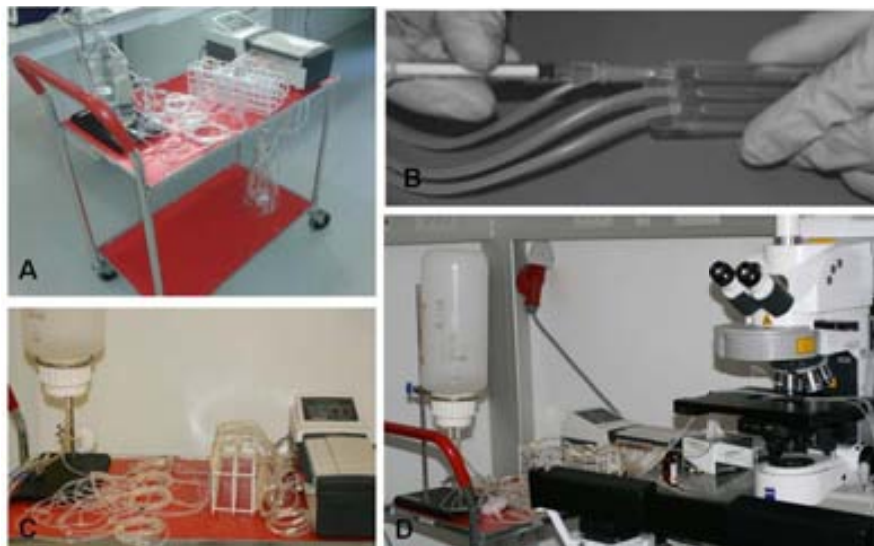
### 3.16.3. Biofilms en cambres de flux.

El sistema de cambra de flux en la formació de biofilms és una eina molt útil i molt usada per l'estudi *in vitro* de la formació de biofilms sota condicions hidrodinàmiques de flux.

En aquest treball s'ha usat les soques de *S. maltophilia* E77 i *S. maltophilia* E77Δ*smlt1839* marcades amb el plasmidi pMP7605 que conté la proteïna mCherry sota el promotor *ptac*, (Legendijk, *et al.*, 2010). L'electroporació del plasmidi s'ha realitzat com s'ha explicat anteriorment en l'apartat de 3.10.2. La formació de biofilms en cambres de flux laminar s'ha realitzat sota les mateixes condicions que els autors Ryan, *et al.*, (2008) van utilitzar per a la soca *S. maltophilia* K279a.

## Materials i Mètodes

El sistema de flux s'ha muntat, preparat i esterilitzat (Figura 3.19-A) tal i com s'ha descrit prèviament en diversos treballs (Tolker-Nielsen & Sternberg, 2011, Crusz, *et al.*, 2012). Es prepara una dilució 1/1000 en NaCl 0,9 % [wt/vol] del cultiu de nit crescut en medi ric LB a 37 °C de cadascuna de les soques a estudiar. S'inoculen mitjançant una xeringa 500 µl les suspensions en cadascun dels tres canals independents de cada cambra de flux (Figura 3.19-B) i es deixen 2 h sense flux laminar per tal que les cèl·lules s'adhereixin a la superfície. Passat aquest temps es reinicia el flux continu a una velocitat constant de 3,3 mL.h<sup>-1</sup> que permetrà el pas de medi FABL de forma constant a través de cada canal de la cambra gràcies a la bomba peristàltica (Walson Inc., Wilmington, MA). Els biofilms s'han incubat en cambres a 37 °C (Figura 3.19-B) i monitorat durant 96 h en el microscopi CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*, (Zeiss LSM510; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipat amb els detectors necessaris per a captar la fluorescència emesa per les proteïnes fluorescents com Cfp, Gfp, Tfp i mCherry. (Figura 3.19-D). Les imatges de fluorescència obtingudes al microscopi s'han processat en el programari Imaris (Bitplane). Cada soca ha estat estudiada en paral·lel en tres canals i s'han capturat dotze imatges en cada canal en els diferents temps. Per a conèixer treballs inicials sobre aquesta metodologia es pot consultar la següent bibliografia (Davies, *et al.*, 1998, Christensen, *et al.*, 1999, Haagensen, *et al.*, 2007). Aquesta metodologia es va dur a terme durant l'estada predoctoral de tres mesos en el centre d'investigació Costerton Biofilm Center, Department of International Health, Immunology and Microbiology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark.



**Figura 3.19.** Sistema de cambres de flux . **A**, Esterilització del sistema. **B**, Inoculació de la cambra de flux on s'estudiarà la formació dels biofilms. **C**, Incubació de les cambres de flux. **D**, Visualització del biofilm que es va formant a la cambra de flux al microscopi CLSM.



### 3.17. Motilitat del tipus *swarming*.

La motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 s'ha realitzat tal i com descriuen els autors Overhage, *et al.*, (2007) per *P. aeruginosa* amb algunes modificacions com per exemple que l'agar usat en aquest treball és l'agar Noble (Difco™), la temperatura d'incubació de 30 °C i el temps d'incubació d'una setmana. El protocol de motilitat del tipus *swarming* per *S. maltophilia* s'ha descrit amb anterioritat en el nostre laboratori publicat en el treball realitzat per Ferrer-Navarro, *et al.*, (2013).

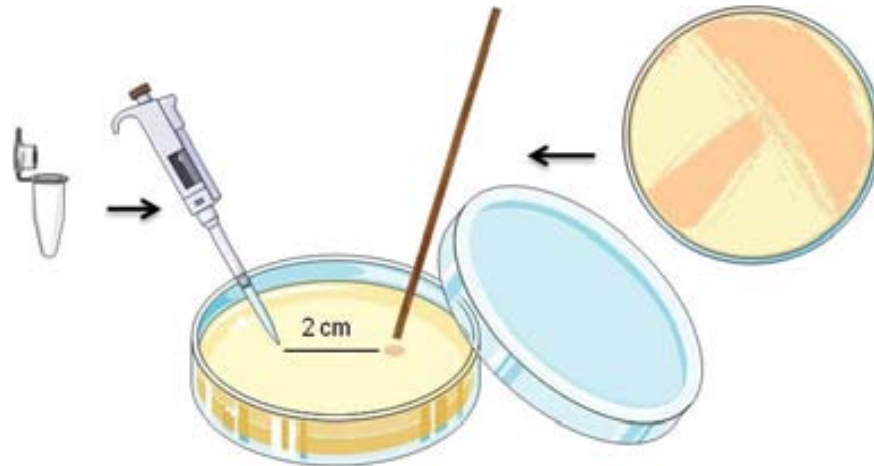
Per a preparar les plaques de *swarming* cal preparar el mateix dia de l'assaig la quantitat de BM2-agar (0,5 %) que volem utilitzar, segons les plaques que s'hagin d'emprar i es realitzen triplicats per cada assaig. S'utilitza un falcon de 50 mL estèril o pipeta de 25 mL per tal d'abocar 25 mL de medi en cadascuna de les plaques de Petri de 90 mm o 10 mL en plaques de Petri de 55 mm. Un cop abocat el medi s'assequen les plaques durant una hora dins de la campana de flux laminar. El mateix dia s'inoculen les plaques usant escuradents estèrils amb punta arrodonida que ens ajuden a dipositar amb molta cura la colònia sobre la superfície del medi BM2-agar (0,5 %) ja solidificat evitant trencar-lo. Les plaques de *swarming* s'incuben boca amunt a 30 °C durant una setmana en el cas de *S. maltophilia* i 24 h a 37 °C en el cas que s'estudii *P. aeruginosa*. Cal remarcar que l'inòcul de colònia prové d'una placa fresca on s'ha estriat la soca d'estudi com a màxim 48 h abans de l'assaig del *swarming*. Segons l'experiment es pot segellar la placa amb parafilm per tal d'evitar que s'assequin les plaques a l'incubador.

#### 3.17.1. Estudi de la motilitat del tipus *swarming* a partir de l'addició de diferents mostres a les plaques de *swarming*.

En el cas que es dipositin AHLs sintètiques dissoltes en ACN, extractes de sobrenedants totals provinents de cultius de nit o d'extraccions de sobrenedant amb acetat d'etil, aquests són prèviament filtrats amb filtres de 0,22 µm. Un cop dipositats els volums de entre 5-20 µl a 2 cm del punt on s'ha realitzat l'inòcul, no s'han de moure les plaques a l'incubador fins que el volum no s'hagi assecat del tot. Vegeu esquema a la Figura 3.20.

Es realitzen com a mínim dos rèpliques per a cada assaig i tres experiments independents. Les plaques control es realitzen sempre paral·lelament en cada experiment on només s'afegeix el solvent usat en cada cas amb intencionalitat de controlar que no es produeix cap efecte inhibitori o estimulador per part del solvent en la motilitat del tipus *swarming*.

Les plaques de *swarming* s'han escanejat utilitzant l'escàner Epson perfection V5000 photo amb programari Epson Scan v.3.74ES.



**Figura 3.20.** Esquema de plaques de *swarming*. Placa de *swarming* en medi BM2 on s'assaja la motilitat a partir de l'addició de diferents mostres (entre 5- 20  $\mu$ l) a 2 cm de l'inòcul inicial que prové d'estria fresca en medi LB. Aquest procediment es realitza dins la campana de flux laminar. Figures extretes del banc d'imatges de la pagina Servier Medical Art.

### 3.18. Anàlisi estadístic.

L'anàlisi estadístic s'ha realitzant utilitzant el programa GraphPad Prism versió 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). La comparativa de les dades fenotípiques de formació de biofilm i activitat  $\beta$ -galactosidasa s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni.  $p < 0,05$  s'ha considerat significatiu.

### 3.19. Anàlisi bioinformàtic.

#### 3.19.1. Bases de dades.

Totes les seqüències utilitzades s'han obtingut de la base de dades NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i també s'ha utilitzat la cerca de seqüències i genomes complets a la web de Microbesonline (<http://www.microbesonline.org>).

#### 3.19.2. Anàlisi de gens i proteïnes.

Els següents programes bioinformàtics han permès una millor caracterització dels gens candidats i els seus subproductes proteics predits: Blastn, Blastp, PSI-BLAST I PFAM. Aquests algoritmes pertanyen al programa BLAST que ofereix el NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA), a través de la pàgina web d'Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). El programa

ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)) s'ha utilitzat pels alineaments múltiples de seqüències. Les comparatives entre genomes s'han visualitzat amb el format interactiu del programa Artemis ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)). Si no s'indica el contrari no s'han modificat els paràmetres predeterminats.

### **3.19.3. Altres programaris utilitzats.**

Els programes Oligo 6 ([www.oligo.net](http://www.oligo.net)) i Vector NT1® (Thermo Fisher Scientific Inc.), s'han utilitzat pel disseny de primers i representació esquemàtica dels plasmidis respectivament. El programa DNA Baser sequence assembler (Heracle BioSoft S.R.L), s'ha usat per l'acoblament de seqüències i anàlisi de les seqüències. L'eina MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) Versió 5 per a generar arbres filogenètics (Tamura, *et al.*, 2011). El programari Imaris (Bitplane AG, Schwitserland), per a generar simulacions a partir de l'acoblament d'imatges provinents del CLSM obtingudes a partir de les seccions a través del biofilm format.



## *Resultats i Discussió*

---



## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

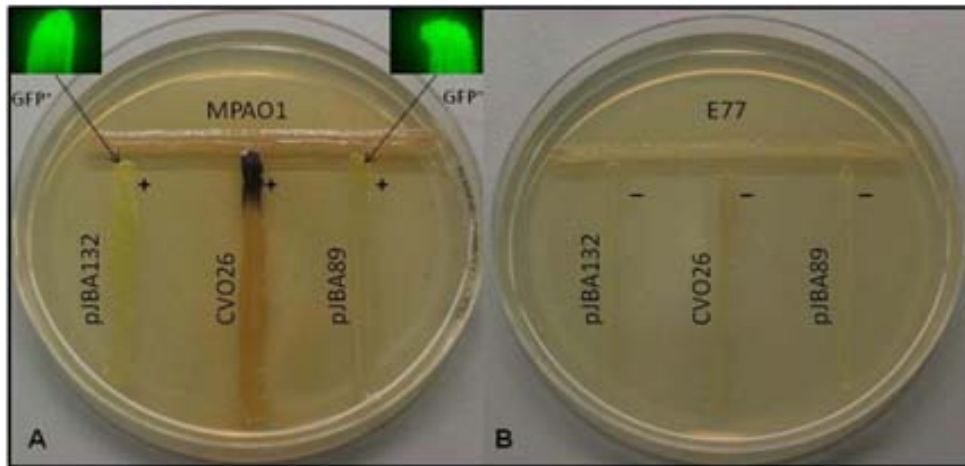
### 4.1. Detecció de molècules senyal del tipus AHL produïdes per soques clíniques de *S. maltophilia*.

Estudis previs, no han detectat que *S. maltophilia* sintetitzi AHLs a partir de bioassaigs realitzats en sembra en forma de "T", emprant les soques biosensores *C. violaceum* CV026 i *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Zhu, *et al.*, 2001, Veselova, *et al.*, 2003). En el present treball, per tal de detectar si *S. maltophilia* produeix molècules senyal del tipus AHLs, s'han escollit diferents soques biosensores i s'han realitzat diferents tipus de bioassaigs.

Diferents treballs demostren que, resultats negatius obtinguts a partir de bioassaigs en sembra en forma de "T", és a dir d'extractes crus de sobrenedant, no són prou determinants per a predir que la soca problema no produeixi AHLs (Cha, *et al.*, 1998, Laue, *et al.*, 2000, Niu, *et al.*, 2008). Són molts factors els que determinaran la detecció de les molècules senyals en la soca problema, com per exemple, el rang d'especificitat i la concentració mínima de detecció d'AHLs per part de la soca biosensora escollida, així com el tipus de bioassaig emprat. La quantitat d'AHLs produïdes per la soca problema en les diferents condicions de creixement, en les que s'estudia la producció *in vitro*, és un factor a tenir en compte per a una correcta detecció de molècules d'AHLs.

#### 4.1.1. Bioassaig en placa a partir de la sembra en forma de "T".

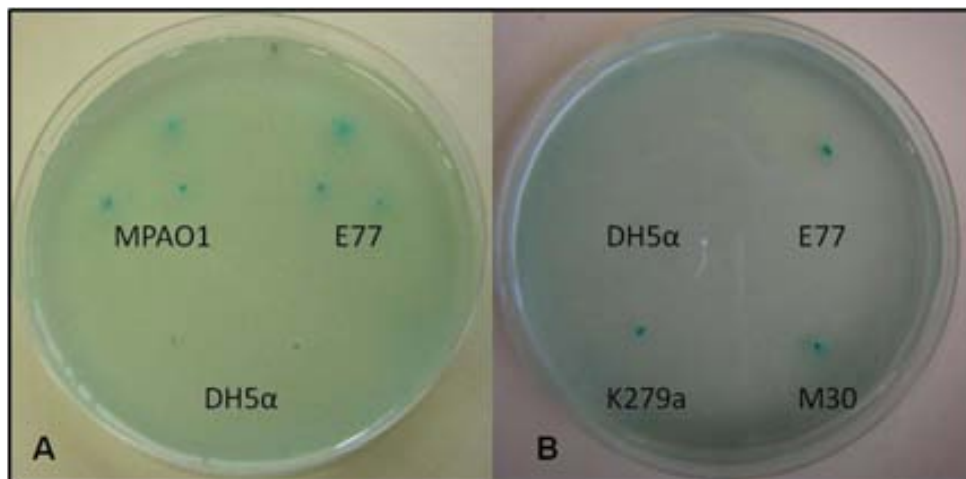
Quan les estries de tres soques clíniques de *S. maltophilia* (M30, E77 i K279a), s'enfronten amb les soques biosensores emprades en aquest tipus de tècnica, no es detecta la presència d'AHLs en les estries de *S. maltophilia* quan s'utilitzen les soques biosensores *C. violaceum* CV026 (McClean, *et al.*, 1997), *E. coli* MT102 (pJBA132) i *E. coli* JM015 (pJBA89) (Andersen, *et al.*, 2001), tal i com es mostra a la Figura 4.21-B. Els resultats obtinguts només es mostren per a la soca clínica de *S. maltophilia* E77 però es repeteixen per a les altres dues soques M30 i K279a. La soca de *P. aeruginosa* MPAO1 usada com a control positiu en aquest bioassaig sí estimula l'activitat *gfp*<sup>+</sup> de les soques d'*E. coli* i la producció de violaceïna en la soca *C. violaceum* CV026 (Figura 4.21-A).



**Figura 4.21.** Bioassaig en placa de LB a partir d'estries enfrontades mitjançant una "T" entre la soca a testar en l'estria horitzontal enfront de les tres soques biosensores: *E. coli* MT102 (pJBA132), *E. coli* JM105 (pJBA89) i *C. violaceum* CV026 disposades en paral·lel en les estries verticals. **A**, Soca control, *P. aeruginosa* MPAO1 (AHL<sup>+</sup>). **B**, Soca problema, *S. maltophilia* E77. Incubació durant 24h a 30 °C. Activitat *gfp*<sup>+</sup> detectada en per microscopi de fluorescència.

#### 4.1.2. Bioassaig en placa a partir de tip de colònia.

La soca biosensora ultrasensible d'*A. tumefaciens* KYC55, s'ha escollit per aquest treball perquè és la soca biosensora que hem trobat a la bibliografia amb major sensibilitat a baixes concentracions d'AHLs exògenes i variabilitat davant de un rang més ampli de molècules del tipus AHLs (Zhu, *et al.*, 2003). A la Figura 4.22, es mostra el bioassaig més senzill que es pot realitzar amb aquesta soca biosensora, el qual és positiu per les tres soques clíniques de *S. maltophilia* M30, E77 i K279a. S'han estudiat en paral·lel els controls positiu (*P. aeruginosa* MPAO1) i negatiu (*E. coli* DH5α).



**Figura 4.22.** Bioassaig en placa amb medi AT-agar tou i X-gal que conté en suspensió la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55. Tip de colònia de les diferents soques problema inoculades en les plaques **A** i **B**. Soques control: *P. aeruginosa* MPAO1 (AHL<sup>+</sup>) i *E. coli* DH5α (AHL<sup>-</sup>) i soques problema de *S. maltophilia* (E77, M30 i K279a). Incubació 24 h a 30 °C.

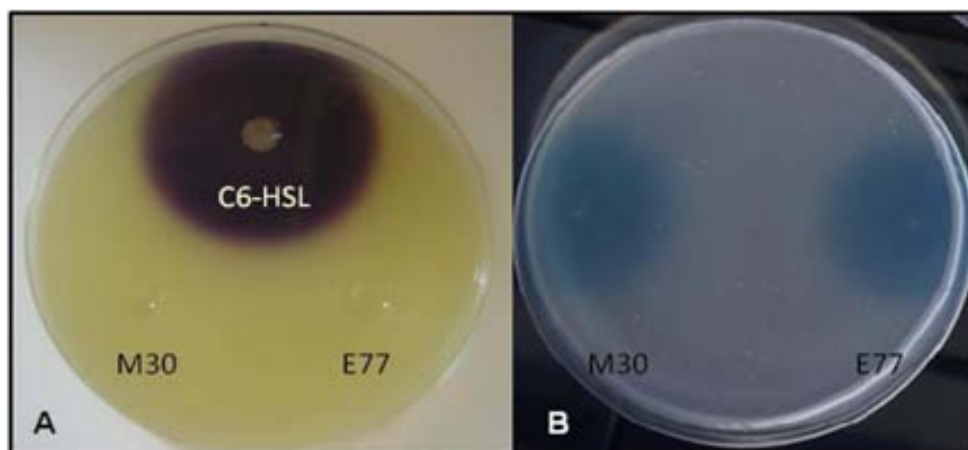


#### 4.1.3. Bioassaig en placa a partir de sobrenedants totals concentrats.

El bioassaig positiu a partir de colònia realitzat amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* KYC55 suggereix la presència d' AHLs en els sobrenedants de les diferents soques de *S. maltophilia* testades. Per tal de concentrar les possibles AHLs presents en els sobrenedants de *S. maltophilia* s'han realitzat extraccions de sobrenedants totals a partir de cultius de nit saturats de les soques clíniques M30 i E77. L'extracció de les molècules d' AHLs dels sobrenedants s'ha realitzat amb el solvent d'acetat d'etil i posteriorment s'han concentrat aquests en el rotavapor (Shaw, *et al.*, 1997).

A la Figura 4.23-A es mostra el bioassaig realitzat per a detectar AHLs de cadena curta en els sobrenedats concentrats de *S. maltophilia* extrets amb acetat d'etil, mitjançant la tècnica de doble capa de LB-agar tou amb la soca biosensora *C. violaceum* CV026. El bioassaig és negatiu per als sobrenedants concentrats de *S. maltophilia* M30 i E77. Com a control positiu s'ha utilitzat en aquesta placa la molècula sintètica C6-HSL (s'han dipositat 2 µl de la concentració *stock* 10 mM).

En canvi, els sobrenedants concentrats de *S. maltophilia* M30 i E77 són positius en el bioassaig realitzat amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* KYC55 (en placa de medi AT-agar tou i X-gal) tal i com es mostra a la Figura 4.23-B.



**Figura 4.23.** Bioassaig en placa a partir de dipositar sobrenedants concentrats extrets amb acetat d'etil de les soques problema de *S. maltophilia* (M30 i E77). **A**, Bioassaig en doble capa de LB-agar tou que conté suspensió de la soca biosensora *C. violaceum* CV026. 2 µl molècula sintètica C6-HSL (10 mM) dipositada com a control positiu. **B**, Bioassaig en placa de medi AT-agar tou i X-gal que conté suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55.

## 4.2. Separació del sobrenedant concentrat de *S. maltophilia* per HPLC.

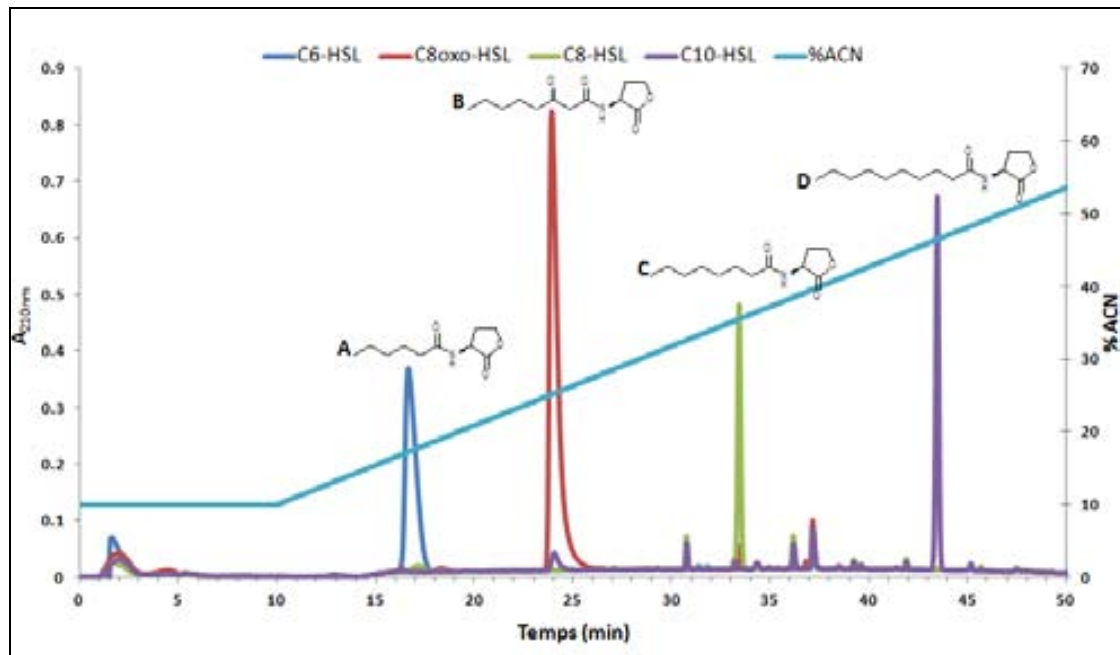
La separació cromatogràfica per HPLC dels sobrenedants concentrats de *S. maltophilia* M30 i E77 s'ha realitzat per tal de poder separar i purificar les AHLs presents en els sobrenedants d'aquestes soques, els quals en l'apartat anterior han donat resultats positius en bioassaig realitzats en placa. Aquesta metodologia s'ha descrit anteriorment per altres espècies bacterianes en nombrosos treballs (McClellan, *et al.*, 1997, Càmarà, *et al.*, 1998, Laue, *et al.*, 2000). Primerament s'han separat per HPLC diferents AHLs sintètiques per a poder usar-les com a patrons i conèixer els diferents temps de retenció en columna segons la seva polaritat.

Cadascuna de les fraccions obtingudes per HPLC a partir del fraccionament del sobrenedant concentrat, s'han assajat en bioassaig per tal de purificar les AHLs hipotètiques produïdes per *S. maltophilia*. Les fraccions de les AHLs purificades en el HPLC també s'ha assajat per bioassaig perquè ajuden a caracteritzar els temps de retenció de les diferents AHLs sintètiques estudiades.

### 4.2.1. Separació i purificació per HPLC de les AHLs sintètiques.

Els *stocks* de les AHLs sintètiques s'han analitzat a la columna de HPLC usant la columna C<sub>8</sub> de fase reversa mitjançant un gradient de 10-70% v/v de ACN en aigua Chromasolv® grau HPLC (Sigma), a una velocitat de flux de 1 mL/min a 210 nm durant 50 min, escollit com a temps de monitoratge.

Cada pic obtingut ens indicarà el temps de retenció de cadascuna de les molècules estudiades i permetrà estudiar la puresa de les mostres de les AHLs sintètiques. Aquestes han estat la C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL. La concentració injectada a la columna ha estat de 20 µl de la concentració *stock* 10 mM. A la Figura 4.24, es pot observar els diferents pics corresponents a les diferents AHLs injectades. Tal i com s'esperava, les molècules amb cadena acil més llarga, tenen temps de retenció més llargs a la columna ja que són més hidrofòbiques que les de cadena curta. Amb els cromatogrames obtinguts de les AHLs sintètiques ens asseguren que aquesta metodologia és adient per a separar les AHLs hipotètiques que pugui haver en el sobrenedant de *S. maltophilia*.

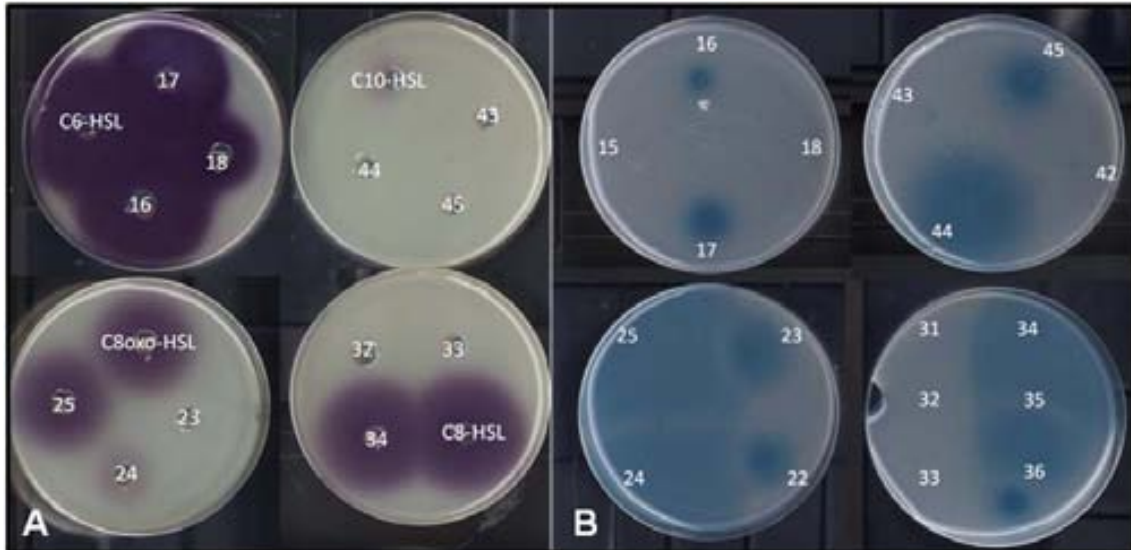


**Figura 4.24.** Cromatogrames de HPLC de diferents AHLs sintètiques estudiades utilitzant una columna C<sub>8</sub> de fase reversa amb un gradient de ACN (10-70% v/v) durant 60 min. **A**, C6-HSL; **B**, C8oxo-HSL; **C**, C8-HSL; **D**, C10-HSL.

#### 4.2.1.1. Bioassaigs de les fraccions de HPLC provinents de les AHLs sintètiques.

Les fraccions properes als pics per cadascuna de les AHLs sintètiques injectades a la columna de HPLC s'han estudiat amb les soques biosensores *C. violaceum* CV026 (Figura 4.25-A) i *A. tumefaciens* KYC55 (Figura 4.25-B), realitzant bioassaigs en placa tal i com s'ha explicat anteriorment a l'apartat de Materials i Mètodes 3.3. Es pot observar com totes dues soques biosensores detecten les AHLs presents a les fraccions corresponents als pics de les AHLs sintètiques C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL. En aquesta mateixa figura també s'observa que la soca biosensora *C. violaceum* CV026 detecta molt feblement les fraccions provinents de la cromatografia realitzada amb la molècula C10-HSL i que la molècula que més detecta és la molècula C6-HSL (sent positives totes les fraccions properes al pic). Això és degut al fet que aquesta soca biosensora és adient per a la detecció d'AHLs de cadena curta com ja s'ha explicat anteriorment.

Podem determinar doncs que per aquest tipus de cromatografia els temps de retenció per les AHLs sintètiques estudiades es corresponen als temps (minuts) 16 i 17 per l'AHL del tipus C6-HSL, temps 24 i 25 per l'AHL del tipus C8oxo-HSL, temps 34 i 35 per l'AHL del tipus C8-HSL i temps 44 i 45 per l'AHL del tipus C10-HSL.

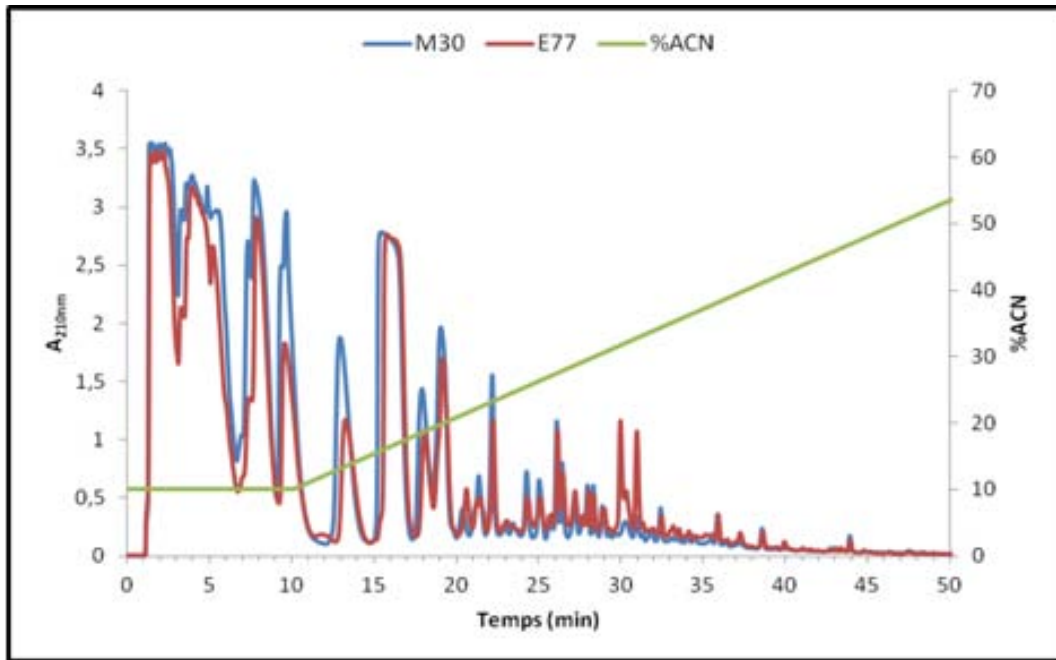


**Figura 4.25.** Bioassaigs de les fraccions recollides per HPLC per cadascuna de les AHLs sintètiques. S'han examinat les fraccions corresponents als pics. S'ha utilitzat com a soques biosensores *C. violaceum* CV026 (A) i *A. tumefaciens* KYC55 (B). Incubació de les plaques 24 h a 30 °C en medi LB i AT respectivament.

#### 4.2.2. Separació dels sobrenedants concentrats de *S. maltophilia* i purificació de les AHLs presents per HPLC.

Per tal de caracteritzar les possibles molècules d'AHLs presents en els sobrenedants de les soques clíniques de *S. maltophilia* M30 i E77, s'han separat per HPLC els sobrenedants concentrats extrets amb acetat d'etil. Aquests s'han separat tal i com s'ha descrit per les AHLs sintètiques, és a dir, s'ha utilitzat la mateixa columna i condicions de gradient i temps de monitoratge.

A la Figura 4.26 es mostren els cromatogrames obtinguts de la separació per HPLC dels sobrenedants concentrats de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77. El fraccionament permet separar del sobrenedant total les possibles AHLs que pugui haver-hi en el global de molècules extretes amb acetat d'etil i purificar en una o varies fraccions les diferents AHLs produïdes per la soca problema.



**Figura 4.26.** Cromatogrames de HPLC dels sobrenedants concentrats extrets amb acetat d'etil de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77 utilitzant una columna C<sub>8</sub> de fase reversa en un gradient de ACN (10-70 % v/v). S'han recollit 50 fraccions d'1 mL corresponents amb els 50 min.

#### 4.2.2.1. Bioassaigs de les fraccions de HPLC provinents dels sobrenedants de *S. maltophilia*.

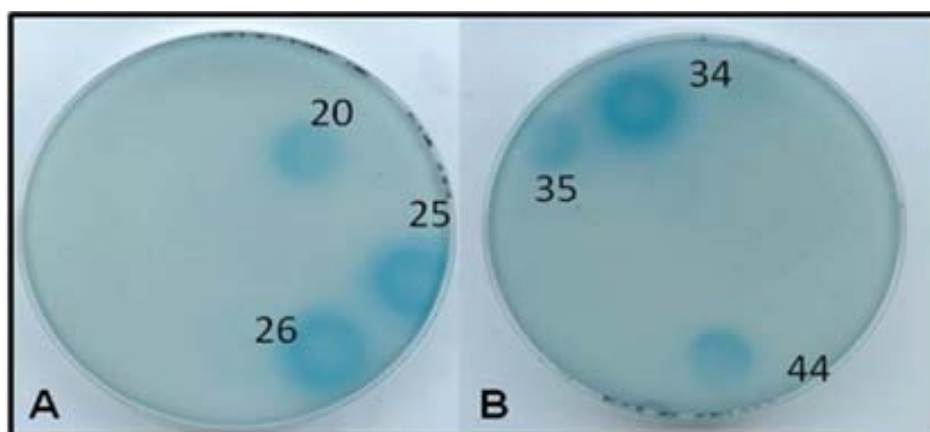
Un cop separats els sobrenedants de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77, les 50 fraccions recollides per HPLC han estat concentrades 10 cops per tal de ser testades en placa de bioassaig amb l'objectiu de poder separar i purificar les AHLs que pugui contenir el sobrenedant concentrat de *S. maltophilia*. A la Figura 4.27, es mostren les fraccions positives obtingudes del sobrenedant concentrat de la soca E77 a partir dels bioassaig realitzats en placa de medi AT-agar tou i X-gal que conté suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55. Com es pot observar hi ha sis fraccions que activen la soca biosensora originant un halo blau en el lloc on s'ha dipositat la mostra. Això ens suggereix que hi ha diferents tipus d'AHLs en els sobrenedants extrets.

Gràcies a que s'han estudiat les AHLs sintètiques en les mateixes condicions de cromatografia i bioassaig s'han pogut comparar els temps de retenció obtinguts de les fraccions positives dels sobrenedants de *S. maltophilia* E77 o M30 amb les de les AHLs sintètiques (patrons). Sembla doncs que en el sobrenedant de *S. maltophilia* E77, conté fraccions positives que es corresponen amb els temps de retenció anteriorment estudiats per les AHLs sintètiques corresponents a les molècules: C8oxo-HSL (fraccions 25 i 26), C8-HSL (fraccions 34 i 35) i C10-HSL (fracció 44). La fracció 20 positiva en el bioassaig no la podem

atribuir a cap tipus d'AHL perquè no tenim cap referència patró que ens indiqui quina podria ser.

En aquest treball només es mostren els resultats obtinguts per a la soca E77 però també s'han realitzat els mateixos bioassaigs per a la soca M30 obtenint els mateixos resultats (resultats no mostrats). Tampoc no es mostren els resultats negatius obtinguts a partir dels bioassaigs realitzats amb la soca biosensora *C. violaceum* CV026 de totes les fraccions assajades provinents dels sobrenedants de *S. maltophilia* M30 i E77.

Cada vegada que s'ha fet una cromatografia s'ha realitzat amb anterioritat un control negatiu de HPLC injectant a la columna aigua Chromasolv® grau HPLC en comptes de mostra. S'han realitzat bioassaigs de totes les fraccions recollides i concentrades d'aquest control. Els resultats obtinguts han estat negatius tal i com s'esperava per a totes les fraccions en ambdues soques biosensores.



**Figura 4.27.** Bioassaigs en medi AT realitzats amb la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 de les fraccions (1-50) recollides per HPLC del sobrenedant concentrat de *S. maltophilia* E77 extret amb acetat d'etil. A les figures A i B s'indiquen només les diferents fraccions positives corresponents als diferents temps de retenció on s'han separat les AHLs hipotètiques presents en els sobrenedants de *S. maltophilia*. Incubació de les plaques 24 h a 30 °C.

### **4.3. Caracterització de les AHLs presents en els sobrenedants de *S. maltophilia* per CCF.**

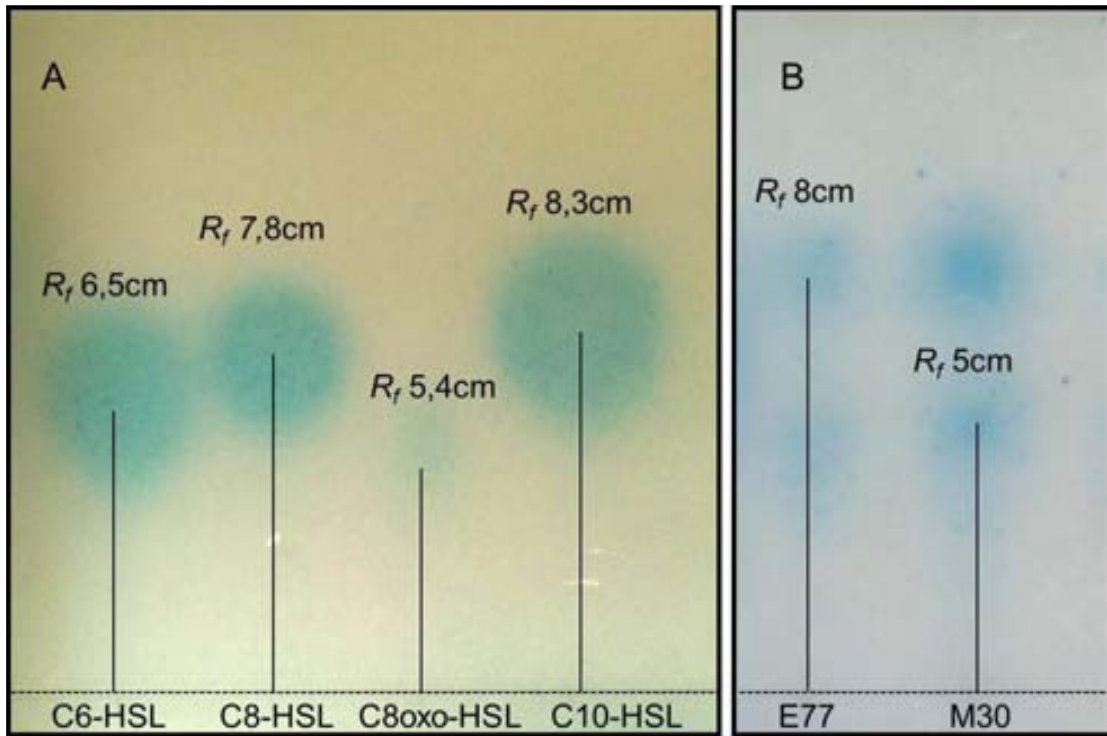
Les cromatografies de capa fina realitzades sobre diferents suports, ens han permès detectar les diferents molècules d'AHLs presents en els sobrenedants concentrats de *S. maltophilia* i en les fraccions positives provinents del HPLC. En funció de la migració que han sofert al llarg de la capa fina, hem pogut comparar els seus valors  $R_f$  amb els que hem obtingut paral·lelament de les AHLs sintètiques o patrons. La capa de bioassaig que es diposita sobre la

capa fina, s'ha fet amb la soca biosensora ultrasensible *A. tumefaciens* KYC55, la qual ha permès detectar les AHLs presents en els sobrenedants i fraccions de HPLC provinents de *S. maltophilia* en els bioassaigs mostrats anteriorment. La separació per CCF permet fer una caracterització preliminar de les AHLs hipotètiques produïdes per aquest bacteri (McClellan, *et al.*, 1997, Shaw, *et al.*, 1997, Laue, *et al.*, 2000).

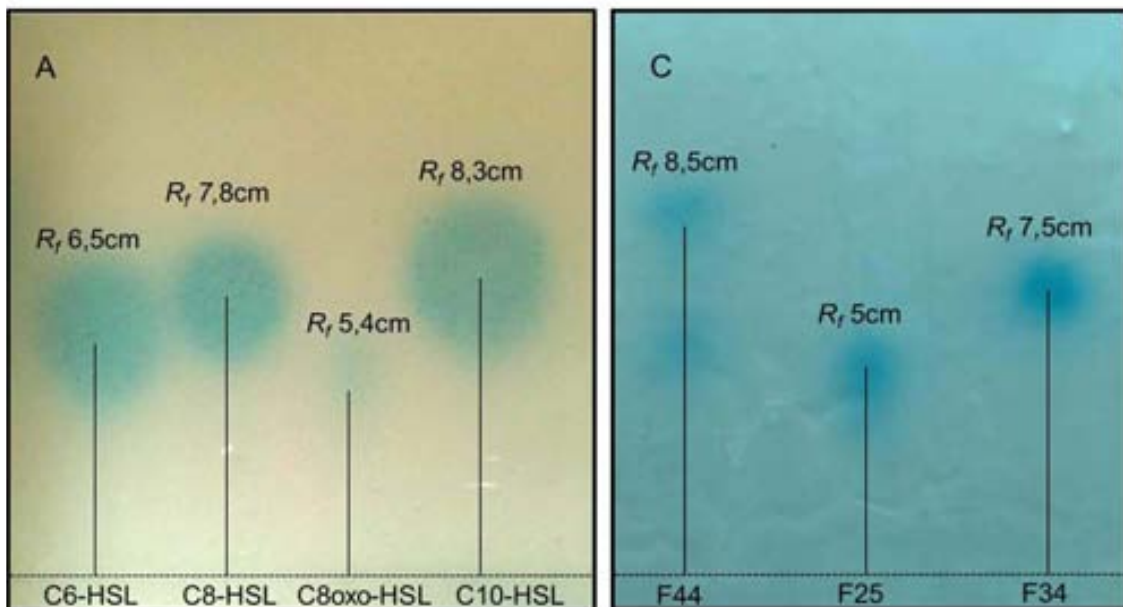
#### **4.3.1. CCF dels sobrenedants totals concentrats de *S. maltophilia* i fraccions positives HPLC amb suport de *Silica gel* 60.**

La CCF realitzada sobre el suport de *Silica gel* 60 emprant per a la cromatografia el solvent d'acetona-hexà (55:45, v/v), ha fet evident la presència de diferents taques en cadascun dels carrils on s'han estudiat els sobrenedants de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77. A la Figura 4.28-A, es poden observar els  $R_f$  de les AHLs sintètiques que s'han usat com a patrons en aquest treball i que ens serveixen per comparar-los amb els sobrenedants concentrats totals extrets de les soques de *S. maltophilia*. A priori, en les cromatografies dels sobrenedants totals de *S. maltophilia* M30 i E77 (Figura 4.28-B), s'han detectat dues taques diferenciades que es poden assignar a possibles molècules d'AHLs del tipus C8oxo-HSL i C8-HSL o C10-HSL tenint en compte els  $R_f$  de les AHLs sintètiques

A la Figura 4.29-C, observem el mateix tipus de cromatografia realitzada amb les fraccions positives de *S. maltophilia* E77 provinents del HPLC (F25, F34 i F44) les quals coincideixen amb els temps de retenció de les AHLs sintètiques C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL respectivament. Els  $R_f$  obtinguts per les fraccions són molt semblants als  $R_f$  esperats quan els comparem amb les AHLs sintètiques corroborant doncs la caracterització preliminar per HPLC i CCF de les AHLs presents en el sobrenedant de *S. maltophilia* E77.



**Figura 4.28.** CCF dels tipus *Silica gel* 60. AHLs sintètiques (A) i sobrenedants concentrats de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77 (B) són separats mitjançant la capa fina i el solvent orgànic d'acetona/hexà (55:45, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30°C.

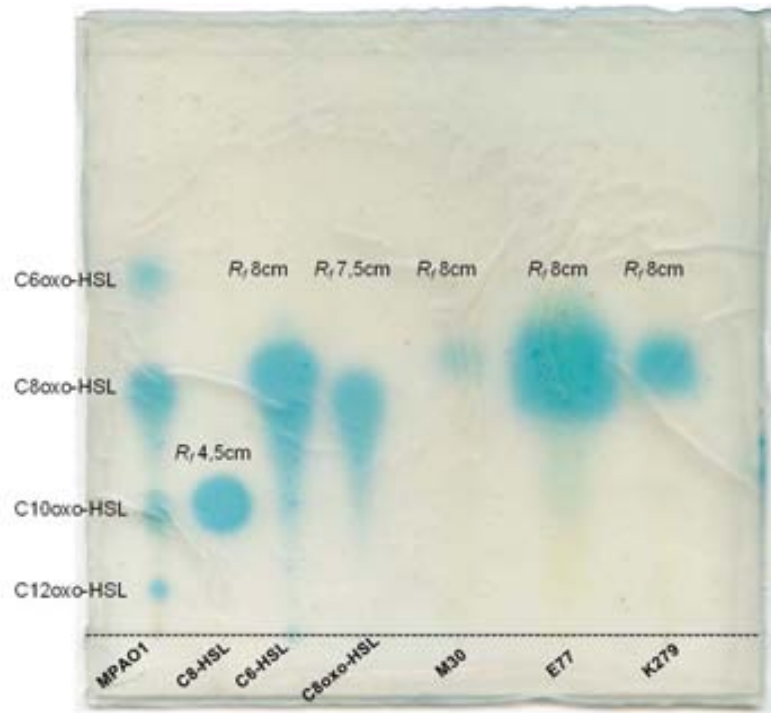


**Figura 4.29.** CCF dels tipus *Silica gel* 60. AHLs sintètiques (A) i fraccions positives obtingudes en HPLC dels sobrenedants concentrats de la soca de *S. maltophilia* E77 (C) són separades mitjançant la capa fina i el solvent orgànic d'acetona/hexà (55:45, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30 °C.



#### 4.3.2. CCF dels sobrenedants totals concentrats de *S. maltophilia* amb suport de C<sub>18</sub> de fase reversa.

La CCF realitzada sobre suport C<sub>18</sub> de fase reversa i solvent metanol-aigua (60:40, v/v), ha fet evident la presència d'AHLS en els sobrenedants extrets amb acetat d'etil de les soques de *S. maltophilia* M30, E77 i K279a (vegeu la Figura 4.30). En aquesta CCF, com a patrons s'han dipositat les AHLs sintètiques C6-HSL, C8oxo-HSL i C8-HSL així com el sobrenedant extret amb acetat d'etil de la soca de *P. aeruginosa* MPAO1 que presenta diferents taques perquè produeix diferents tipus d'AHLS (Shaw, *et al.*, 1997). En aquest tipus de cromatografia no s'observen varies taques en els carrils de *S. maltophilia* com en el suport de *Silica gel* 60. També veiem que el sobrenedant de *S. maltophilia* que dona més senyal es correspon amb la soca E77 seguit de la K279a i M30 tot i que les tres taques presenten el mateix  $R_f$  que es correspondria entre els temps de retenció de la C6-HSL o la C8oxo-HSL.

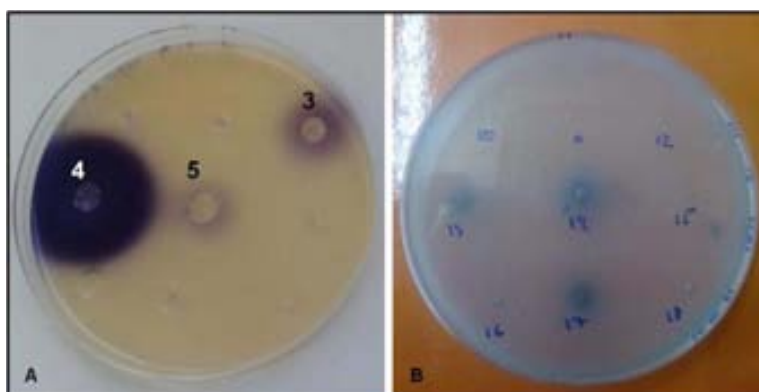


**Figura 4.30.** CCF dels tipus C<sub>18</sub> de fase reversa. Sobrenedants concentrats de les soques de *P. aeruginosa* MPAO1 i *S. maltophilia* M30, E77 i K279a i AHLs sintètiques són separats mitjançant la capa fina i el solvent orgànic de metanol /aigua (60:40, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30 °C.

Tot i que normalment només s'indica que *P. aeruginosa* produeix les molècules d'AHLS del tipus C4-HSL i C12oxo-HSL, les quals van ser les primeres AHLs descrites i caracteritzades en aquesta espècie (Pearson, *et al.*, 1994, Pearson, *et al.*, 1995), també s'han detectat en el sobrenedant d'aquesta espècie les molècules C6-HSL, C6oxo-HSL, C8oxo-HSL i C10oxo-HSL

(Winson, *et al.*, 1995, Shaw, *et al.*, 1997, Erickson, *et al.*, 2002). A la CCF de la Figura 4.30, es pot observar que amb la metodologia d'extracció i detecció de molècules d'AHLs emprades en aquest treball podem detectar quatre de les sis AHLs diferents descrites en *P. aeruginosa* fet que indica que la metodologia és molt robusta. Mitjançant la soca d'*A. tumefaciens* KYC55 corroborarem els resultats mostrats per Shaw, *et al.*, (1997) on detectem per CCF i amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* NT1 les mateixes AHLs en el sobrenedant de la soca de *P. aeruginosa* MPAO1.

Les úniques AHLs que no s'han detectat en el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 per CCF són les corresponents a les molècules C6-HSL i C4-HSL. La C6-HSL probablement no la diferenciem de la C8oxo-HSL a la CCF perquè els  $R_f$  d'aquestes molècules en la CCF  $C_{18}$  de fase reversa són molt semblants. Pel que fa a la molècula C4-HSL no es detecta amb la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55, degut que aquesta soca biosensora no detecta AHLs de cadena inferior a sis carbonis. A continuació (Figura 4.31-A), mostrem els bioassais realitzats amb les fraccions del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 provinents de HPLC corresponents als temps de retenció entre 1 i 9 emprant la soca *C. violaceum* CV026. Les fraccions 3, 4 i 5 del sobrenedant separat de *P. aeruginosa* MPAO1 són positives en aquest bioassaig, les quals es corresponen amb el mateix temps de retenció que la molècula C4-HSL sintètica separada per HPLC seguint la metodologia anteriorment esmentada (dades no mostrades). També es mostren les fraccions (de la 10 a la 18), provinents de la separació per HPLC del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1, les quals s'assagen amb *A. tumefaciens* KYC55 per a la detecció de la molècula C6oxo-HSL (Fracció 13 i 14) i C6-HSL (Fracció 17). Vegeu Figura 4.31-B.

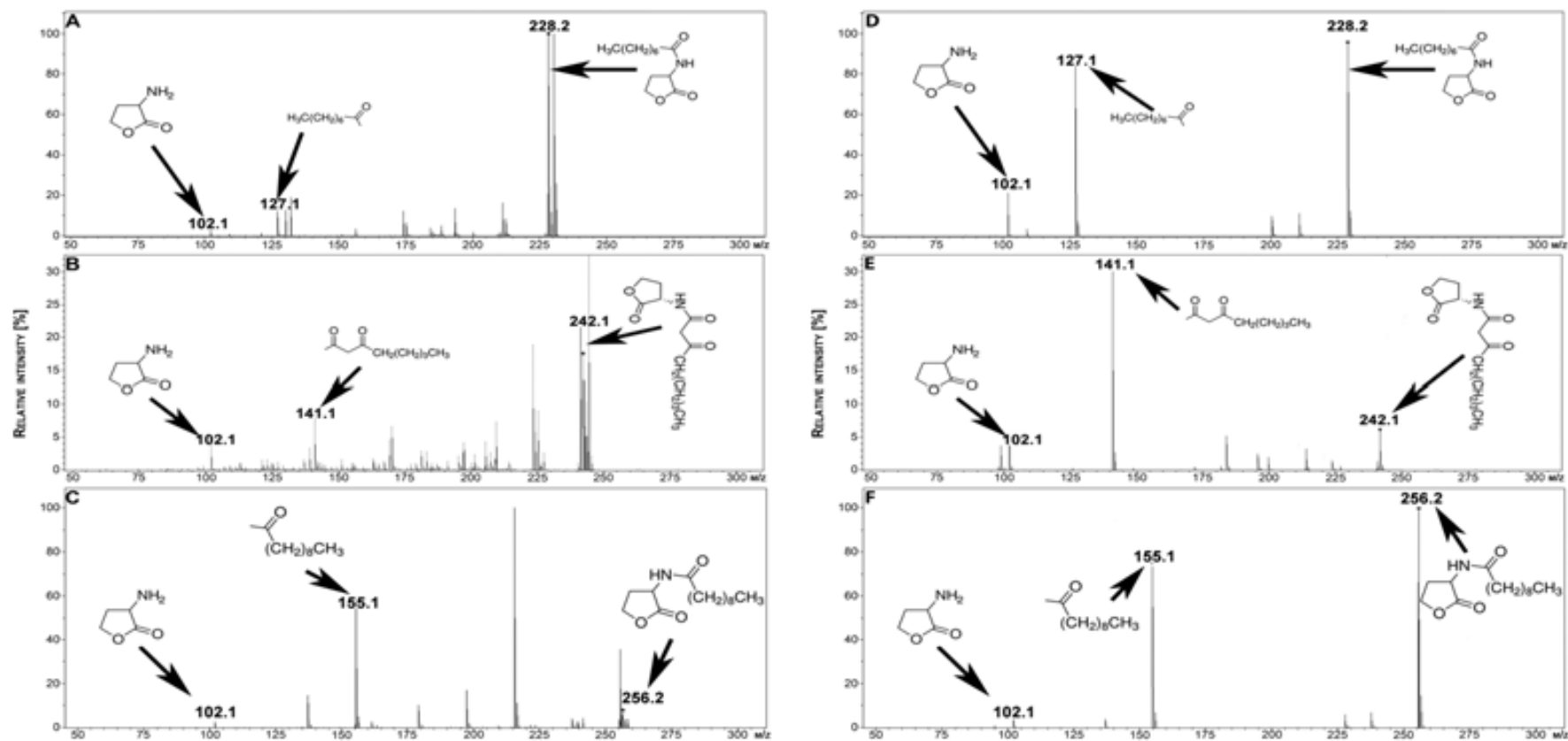


**Figura 4.31.** Bioassaig de les fraccions del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 separat per HPLC. **A**, en doble capa de LB-agar tou que conté suspensió de la soca biosensora *C. violaceum* CV026 on s'han assajat les fraccions de la 1-9. **B**, en medi AT que conté la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 on s'han assajat les fraccions de la 10-18. Les fraccions positives 3, 4 i 5 es corresponen amb el mateix temps de retenció que la molècula sintètica C4-HSL, les fraccions 13 i 14 a la molècula C6oxo-HSL i la fracció 17 a la molècula sintètica C6-HSL. Incubació de les plaques 24 h a 30 °C.

#### 4.4. Caracterització de les AHLs presents en els sobrenedants de *S. maltophilia* E77 per MS/MS.

L'espectrometria de masses en ha permès caracteritzar les molècules d'AHLs prèviament separades i purificades per HPLC a partir de l'anàlisi de les fraccions positives en bioassaig provinents del sobrenedant de la soca *S. maltophilia* E77. Diferents metodologies realitzades en aquest treball de separació, purificació i detecció per bioassaig, han posat de manifest que cadascuna d'aquestes fraccions podria contenir una molècula d'AHLs diferent tal i com s'ha estudiat en els apartats anteriors. Mitjançant l'espectrometria de masses hem pogut comparar els espectres obtinguts de les AHLs sintètiques o patrons amb els de les fraccions positives provinents de sobrenedants separats per HPLC de *S. maltophilia* E77. En cadascun dels patrons i fraccions de HPLC s'han buscat les masses/càrregues dels ions esperats, és a dir, corresponents a 228.00-228.30 Da per la C8-HSL (F34); 242.00-242.30 Da per la C8oxo-HSL (F25) i 256.00-256.30 Da per la C10-HSL (F44). Per corroborar que aquest ió corresponia a la massa teòrica de l'AHL esperada, s'han fraccionat aquests ions per tal d'observar si els patrons de fragmentació eren els esperats, és a dir, per cada molècula d'AHL s'esperava trobar els pics corresponents a l'ió 102.1  $m/z$  per l'anell homoserina lactona i als ions de les cadenes acil corresponents a 127.2  $m/z$  per la C8-HSL, 141.2  $m/z$  per la C8oxo-HSL i 155.2  $m/z$ , per la C10-HSL (McClean, *et al.*, 1997, Laue, *et al.*, 2000, Gould, *et al.*, 2006, Niu, *et al.*, 2008). A la Figura 4.32 es pot observar a la columna de l'esquerra (A,B,C) els espectres obtinguts per les molècules AHLs sintètiques. Sobre els espectres de la figura s'han assenyalat amb fletxes els ions pare esmentats anteriorment i els ions obtinguts un cop s'ha fragmentat aquest, així com l'esquema de la molècula que es correspon amb cada massa/càrrega. El mateix podem observar a la Figura 4.32 (D,E,F) en els espectres obtinguts a partir de les fraccions positives de *S. maltophilia* E77 que corroboren la presència de les molècules C8-HSL, C8oxo-HSL i C10-HSL presents en el sobrenedant d'aquesta soca.

## Resultats i Discussió



**Figura 4.32.** Espectres de MS/MS de les AHLs sintètiques i les fraccions positives de la soca *S. maltophilia* E77 amb el mateix temps de retenció que les AHLs sintètiques en la cromatografia HPLC. Les fletxes indiquen l'ió pare i els fragments obtinguts al col·lisionar aquest (corresponents a la fracció HSL (102) constant per a totes les molècules AHLs i la cadena acil). **A**, **B** i **C** es corresponen a les molècules sintètiques C8-HSL, C8oxo-HSL, and C10-HSL respectivament. **D**, **E** i **F** corresponen a les fraccions F34, F25 i F44 respectivament.

## 4.5. Anàlisi *in silico* de les proteïnes implicades en el sistema de *quorum sensing* regulat per les AHLs en *S. maltophilia*.

### 4.5.1. Conservació i característiques de la proteïna reguladora LuxR en *S. maltophilia*.

Un cop demostrat que *S. maltophilia* produeix molècules d'AHLs ens hem proposat descobrir els gens involucrats en la síntesis (proteïnes sintases) i recepció (proteïnes del tipus LuxR) d'aquestes molècules autoinductores.

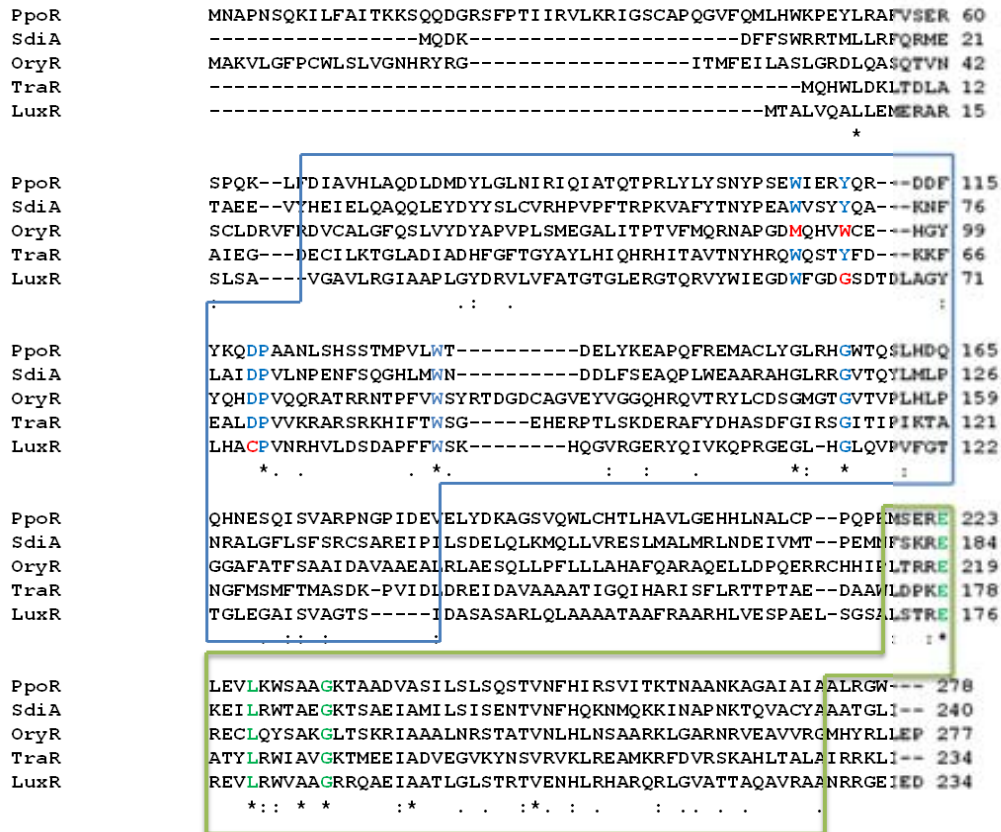
Les proteïnes del tipus LuxR presenten dos dominis funcionals, un d'unió a la molècula d'AHL i l'altre d'unió al DNA. La proteïna anotada com a LuxR en la soca de *S. maltophilia* K279a amb ORF *smlt1839*, presenta els dominis característics de qualsevol proteïna del tipus LuxR amb els dominis d'unió a AHL en l'extrem N-terminal (PFAM 03472) i el domini HTH d'unió al DNA en l'extrem C-terminal (PFAM 001196).

La conservació de l'estructura primària entre les proteïnes del tipus LuxR és molt baixa (18 %-25 %). Malgrat això, els múltiples alineaments realitzats entre el regulador TraR d'*A. tumefaciens* amb altres reguladors del tipus LuxR revelen que hi ha nou residus o aminoàcids idèntics que es conserven en un 95 % entre totes les proteïnes del tipus LuxR (Covaceuszach, *et al.*, 2013). Sis d'aquests residus es troben en el domini d'unió a AHL (N-terminal) i els altres tres en el domini d'unió al DNA (C-terminal). El domini d'unió al DNA és altament conservat entre les proteïnes del tipus LuxR mentre que el domini d'unió a AHLs varia en algunes proteïnes segurament per acomodar-se a la varietat de molècules autoinductores (Whitehead, *et al.*, 2001, Zhang, *et al.*, 2002).

Els sis residus conservats del domini d'unió a les AHL són hidrofòbics o aromàtics i formen una cavitat que permet la unió de les AHLs. Aquests són, en funció de la posició en el regulador TraR, triptòfan 57 (W<sub>57</sub>), tirosina 61 (Y<sub>61</sub>), asparagina 70 (D<sub>70</sub>), prolina 71 (P<sub>71</sub>), triptòfan 85 (W<sub>85</sub>) i glicina 113 (G<sub>113</sub>). Els tres residus conservats en el domini d'unió al DNA són, glutamina 178 (E<sub>178</sub>), leucina 182 (L<sub>182</sub>) i glicina 188 (G<sub>188</sub>).

A la Figura 4.33, es mostren els residus conservats en aquests dos dominis del regulador del tipus LuxR de *S. maltophilia* K279a i es comparen amb altres reguladors del tipus LuxR amb tots o quasi tots els residus conservats. Per a l'alineament s'han escollit el regulador TraR d'*A. tumefaciens* com a regulador amb tots els dominis conservats. La resta de reguladors són LuxR "solos", dels quals s'ha escollit per l'alineament dos que s'ha demostrat que s'uneixen a

AHLs com ara PpoR de *P. putida* (Subramoni & Venturi, 2009) i SdiA de *S. enterica* (Michael, *et al.*, 2001). A més a més s’ha afegit a l’alineament el regulador OryR de *Xanthomonas* spp., que tot i conservar el domini d’unió a AHL, s’ha vist que no s’uneix ni respon a les molècules d’AHLs (Ferluga, *et al.*, 2007).



**Figura 4.33.** Alineament múltiple de seqüències de reguladors del tipus LuxR realitzat amb el programa ClustalW2. Les proteïnes usades per l’alineament són PpoR de *P. putida*, SdiA de *S. enterica*, OryR de *Xanthomonas* spp, TraR d’*A. tumefaciens* i LuxR de *S. maltophilia* K279a. Amb un requadre blau està indicat el domini d’unió a AHL (16-137 aminoàcids; PFAM 03472) i amb un requadre verd el domini d’unió al DNA (172-228 aminoàcids; PFAM 001196) de la proteïna LuxR de *S. maltophilia* K279a. Els aminoàcids conservats en cada domini estan marcats del color blau (en el domini d’unió a AHL) i en verd (en el domini d’unió al DNA). En vermell estan marcats els aminoàcids no conservats en OryR i LuxR en el domini d’unió a les AHLs.

Com es pot veure a la Figura 4.33, el regulador LuxR de *S. maltophilia* K279a i el OryR de *Xanthomonas* spp varien en dos dels sis residus conservats en el domini d’unió a les AHLs, mentre que els tres residus en el domini d’unió al DNA són conservats en els cinc reguladors estudiats en l’alineament.

El regulador “solo” OryR forma part d’un subgrup de LuxR “solo” anomenat PAB, *Plant Associated Bacteria*, que es caracteritzen per associar-se en plantes (ja sigui de forma simbiòtica o patògena) i que responen a compostos derivats d’aquestes. Destacar que aquets LuxR “solo”

es caracteritzen per tenir un o dos residus no conservats en el domini d'unió a les AHLs, que es creu que els podria ajudar a la unió específica a molècules senyals eucariotes. Aquests dos residus es localitzen a les posicions W<sub>57</sub> i Y<sub>67</sub> (respecte el regulador TraR), els quals han sofert les substitucions pels residus de la metionina (M) o triptòfan (W) respectivament (marcats en vermell en l'alineament). S'hipotetitzava que aquests canvis han permès a aquestes proteïnes unir-se a senyals provinents de plantes. Aquest subgrup inclou els reguladors XccR de *Xcc*, OryR de *X. oryzae*, PsoR de *P. fluorescens*, XagR de *Xanthomonas axonopodis* i NesR de *Sinorhizobium meliloti*, que inclou importants patògens de plantes (Covaceuszach, *et al.*, 2013, Gonzalez & Venturi, 2013).

El LuxR de *S. maltophilia* K279a, tot i que presenta dos residus diferents respecte el TraR, no comparteixen les diferències amb el subgrup esmentat anteriorment, sinó que varien els residus de les posicions de Y<sub>61</sub> i D<sub>70</sub> pels residus de glicina (G) i cisteïna (C) respectivament (marcats en vermell en l'alineament). La llargada de les proteïnes del tipus LuxR sol ésser de 250 aminoàcids aproximadament. En aquest alineament podem veure que el regulador LuxR de *S. maltophilia* K279a té una llargada similar als reguladors TraR i SdiA mentre que el regulador OryR és de major llargada.

Tal i com es mostra a la Taula 4.12, no s'ha trobat en el genoma de *S. maltophilia* K279a cap altra proteïna anotada com a LuxR amb els 2 dominis conservats.

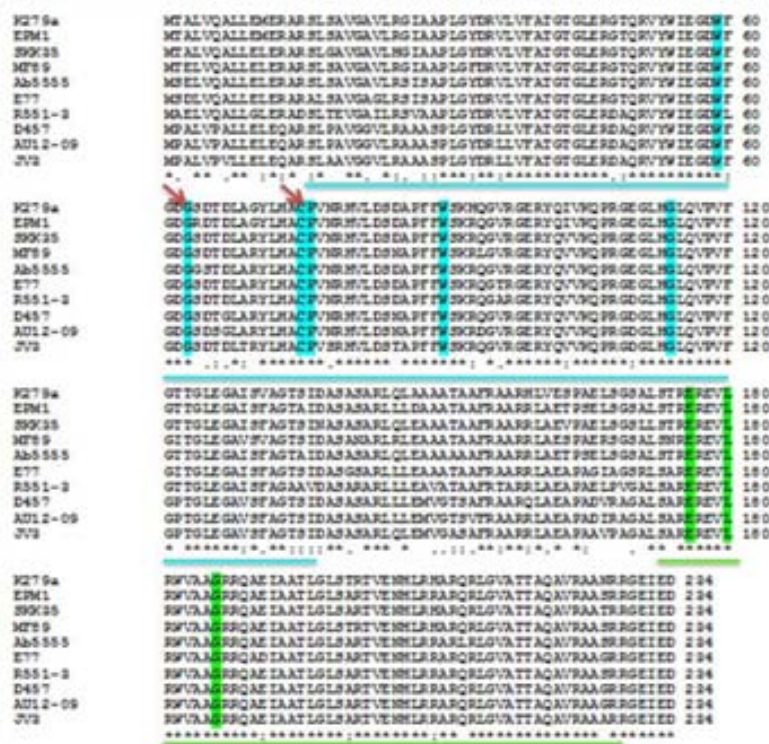
**Taula 4.12.** Proteïnes hipotètiques anotades com a possibles LuxR en el genoma de *S. maltophilia* K279a.

LuxR hipotètics en <i>S. maltophilia</i> K279a	N-terminal-Domini d'unió a AHL		C-terminal-Domini d'unió al DNA	
	Domini d'unió a AHL	Nombre residus conservats /6 totals*	Domini d'unió al DNA	Nombre residus conservats/3 totals*
Smlt1839	+	4/6	+	3/3
Smlt0195	-	2/6	+	3/3
Smlt0389	-	1/6	+	3/3
Smlt2299	-	1/6	+	2/3
Smlt2366	-	2/6	+	3/3
Smlt4224	-	1/6	+	3/3
Smlt0367	-	1/6	+	3/3
Smlt0400	-	1/6	+	3/3
Smlt0881	-	1/6	+	3/3
Smlt1255	-	1/6	+	3/3
Smlt1788	-	1/6	+	2/3
Smlt2595	-	1/6	+	2/3
Smlt2658	-	1/6	+	2/3
Smlt2891	-	1/6	+	3/3
Smlt4624	-	1/6	+	2/3

\*els valors 6 i 3 signifiquen el nombre de residus/aa totals conservats del regulador LuxR en el domini N- i C-terminal respectivament.

En l'alineament realitzat amb el programa ClustalW2 (Figura 4.34), es pot observar que la proteïna LuxR es conserva amb elevada similitud en tots els genomes seqüenciats de *S. maltophilia* inclosa la soca d'estudi E77. Això podria indicar la importància i rol que aquest regulador jugaria en aquesta espècie i que podria estar relacionat amb la detecció de compostos senyals intracel·lulars o intercel·lulars com ara les AHLs.

D'altra banda es pot apreciar que presenten els mateixos residus conservats en els dominis d'unió a AHL i DNA i es mantenen els dos aminoàcids diferents en el domini d'unió a AHL respecte el regulador TraR (marcats amb una fletxa vermella). La presència d'almenys quatre dels sis residus conservats en el domini d'unió a AHL, ens fa pensar la possibilitat que aquest regulador pugui unir-se a les molècules senyal d'AHL tal i com es descriuen Patankar i Gonzalez (2009) per altres reguladors homòlegs.



**Figura 4.34.** Alineament múltiple de seqüències de reguladors del tipus LuxR ortòlegs entre els genomes seqüenciats de diferents soques de *S. maltophilia* realitzat amb el programa ClustalW2. Amb una línia blava està indicat el domini d'unió a AHL (16-137 aminoàcids; PFAM 03472) i amb una línia verda el domini d'unió al DNA (172-228 aminoàcids; PFAM 001196) de la proteïna LuxR de *S. maltophilia*. Els aminoàcids conservats entre les soques de *S. maltophilia* en cada domini estan marcats en color blau (sis en el domini d'unió a AHL) i en verd (tres en el domini d'unió al DNA). Amb un fletxa vermella estan marcats els dos aminoàcids no conservats amb el regulador TraR de *A. tumefaciens*.

A l'alineament també podem observar que la regió menys conservada entre els reguladors LuxR ortòlegs de *S. maltophilia* és la part central que no es correspon amb cap dels dos dominis els quals són altament conservats.



En aquest treball ens hem centrat en l'estudi del regulador LuxR en la soca clínica de *S. maltophilia* E77. Cal remarcar que la seqüenciació d'aquest gen i el seu entorn genòmic s'ha realitzat a partir de l'amplicó clonat en el plasmidi pBBR1MCS-5 Amplicó E77.

Els autors Gray i Garey (2001) van estudiar l'evolució dels reguladors LuxI/R a partir de l'anàlisi filogenètic de 76 homòlegs del tipus LuxI/R de diversos membres gram negatius proteobacteris (classes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -). Es van adonar que tots els reguladors presenten un origen comú i que aquest ha evolucionat en cada organisme tot i que també s'han produït esdeveniments de transferència horitzontal entre espècies. Aquest fet es va observar particularment en les espècies que contenen múltiples parelles del tipus LuxI/LuxR, ja que generalment provenen d'una font independent i recolzen la teoria de transferència genètica horitzontal.

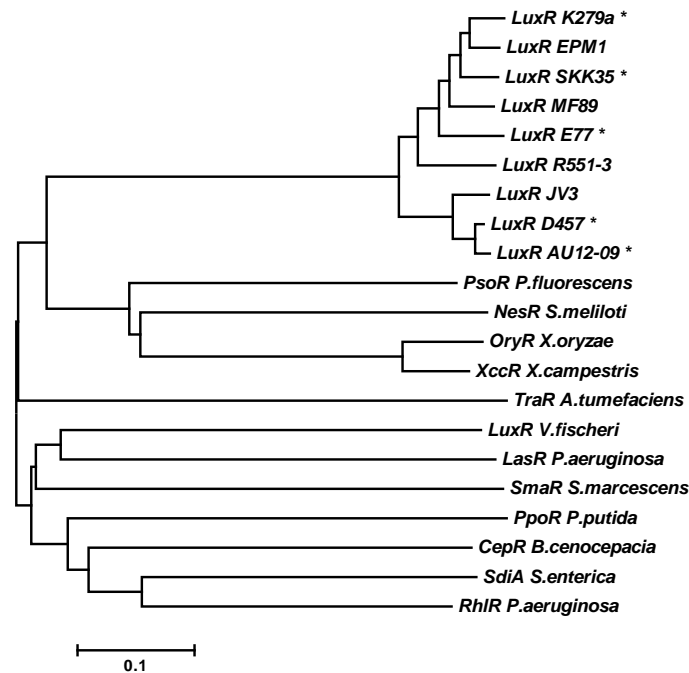
A continuació es mostra un arbre filogenètic (Figura 4.35) realitzat a partir de l'alineament utilitzant l'algoritme de Neighbor-Joining (NJ), entre reguladors del tipus LuxR de les diferents soques de *S. maltophilia* seqüenciades inclosa la soca de treball E77, conjuntament amb altres LuxR "solo" i LuxR descrits en la introducció corresponents a diferents espècies bacterianes.

A l'arbre podem observar que els LuxR de les diferents soques de *S. maltophilia* formen un grup a la part superior d'aquest. S'han marcat amb un asterisc les soques clíniques de *S. maltophilia* (K279a, SKK35, E77, D457, AU12-09) per diferenciar-les de les soques ambientals (EPM1, MF89, R551-3, JV3).

És interessant observar que els reguladors de *S. maltophilia* tot i que són més propers a la subfamília PAB no s'agrupen conjuntament amb els de *Xanthomonas* tot i que siguin dos gèneres molt relacionats genèticament. Ambdós grups també estan relacionats amb els reguladors LuxR d'altres espècies, els quals conserven en el genoma una sintasa cognada. Aquest altre grup inclou els LuxR de *V. fischeri*, LasR i RhIR de *P. aeruginosa*. TraR d'*A. tumefaciens* i CepR de *B. cenocepacia*.

Els LuxR "solos" de SdiA de *S. enterica* i PpoR de *P. putida* s'agrupen conjuntament en aquest grup i no ho fan amb els LuxR "solo" de la subfamília PAB. Els reguladors LasR i RhIR tot i que formen part de *P. aeruginosa* són distants entre si, fet que indica que l'adquisició d'aquests reguladors en *P. aeruginosa* es va originar de forma independent (Gray & Garey, 2001). Un altre exemple de transferència horitzontal és el cas del regulador LuxR "solo" SdiA, present en *S. enterica*, el qual s'agrupa filogenèticament amb el regulador RhIR de

*P. aeruginosa*, mentre que dista dels reguladors homòlegs d'enterobacteris no mostrats en aquesta figura però descrit per Gray i Garey (2001).



**Figura 4.35.** Anàlisi filogenètic entre diferents LuxR homòlegs de diferents proteobacteris. Presència de LuxR "solos" i LuxR que tenen sintasa cognada. A la part superior s'agrupen les soques seqüenciades de *S. maltophilia*. \* indica que la procedència de la soca de *S. maltophilia* és clínica. Arbre realitzat amb el programa MEGA (versió 5).

#### 4.5.2. Cerca d'AHLS sintases homòlogues en el genoma de *S. maltophilia*.

En la majoria de les espècies, els gens *luxI/luxR* estan lligats o relacionats genèticament tot i que hi ha exemples en què els gens *luxI/R* es troben separats en el genoma (Subramoni & Venturi, 2009). La detecció de molècules senyals AHLs en el sobrenedants de diferents soques clíniques de *S. maltophilia* i la presència d'un regulador del tipus LuxR amb domini d'unió a AHL i quatre residus conservats en totes les soques analitzades *in silico*, ens ha dut a cercar en el genoma de *S. maltophilia* sintases homòlogues a les ja descrites.

Malgrat que no hi ha cap sintasa anotada en els genomes seqüenciats de *S. maltophilia*, en el següent apartat s'ha fet un esforç per ampliar la comprensió d'un possible sistema de QS regulat per les AHLs en aquesta espècie. S'ha fet una cerca en el genoma complet de *S. maltophilia* K279a possibles proteïnes candidates amb similitud significativa a les proteïnes més representatives de les diferents famílies de sintases descrites fins a dia d'avui. A continuació es mostra l'anàlisi fet mitjançant el programa Blastp i PSI-BLAST (*Position Specific Iterated BLAST*) sobre el genoma de *S. maltophilia* K279 per tal de trobar sintases homòlogues

a les tres famílies ja descrites. Els motlles o *Query* utilitzats per a l'anàlisi comparatiu han estat proteïnes sintases del tipus LuxI (Engebrecht & Silverman, 1984), AinS/LuxM (Bassler, *et al.*, 1993, Gilson, *et al.*, 1995) i HdtS (Laue, *et al.*, 2000). La cerca a partir de les proteïnes sintases de la família del tipus LuxI de diferents espècies bacterianes així com les sintases AinS/LuxM llençades sobre el genoma de *S. maltophilia* K279a mostren similituds molt baixes, fet que indica que no hi ha significants sintases homòlogues d'aquestes dues famílies en el genoma de *S. maltophilia* tal i com es pot apreciar a la Taula 4.13 on només mostrem els millors alineaments per a cada sintasa estudiada.

**Taula 4.13.** Valors de identitat obtinguts entre les sintases del tipus LuxI, AinS/LuxM i HdtS i el genoma de *S. maltophilia* K279a mitjançant l'anàlisi comparatiu amb el Blastp.\*

Família sintasa	Tipus	Soca bacteriana	Domini Autoinducer sintasa	<i>S. maltophilia</i> K279a	Cobertura %	Identitat %	E valor
LuxI	LuxI	<i>V. fisheri</i>	+	<i>Smlt3106</i>	18	33	3.7
LuxI	LuxI	<i>V. fisheri</i>	+	<i>Smlt2474</i>	16	32	5.5
LuxI	LasI	<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>Smlt4284</i>	35	30	0.55
LuxI	LasI	<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>Smlt3513</i>	19	38	0.65
LuxI	RhII	<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>Smlt0114</i>	36	27	0.98
LuxI	RhII	<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>Smlt3795</i>	12	44	2.1
LuxI	Ppul	<i>P. putida</i>	+	<i>Smlt1814</i>	18	43	0.39
LuxI	Ppul	<i>P. putida</i>	+	<i>Smlt0839</i>	18	42	0.45
LuxI	PmII	<i>B. pseudomallei</i>	+	<i>Smlt0785</i>	38	29	0.68
LuxI	PmII	<i>B. pseudomallei</i>	+	<i>Smlt3207</i>	10	50	3.2
LuxI	Smal	<i>Serratia sp.</i>	+	<i>Smlt0413</i>	14	37	0.57
LuxI	Smal	<i>Serratia sp.</i>	+	<i>Smlt3924</i>	23	31	0.82
LuxI	SpnI	<i>S. marcescens</i>	+	<i>Smlt3935</i>	16	35	1.9
LuxI	SpnI	<i>S. marcescens</i>	+	<i>Smlt0666</i>	11	39	2.0
LuxI	Cepl	<i>B. cenocepacia</i>	+	<i>Smlt2559</i>	34	37	0.89
LuxI	Cepl	<i>B. cenocepacia</i>	+	<i>Smlt0778</i>	34	24	1.6
HdtS	HdtS	<i>P. fluorescens</i>	-	<i>Smlt4284</i>	48	28	9,00e-06
HdtS	HdtS	<i>P. fluorescens</i>	-	<i>Smlt4572</i>	72	26	1,00e-04
HdtS	HdtS	<i>P. fluorescens</i>	-	<i>Smlt0222</i>	50	29	7,00e-04
AinS	AinS	<i>V. fisheri</i>	-	<i>Smlt0662</i>	10	38	0.11
AinS	AinS	<i>V. fisheri</i>	-	<i>Smlt3105</i>	14	31	1.2
LuxM	LuxM	<i>V. harveyi</i>	-	<i>Smlt0247</i>	19	26	2.4
LuxM	LuxM	<i>V. harveyi</i>	-	<i>Smlt2817</i>	10	34	5.9

\* Només es mostren el millors alineaments. En gris es resalten les millors identitats. Valors Taula de l'any 2011.

En canvi, tres proteïnes corresponents als ORFs *smlt4284*, *smlt4572* i *smlt0222* de *S. maltophilia* K279a (resaltades en gris a la Taula 4.13) comparteixen certa similitud amb la sintasa de la família HdtS i són les que han donat millors valors de identitat respecte les altres

dos famílies estudiades. Entre elles la que conté un alineament més significatiu és la que es correspon amb l'ORF *smlt4572* (sent d'un 72 %). La proteïna HdtS que pertany a *P. fluorescens* és una nova família de sintases no homologa a la família LuxI (família de sintases més comuna i extesa entre les proteobacteries gram negatives) ni a la família AinS/LuxM pertanyens a *V. fischeri* i *V.harveyi* respectivament. La família sintasa HdtS s'ha demostrat que és responsable de la producció de diferents tipus d'AHLs.

Totes les sintase d'AHLs homòlogues a la HdtS són aciltransferases que pertanyen a la família 1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat *O*-aciltransferasa. Aquesta classe de sintases conté dos dominis altament conservats responsables de les funcions d'acilació. Així mateix, posseeixen en la seqüència d'aminoàcids 2 motius característics, NHQS i PEGTR, molt conservats entre totes les LPA aciltransferases (Laue, *et al.*, 2000). Estudis realitzats per Shih, *et al.*, (1999) van determinar que aquests motius poden constituir llocs d'unió per les acil-CoA o les acil-PTA així com van comprovar que els aminoàcids localitzats fora d'aquests motius podrien alterar les especificitats d'aquestes acil transferases, la qual cosa podria permetre la transferència d'un grup acil des de l'acil-CoA o acil-PTA a un altre substrat com podria ser el SAM per produir AHLs tal i com succeeix en el sistema clàssic de LuxI (Laue, *et al.*, 2000). És a dir, que els enzims HdtS i proteïnes homòlogues tenen una funció dual ja que catalitzen l'acilació del acid lisofosfatídic i posseeixen la capacitat d'acilar SAM per sintetitzar les AHLs (Laue, *et al.*, 2000, Rivas, *et al.*, 2007).

A la Taula 4.14 es mostren els tres ORFs de les tres proteïnes anotades també com acil transferases en el genoma de la soca *S. maltophilia* K279a amb major homologia a la sintasa de la família HdtS i es comparen els motius anteriorment esmentats i els diferents dominis. Els dominis que presenta la proteïna sintasa HdtS són els següents: 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfat aciltransferasa (PlsC), aciltransferasa de biosíntesi de lisofosfolípids (LPLATs) i un lloc d'unió a la cadena acil. Només l'ORF *smlt4572* comparteix els tres dominis de la proteïna HdtS mentre que els ORFs *smlt4284* i *smlt0222* no els comparteixen tots. A més a més, els motius més ben conservats en *S. maltophilia* K279a els trobem en la proteïna codificada per l'ORF *smlt4572*. Pel que fa a la proteïna Act de *A. ferrooxidans*, també inclosa a la Taula 4.14, comparteix tots els dominis i motius amb la proteïna ortòloga HdtS.

L'alineament de seqüències realitzats amb el programa Clustaw12 entre les proteïnes HdtS i Act presenta una major identitat amb un valor de 40 % mentre que les identitats entre la

proteïna HdtS i les sintates hipotètiques de *S. maltophilia* K279a, Smlt4572, Smlt2484 i Smlt0222 els valors són del 14 %, 15% i 12 % respectivament.

**Taula 4.14.** Comparativa de dominis i motius entre la proteïna HdtS i Act amb les sintases hipotètiques en *S. maltophilia* K279a.

Proteïna	Soca bacteriana	aa	Motius		Dominis		
			NHQS	PEGTR	PlsC	LPLATs	Lloc d'unió a la cadena acil
HdtS	<i>P. fluorescens</i> F113	259	NHQS	PEGTR	+	+	+
Act	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC	242	NHQS	PEGTR	+	+	+
Smlt4284	<i>S. maltophilia</i> K279a	629	ARQQ	-	-	+	+
Smlt4572	<i>S. maltophilia</i> K279a	265	NHPT	PEGTR	+	+	+
Smlt0222	<i>S. maltophilia</i> K279a	186	PHSS	PEGTR	+	-	+

En *S. maltophilia* hem obtingut similituds molt distants pel que fa a les famílies de proteïnes sintases del tipus LuxI i AinS/LuxM, tot i que coneixem que el percentatge de similitud entre les proteïnes sintases del tipus LuxI és molt baix en proteobacteris (28-35 %). Malgrat les baixes homologies obtingudes en la cerca de sintases hipotètiques en genoma de *S. maltophilia* K279a, pel que fa als valors obtinguts en els alineaments efectuats amb els programes Blastp, PSI-BLAST i Clustaw12 ens disposem a estudiar la hipotètica sintasa codificada per l'ORF *smlt4572* en la soca de *S. maltophilia* E77 degut que és la que sembla presentar major similitud amb la proteïna HdtS tenint en compte els resultats obtinguts a nivell de seqüència, percentatge de cobertura i homologia de dominis i motius. Aquesta proteïna també està conservada en totes les soques seqüenciades.

Esmentar també que els gens que codifiquen per les aciltransferases de la família de sintases del tipus HdtS, s'ubiquen en un context genòmic altament conservat per un ampli rang de proteobacteris (Rivas, *et al.*, 2007). Els gens conservats que constitueixen aquest context són *glyQ*, *glyS* i *ghp* conjuntament amb l'aciltransferasa, els quals es situen en un clúster o operó actuant com a unitat transcripcional. Tot i que *S. maltophilia* K279a conté els gens *glyS* i *glyQ* corresponents als ORFs *smlt4634* i *smlt4635* respectivament, no s'han localitzat conjuntament a aquest els gens *ghp* i hipotètica aciltransferasa formant una unitat transcripcional tal i com succeeix amb la proteïna HdtS i Act. És per aquest motiu pel qual no ens hem decantat per estudiar aquesta regió.

## **4.6. Mutagènesi dels gens seleccionats *in silico* implicats en el sistema de quorum sensing regulat per les AHLs en *S. maltophilia* E77.**

L'estudi *in silico* ens ha servit per identificar proteïnes hipotètiques que podrien estar implicades en el sistema de QS regulat per les molècules senyal AHLs en *S. maltophilia*.

En el següent apartat es mostra com s'han realitzat els mutants dels gens seleccionats sobre la soca *S. maltophilia* E77 per tal de realitzar un estudi funcional de cadascuna de les proteïnes més endavant.

### **4.6.1. Deleció del gens *smlt1839* i *smlt4572* que codifiquen per a una proteïna hipotètica reguladora LuxR i una sintasa HdtS respectivament en *S. maltophilia* E77.**

S'han escollit com a gens candidats les proteïnes hipotètiques reguladores i productores de molècules d'AHLs. Aquestes són les proteïnes corresponents al regulador del tipus LuxR codificat en el gen *smlt1839* i la sintasa hipotètica del tipus HdtS codificada en el gen *smlt4572*.

La construcció del mutant  $\Delta smlt1839$  i  $\Delta smlt4572$  s'ha realitzat per intercanvi al·lèlic mitjançant la doble recombinació homòloga a partir de l'electroporació del plasmidi suïcida pEX18Tc-Mut\_*smlt1839* o pEX18Tc-Mut\_*smlt4572* sobre cèl·lules competents de *S. maltophilia* E77. En el plasmidi suïcida s'han clonat els amplicons corresponents a dos braços homòlegs de les regions flanquejants als gens *smlt1839* i *smlt4572* anomenats braç esquerre (BE) i braç dret (BD) separats pel gen de resistència *erm* que ens permetran la generació de mutants a partir de la doble recombinació tal i com s'ha descrit en l'apartat de Materials i Mètodes 3.11.

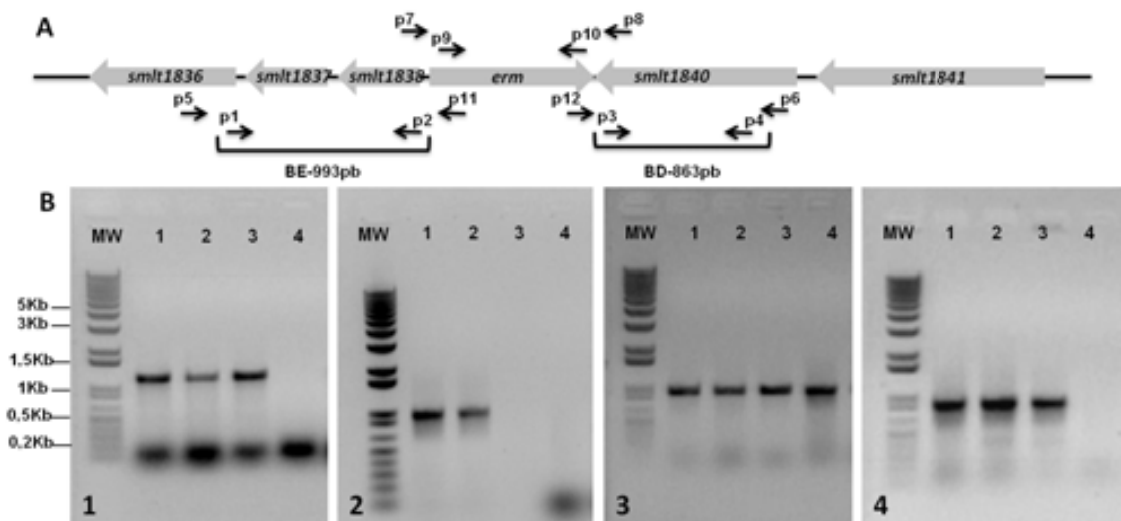
La mutació elimina completament l'ORF del gen *smlt1839* o *smlt4572* ja que es produeix un intercanvi al·lèlic entre el gen que volem delecionar i el gen de resistència *erm* que ens servirà per a seleccionar els clons mutants respecte dels clons salvatges.

Un cop seleccionats els clons  $Erm^R$ , per a diferenciar entre els clons resistents a l'antibiòtic de la Erm on s'ha produït la doble recombinació o la simple recombinació, es sembren tots ells en plaques de LB-Tc. Emprant aquestes plaques selectives podem separar els clons candidats mutants sensibles a la Tc ( $Erm^R/Tc^S$ ) dels que el plasmidi s'ha integrat en el genoma sent fenotípicament E77  $Erm^R/Tc^R$ .

#### 4.6.2. Comprovació de *S. maltophilia* E77 mutant pel gen *smlt1839* - regulador LuxR homòleg.

A la Figura 4.36-A s'esquematitza com és l'entorn genètic del clon mutant pel gen *smlt1839*, on s'ha produït la doble recombinació homologa entre el gen *smlt1839* i el gen *erm*. Per a mostrar aquest entorn s'ha utilitzat com a motlle la seqüència de la soca K279a. Els braços i oligonucleòtids seleccionats per a realitzar la doble recombinació es conserven entre les diferents soques seqüenciades i la soca d'estudi E77.

Per comprovar que la mutagènesi s'ha produït correctament, s'han dissenyat un conjunt d'oligonucleòtids que han permès amplificar les regions flanquejants on s'ha produït l'intercanvi al·lèlic amb l'objectiu d'assegurar-nos que la deleció era la correcta. Posteriorment, aquestes regions han estat seqüenciades per tal de descartar amplificacions inespecífiques. Aquests oligonucleòtids es mostren a la part superior de la Figura 4.36-A.



**Figura 4.36. A,** Esquematització de l'entorn genètic de la regió mutada a la soca *S. maltophilia* E77 mutant pel gen *smlt1839* substituït pel gen de resistència *erm*. S'observen les regions corresponents als braços esquerre (BE) i dret (BD) que serveixen per a la doble recombinació homologa i tots els oligonucleòtids (marcats amb una fletxa) usats durant la mutagènesi i la comprovació dels mutants. **B,** Comprovació candidats mutants E77 $\Delta$ *smlt1839* Erm<sup>R</sup>/ Tc<sup>S</sup> mitjançant PCR (mostrats en els carrils del 1 al 4). Electroforesis en gel d'agarosa al 0,8 % de la amplificació per PCR amb les següents parelles d'oligonucleòtids mostrats a la part superior de la figura: **1.** extBELuxR (p5) i erm5'rev (p11), **2.** extBDluxR (p6) i erm3'rev (p12), **3.** BELuxR\_up (p1) i erm5'rev (p11), **4.** BDlux\_dw (p4) i erm3'rev (p12). MW: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

A la Figura 4.36-B es mostren les electroforesis en gels d'agarosa dels amplicons obtinguts a partir de l'amplificació sobre possibles mutants candidats pel gen *smlt1839*, els quals mostraven un fenotip E77 $\Delta$ *smlt1839* Erm<sup>R</sup>/ Tc<sup>S</sup>. Les amplificacions s'han realitzat sobre quatre

mutants candidats i només dos han amplificat correctament tots els amplicons esperats que posteriorment han estat seqüenciats.

Les parelles d'oligonucleòtids utilitzats en els gels d'agarosa 1 i 2 amplifiquen des de l'interior del gen *erm* fins a la part exterior i flanquejant del BE o BD respectivament. Les parelles d'oligonucleòtids utilitzats en els gels d'agarosa 3 i 4 amplifiquen des de l'interior del gen *erm* fins a la regió més llunyana del BE o BD respectivament.

#### **4.6.3. Comprovació de *S. maltophilia* E77 mutant pel gen *smlt4572* - sintasa hipotètica del tipus HdtS.**

A la Figura 4.37-A s'esquematitza l'entorn genètic del clon mutants pel gen *smlt4572*, on s'ha produït la doble recombinació homòloga entre el gen *smlt4572* i el gen *erm*. Per a mostrar aquest entorn s'ha utilitzat com a motlle la seqüència de la soca K279a. Els braços i oligonucleòtids seleccionats per a realitzar la doble recombinació es conserven entre les diferents soques seqüenciades i la soca d'estudi E77.

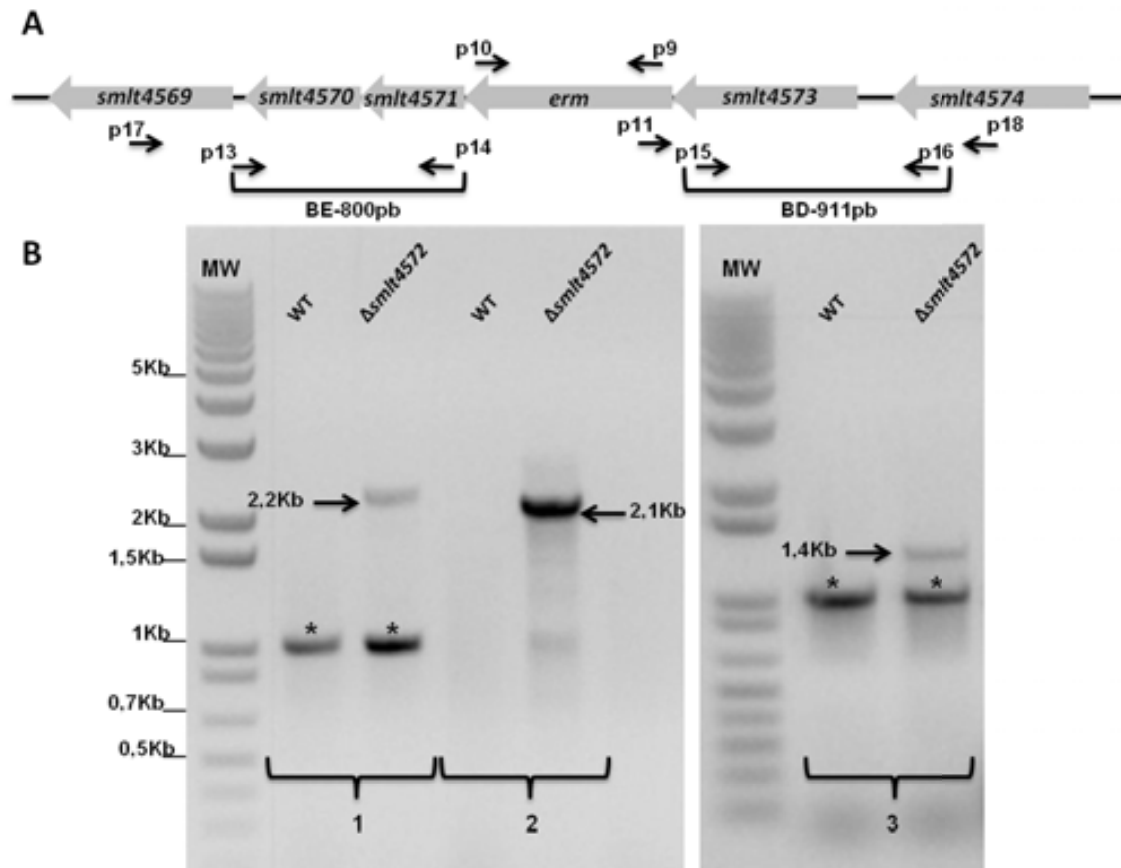
Per comprovar que la mutagènesi s'ha produït correctament, s'han dissenyat un conjunt d'oligonucleòtids que han permès amplificar les regions flanquejants on s'ha produït l'intercanvi al·lèlic, amb l'objectiu d'assegurar-nos que la deleció era la correcta. Posteriorment aquestes regions han estat seqüenciades per tal de descartar amplificacions inespecífiques. Aquests oligonucleòtids es mostren a la part superior de la Figura 4.37-A.

A la Figura 4.37-B es mostren les electroforesis en gels d'agarosa dels amplicons obtinguts, a partir de l'amplificació realitzada sobre un dels mutants candidats pel gen *smlt4572* el qual mostrava un fenotip  $E77\Delta smlt4572$   $Erm^R/Tc^S$  i la soca salvatge de *S. maltophilia* E77. Les parelles d'oligonucleòtids utilitzades amplifiquen des de l'interior del gen *erm* fins a la part exterior del BE (claudator 2) o BD (claudator 1 i 3). Degut a l'aparició de inespecificitats en els clons candidats mutants es va incloure a les PCRs de comprovació la soca salvatge on també apareixen aquestes inespecificitats marcades amb un asterisc a la Figura 4.37-B.

En aquestes amplificacions esperaríem no obtenir cap amplicó en la soca salvatge ja que no conté el gen de la *erm*. Tot i així l'amplificació realitzada des del gen *erm* fins a la part exterior del BD (claudators 1 i 3) ha donat inespecificitats tan en la soca salvatge com en el mutant candidat. A través de la seqüenciació dels fragments hem pogut corroborar que la



deleció és correcte i que els amplicons indicats amb un asterisc són inespecificitats de l'amplificació.



**Figura 4.37.** A, Esquematzació de l'entorn genètic de la regió mutada a la soca *S. maltophilia* E77 mutant pel gen *smlt4572* substituït pel gen de resistència *erm*. S'observen les regions corresponents als braços esquerre (BE) i dret (BD) que serveixen per a la doble recombinació homòloga i tots els oligonucleòtids (marcats amb una fletxa) usats durant la mutagènesi i la comprovació dels mutants. B, Comprovació mutant E77 $\Delta$ *smlt4572* *Erm*<sup>R</sup>/*Tc*<sup>S</sup> mitjançant PCR. Electroforesis en gel d'agarosa al 0,8 % de la amplificació per PCR amb les següents parelles d'oligonucleòtids mostrats a la part superior de la figura: 1. extBDsint (p18) i *erm*3' (p10), 2. extBELuxR (p17) i *erm*5' (p9), 3. extBDsint (p18) i *erm*5' rev (p11).\*: inespecificitats de l'amplificació. MW: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

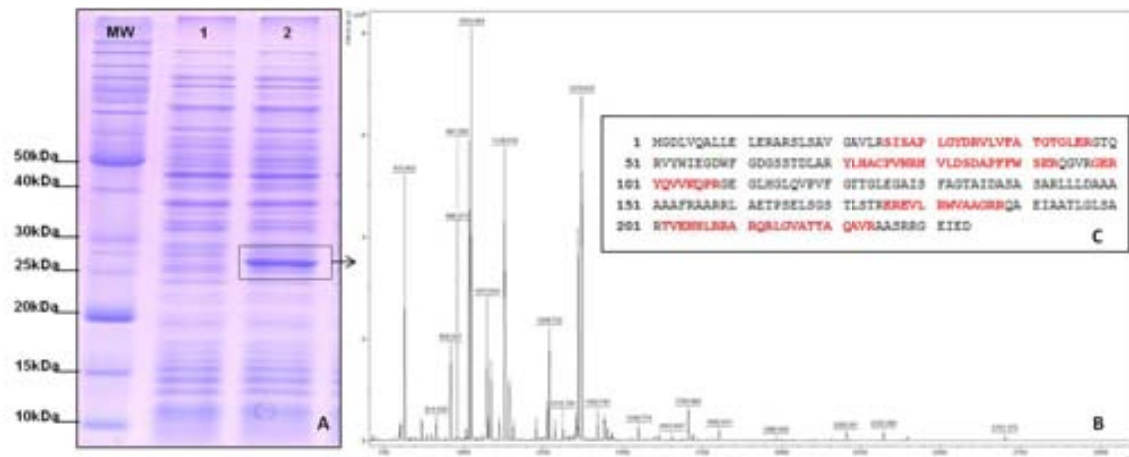
#### 4.7. Caracterització de la unió del regulador LuxR de *S. maltophilia* E77 a diferents AHLs sintètiques.

La presència de quatre residus conservats en el domini d'unió a les AHLs del regulador homòleg LuxR en *S. maltophilia*, ens ha dut a investigar si aquest és capaç d'unir-se a un o més tipus d'AHLs sintètiques.

#### **4.7.1. Sobreproducció de la proteïna LuxR de *S. maltophilia* E77 en el vector d'expressió pET22b en presència d'AHLS sintètiques.**

Per tal d'identificar quines AHLs podrien unir-se al regulador de *S. maltophilia* E77, s'ha realitzat un experiment anomenat assaig d'unió a AHLs tal i com descriuen Subramoni i Venturi (2009). Aquest experiment es basa en la sobreproducció del regulador LuxR de la soca *S. maltophilia* E77 en la soca d'*E. coli* BL21 (DE3) amb el plasmidi pET22b-LuxR en presència de diferents molècules d'AHLS a una concentració determinada. Com a control s'ha usat la soca d'*E. coli* BL21 (DE3) que conté només el vector d'expressió pET22b sense la proteïna LuxR. Les AHLs estudiades per aquesta unió han estat les que hem estat capaços de detectar i caracteritzar en el sobrenedant de *S. maltophilia* E77 (C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL). S'han realitzat en paral·lel i repetides vegades els assaigs de sobreproducció del regulador LuxR i unió a les diferents AHLs en les soques d'*E. coli* BL21 (DE3) amb el vector pET22b o bé pET22b-LuxR.

A la Figura 4.38-A es mostra un exemple d'electroforesi en gel SDS-PAGE que es realitzaria per cadascun dels assaigs en l'estudi d'unió a AHLs de la proteïna LuxR sobreproduïda en la soca BL21 (DE3) pET22b-LuxR. En el gel s'aprecia una banda diferencial entre les dos mostres la qual es correspon amb el pes esperat de 26 kDa (marcada amb un requadre a la figura). Cadascuna de les mostres s'han carregat amb la mateixa concentració de cèl·lules. L'assaig de sobreproducció de la proteïna LuxR és repetitiu entre els assaigs independents. La identificació de la proteïna LuxR sobreproduïda s'ha realitzat a partir de la digestió amb tripsina d'una de les bandes retallades provinents del gel d'electroforesi SDS-PAGE. La identificació per empremta peptídica ha demostrat que la banda sobreexpressada es correspon a la proteïna LuxR de *S. maltophilia*. A la Figura 4.38 (B i C) es mostra respectivament l'espectre de masses MALDI-TOF i els pèptids identificats en vermell amb el programa Mascot (MatrixScience) de la proteïna LuxR. Els resultats obtinguts per a la proteïna LuxR són equivalents a una puntuació de 197 i predicció de  $6,8e-13$ .



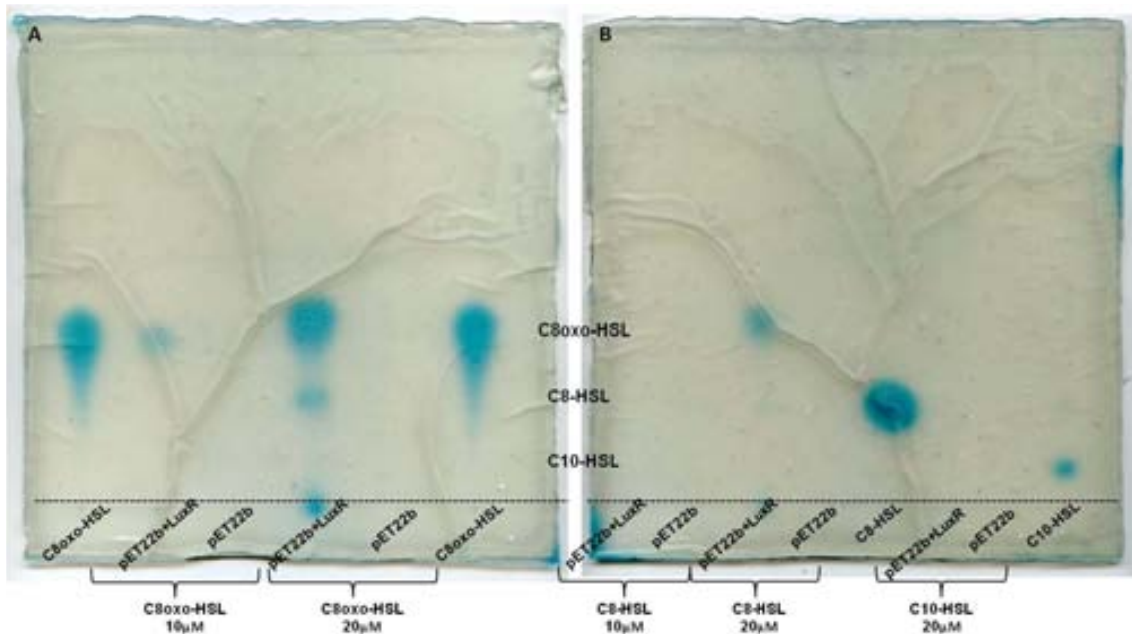
**Figura 4.38.** **A**, SDS-PAGE (12,5 % d'acrilamida) de l'anàlisi de sobreproducció de la proteïna LuxR de *S. maltophilia* E77 en presència de C8oxo-HSL (20  $\mu$ M) durant l'assaig d'unió entre: la soca BL21 (DE3) pET22b (control) amb l'AHL sintètica C8oxo-HSL (20  $\mu$ M) (carril1) o la soca BL21 (DE3) pET22b-LuxR amb l'AHL sintètica C8oxo-HSL (20  $\mu$ M) (carril 2). El requadre indica la banda sobreproduïda amb el pes molecular esperat de 26 kDa de la proteïna LuxR. MW: Marcador pes molecular, BenchMark™ (Invitrogen). **B**, Espectre de masses MALDI-TOF de la mostra digerida amb tripsina on cada pic es correspon amb un pèptid derivat de la digestió de la proteïna LuxR. **C**, Seqüència proteïna LuxR, on es mostren en vermell els pèptids identificats per espectrometria de masses MALDI-TOF i posterior anàlisi amb el programa Mascot.

#### 4.7.2. Anàlisi i caracterització de la unió LuxR-AHL en el suport de CCF C<sub>18</sub> de fase reversa.

Pe tal d'esbrinar si el domini d'unió a les AHLs del regulador LuxR en *S. maltophilia* E77 s'uneix a aquest tipus de molècules, s'han purificat aquestes en cada assaig realitzat de sobreproducció mitjançant l'extracció de les AHLs amb acetat d'etil. Per tal d'identificar quines serien les AHLs cognades capaces d'unir-se al regulador LuxR sobreproduït en *E. coli* BL21 (DE3), posteriorment a l'extracció amb acetat d'etil, s'ha realitzat una CCF tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes 3.6.

A la Figura 4.39 es mostra la CCF on s'han carregat les extraccions de les mostres provinents de l'assaig d'unió a partir de la sobreexpressió del regulador LuxR amb presència de diferents molècules sintètiques d'AHLs a diferents concentracions. S'han realitzats assaigs independents per a cada molècula i concentració sent aquestes: C8oxo-HSL (10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M), C8-HSL (10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M) i C10-HSL (20  $\mu$ M). Podem observar que el regulador LuxR s'uneix a la molècula C8oxo-HSL a 10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M i detectem que l'assaig és concentració depenent degut que a menys concentració de la molècula en l'assaig, la detecció a la CCF és més feble. Observem també que quan afegim a l'assaig més concentració de la molècula C8oxo-HSL (20  $\mu$ M) apareix la molècula C8-HSL (20  $\mu$ M) i viceversa. Creiem que aquest fet succeeix perquè el stock de la molècula sintètica no és 100 % pur ja que amb el pas del temps sofreix una

degradació. Gràcies a aquesta degradació hem detectat en els experiments realitzats amb més concentració de C8oxo-HSL (20  $\mu$ M) que probablement el regulador LuxR també s'uneix a la molècula C8-HSL tot i que la detecció sigui més feble. No hem detectat la unió a la molècula C10-HSL. EL fet que no s'observi unió a la molècula C10-HSL es pot deure a diversos motius com que el regulador no s'uneixi a aquesta molècula o que l'assaig no és prou sensible per a detectar aquesta unió probablement molt més feble.



**Figura 4.39.** CCF dels tipus C<sub>18</sub> de fase reversa. La proteïna LuxR sobreproduïda en la soca BL21 (DE3) pET22b+LuxR s'uneix a les molècules C8oxo-HSL i C8-HSL. Els patrons C8oxo-HSL (CCF **A**) i C8-HSL/C10-HSL (CCF **B**) i les extraccions de les soques BL21 (DE3) pET22b/ BL21 (DE3) pET22b-LuxR crescudes amb presència de C8oxo-HSL (CCF **A**) o C8-HSL/C10-HSL (CCF **B**) són separats mitjançant la capa fina i el solvent orgànic de metanol /aigua (60:40, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30 °C.

Pel que fa a la difusió i transport de les AHLs a través de la membrana d'*E. coli* on s'han realitzat els experiments d'unió a AHLs, el control negatiu ens evidencia que no s'ha produït cap segrest per manca de bombes de flux i fins on sabem, no s'ha evidenciat cap sistema involucrat en l'entrada d'AHL al citoplasma. Per tant sigui quina sigui la llargada de l'AHL sembla que no ha influenciat en el transport dins i/o fora la cèl·lula (Boyer & Wisniewski-Dye, 2009).

## 4.8. Estudi del promotor del gen *luxR*.

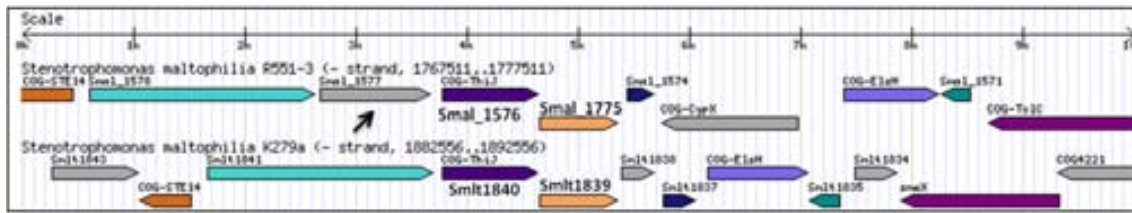
Per tal d'entendre si l'expressió de la proteïna LuxR té alguna correlació amb el seu rol d'interacció amb les AHLs hem estudiat l'expressió del gen *lacZ* sota el promotor del gen *smlt1839* quantificant l'activitat de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa en diferents condicions de cultiu.

### 4.8.1. Cerca del promotor del gen *luxR in silico*.

Per identificar la regió promotora del gen *luxR*, el primer estudi s'ha basat en comparar els entorns d'aquest gen en els genomes de les soques seqüenciades K279a i R551-3, realitzant un Blastn entre ambdues seqüències visualitzat amb el programa Artemis (Figura 4.40). Els blocs de color vermell indiquen zones de similitud entre ambdues seqüències. Mitjançant aquest anàlisi s'ha pogut observar que justament la regió anterior al regulador *luxR* (marcat en groc) és molt diferent entre les soques K279a i R551-3 tal i com podem observar a la Figura 4.40-A.

A la Figura 4.40-B es poden observar els gens ortòlegs a les regions adjacents més properes al gen *luxR* amb ORFs *smlt1839* o *sml\_1575* corresponents a les soques seqüenciades K279a i R551-3 respectivament. Es pot notar també que una de les regions adjacents al gen *luxR* no comparteix similitud entre soques (gens en gris) mentre que l'altre regió sí (gens en diferents colors). En aquesta comparativa s'ha marcat amb una fletxa la posició del gen *luxR* en cadascuna de les soques. Aquesta regió no homòloga es correspon amb el requadre marcat a la Figura 4.40-A on s'observa una zona de alta variabilitat genòmica entre ambdues seqüències, anteriors al gen *luxR*.





**Figura 4.41.** Esquema de la regió propera al gen *luxR*. Comparativa entre soques R551-3 i K279a. Imatge extreta de la web [www.microbesonline.org](http://www.microbesonline.org) a una escala superior a l'anterior (Figura 4.40-B). En color hi ha marcats els gens ortòlegs. En gris els gens que no presenten similitud entre soques en aquesta posició. Amb una fletxa s'indica la presència de l'ORF *smal\_1577* a la soca R551-3 que no té ortòleg a la soca K279a proper al gen *smlt1839*.

Per tal d'estudiar el sistema d'expressió del regulador LuxR en *S. maltophilia* E77 (soca d'estudi) s'han amplificat 5,5 kb corresponents al gen *smlt1839* i a la regió anterior a aquest per tal de detectar possibles promotors.

S'ha generat una seqüència consens de l'amplicó de 5,5 kb mitjançant la seqüenciació del vector pBBR1MCS-5 Amplicó E77, dissenyat per a la complementació de la soca mutant *S. maltophilia* E77Δ*smlt1839* (vegeu Taula 3.10 dels Materials i Mètodes). Els oligonucleòtids utilitzats han estat els (p3 i p4, p7 i p8, i del p27 al p38). L'acoblament de seqüències s'ha realitzat amb el programa DNA Baser a partir de successives amplificacions realitzades sobre aquest vector.

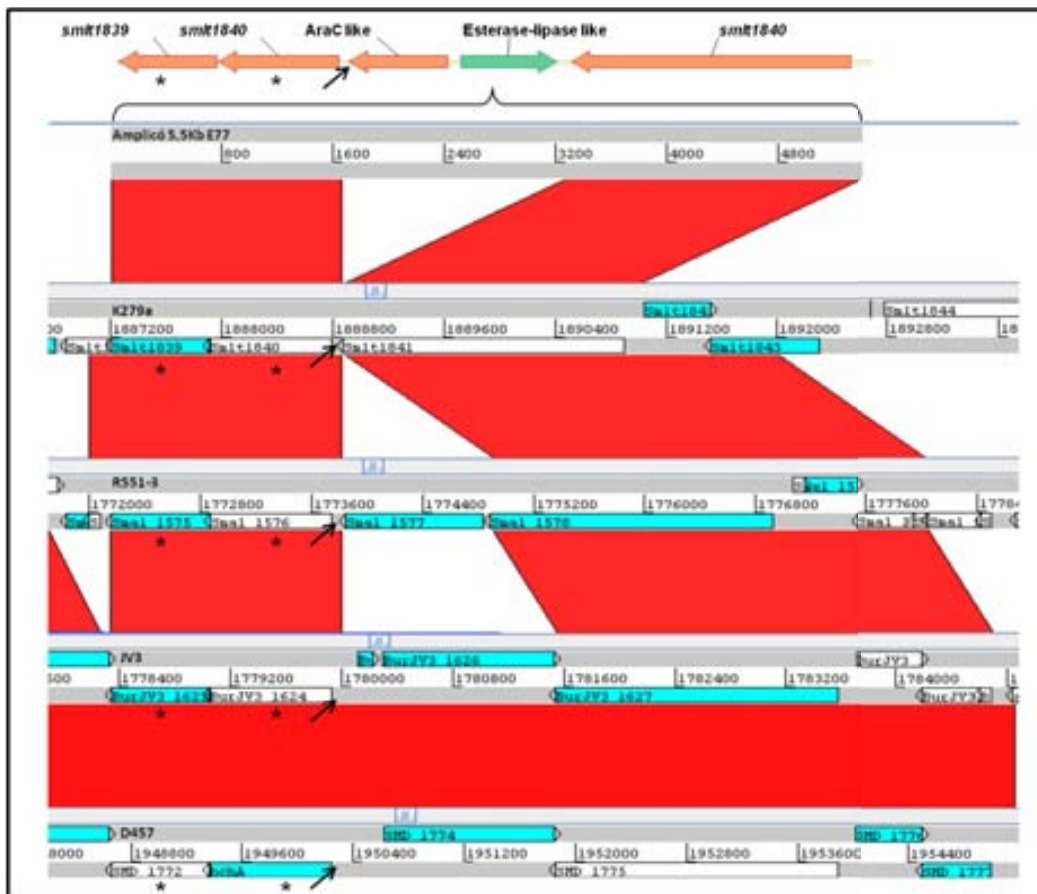
Hem pogut observar anteriorment que les regions adjacents al regulador *luxR* són diferents entre soques i el nostre objectiu rau en trobar el promotor del gen *luxR*. A la Figura 4.42 mitjançant el programa Artemis hem visualitzat la comparativa de seqüències (Blastn) entre l'amplicó de 5,5 kb de la soca de *S. maltophilia* E77 amb els quatre genomes seqüenciats de *S. maltophilia* (K279a, R551-3, JV3 i D457). D'aquesta manera ens serà més fàcil identificar el promotor del gen *luxR*. Les regions en vermell indiquen els blocs de similitud entre dos soques consecutives.

Com es veu a la Figura 4.42, els gens corresponents als ORFs *smlt1839* i *smlt1840* (anotats com a proteïna reguladora LuxR i xaperona) contenen homòlegs a totes les soques seqüenciades inclosa la E77 (marcats amb un asterisc en cadascuna de les soques). La regió de menys de 100 pb anterior al gen *smlt1840* (marcada amb una fletxa negra) podria correspondre's a la regió promotora d'aquests dos ORFs suposant doncs que formen part del mateix grup transcripcional degut que tot i correspondre's amb una regió intergènica es conserva en totes les soques estudiades. A la regió central de la figura, anterior a aquests dos gens, hi ha una regió molt poc conservada entre seqüències, sent molt diversa entre soques ja



que cadascuna conté o bé cap, un o dos ORFs diferents que codifiquen per a proteïnes diferents en tots els casos. En *S. maltophilia* K279a aquest ORF és inexistent, mentre que les soques R551-3 i D457 contenen un ORF anotat com *smal\_1577* i SMD\_1774 respectivament. Les soques JV3 i E77 contenen dos ORFs anotats com BurJV3\_1625 i 1626 pel que fa a la soca JV3 i proteïnes hipotètiques cercades a partir de la seqüenciació realitzada sobre l'amplicó de la soca E77 anotades a la Figura 4.42.

Aquesta regió no conservada entre les seqüències estudiades és anterior al ORF *smlt1841*, el qual es correspon a una proteïna hipotètica homòloga, la qual es conserva entre totes les soques. Per tant, aquesta regió variable genèticament es troba flanquejada per gens ortòlegs en totes les seqüències de *S. maltophilia* i ens ajuda a acotar encara més la regió promotora del gen *luxR*.



**Figura 4.42.** Alineament fragment regió gen *luxR* realitzat amb el programa Blastn i visualitzat amb Artemis on les regions en vermell indiquen blocs de similitud entre dos soques. A la part superior predicció dels ORFs de l'amplicó de 5,5 kb de *S. maltophilia* E77 amb homologia als ORFs *smlt1839*, *smlt1840* i *smlt1841* de K279a i alineament de l'amplicó amb els genomes de *S. maltophilia* corresponents a les soques (K279a, R551-3, JV3 i D457) de dalt a baix. Amb una fletxa s'indica la regió corresponent al promotor hipotètic (100pb) de la unitat transcripcional *smlt1839* i *smlt1840* (que hem marcat amb asteriscs).



#### 4.8.2. Activitat $\beta$ -galactosidasa sota el promotor hipotètic *PluxR*.

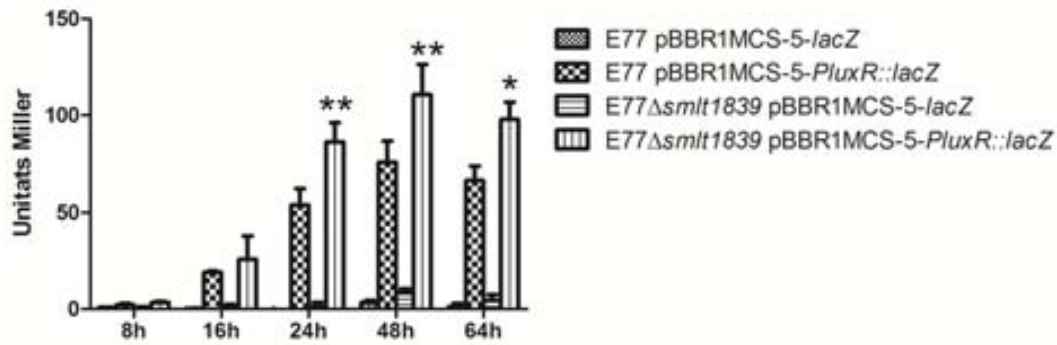
##### 4.8.2.1. Activitat $\beta$ -galactosidasa del *PluxR* durant la corba de creixement.

Un cop localitzat *in silico* la regió que es podria correspondre amb la regió promotora dels gens *smlt1840-1839* (la qual hem anomenat *PluxR*), hem construït una fusió transcripcional entre aquesta regió i el gen indicador *lacZ* generant el plasmidi pBBR1MCS-5-*PluxR::lacZ*, amb la intenció d'estudiar-ne l'expressió mitjançant la mesura de la seva activitat  $\beta$ -galactosidasa (vegeu Materials i Mètodes 3.13).

Aquest plasmidi l'hem electroporat a la soca *S. maltophilia* E77 i sota el fons genètic mutant pel regulador LuxR (*S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*) per tal d'estudiar quin efecte fa el propi regulador LuxR sobre la seva pròpia expressió. Com a control s'ha usat el vector pBBR1MCS-5-*lacZ* sense el promotor *PluxR*, el qual s'ha electroporat tant en la soca salvatge com la mutant de *S. maltophilia*.

Sembla doncs que el promotor predit, anomenat en aquest treball *PluxR*, és funcional degut que l'anàlisi de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques control i problema demostra que l'expressió del regulador LuxR depèn de la fase de creixement en què es troba (Vegeu Figura 4.43). En aquesta s'indiquen les UM en diferents punts de la corba de creixement i es pot observar que fins que el cultiu no entra en fase estacionària la detecció en l'expressió del regulador LuxR és mínima en cultius que es troben en densitats cel·lulars baixes (8 h) o en fase exponencial (16 h), mentre que aquesta incrementa ràpidament en cultius saturats (24 h, 48 h i 64 h). Resultats similars a aquests han estat indicats per altres autors com Subramoni i Venturi (2009) i Gamage, *et al.*, (2011). Aquest patró en la regulació s'observa tan en la soca salvatge com en la soca mutant, tot i que en la soca mutant s'observa una expressió major de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa sent estadísticament significativa respecte la soca salvatge ( $p < 0,01$  en els temps 24 h i 48 h) i ( $p < 0,01$  en el temps 64 h), fet que podria indicar una possible regulació produïda per altres reguladors transcripcionals.

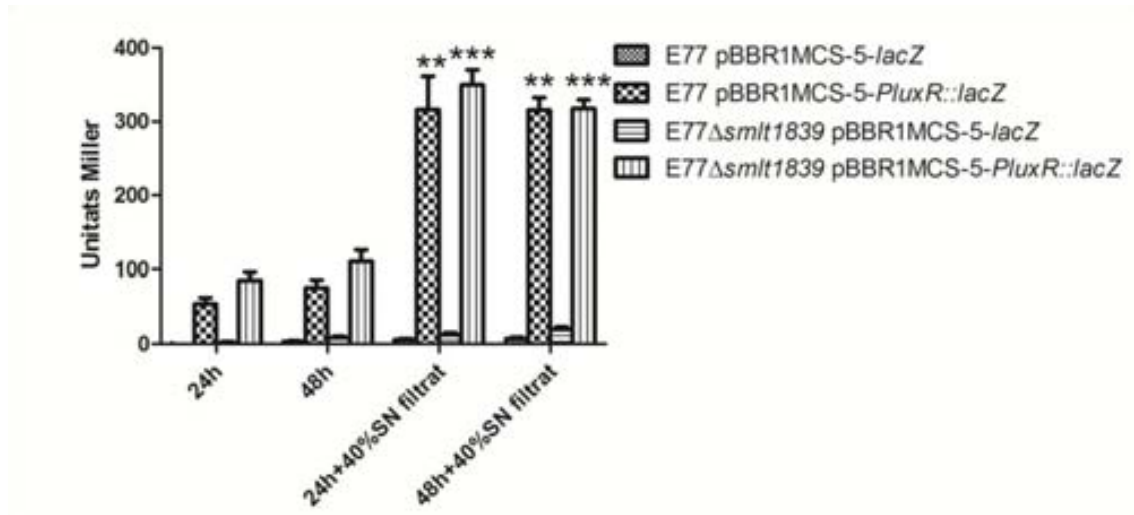
No detectem expressió  $\beta$ -galactosidasa en les soques control en les que s'ha electroporat el vector que conté el gen *lacZ* sense el promotor *PluxR* tan en la soca salvatge i mutant pel gen *luxR*. Aquests resultats validen els anteriors esmentats i ens permeten assegurar que l'activitat  $\beta$ -galactosidasa detectada en cada assaig es deu a la regulació exercida pel promotor identificat *in silico* en l'apartat anterior.



**Figura 4.43.** Regulació de l'expressió del regulador LuxR de *S. maltophilia* E77 i E77Δsmlt1839 que conté plasmidi amb la fusió entre la regió promotora del gen *luxR* i el gen *lacZ* (pBBR1MCS-5-*PluxR*::*lacZ*) o amb el plasmidi control (pBBR1MCS-5-*lacZ*). Representació de l'activitat β-galactosidasa expressada en Unitats Miller a diferents temps de la corba de creixement dels cultius crescuts en 10 ml de LB i a 30 °C amb absorbància inicial de A<sub>550nm</sub> de 0,05. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  s'ha considerat significatiu respecte E77pBBR1MCS-5-*PluxR*::*lacZ* mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni.

#### 4.8.2.2. Activitat β-galactosidasa del *PluxR* amb sobrenedants filtrats.

A la Figura 4.44, s'ha realitzat un estudi per tal d'investigar com afecta en el patró d'expressió del regulador *luxR*, la presència de sobrenedants filtrats provinents de cultius en fase estacionària, ja que és en aquesta fase és on hem vist una major expressió. S'observa que l'addició de sobrenedants filtrats (40 % del volum final de LB) en els cultius gairebé triplica l'expressió del regulador *luxR* tan en la soca salvatge ( $p < 0,01$ ) com en la soca mutant ( $p < 0,001$ ), respecte els valors obtinguts en condicions normals on no s'afegeix sobrenedant. Aquests resultats suggereixen que en el sobrenedant hi ha certes molècules que activen o no reprimeixen, l'expressió tan de la soca salvatge com de la soca mutant, aquest cop amb els mateixos valors d'expressió. Pel que fa als controls que contenen el plasmidi sense el promotor *PluxR*, tan en la soca salvatge com la mutant, el tractament amb sobrenedants filtrats s'ha realitzat a partir dels sobrenedants extrets de les soques problema, els quals no afecten als valors d'expressió obtinguts. En aquest assaig hem vist que no hi ha diferències en l'expressió del promotor del gen *luxR* quan comparem el mutant amb la soca salvatge i suggereix que l'expressió del regulador *luxR* depèn de la fase de creixement. Probablement la seva expressió estigui relacionada amb l'acumulació en el sobrenedant de molècules que regulen l'expressió del regulador *luxR* via un regulador encara no identificat.



**Figura 4.44.** Regulació de l'expressió del regulador LuxR en *S. maltophilia* E77 i *E77Δsmlt1839* que conté plasmidi amb la fusió entre la regió promotora del gen *luxR* i el gen *lacZ* (*pBBR1MCS-5-PluxR::lacZ*) o amb el plasmidi control (*pBBR1MCS-5-lacZ*). Representació de l'activitat β-galactosidasa expressada en Unitats Miller de cultius tractats amb sobrenedants filtrats provinents de cultius de nit (40 % SN filtrat) de les soques *S. maltophilia* E77 *pBBR1MCS-5-PluxR::lacZ* i *E77Δsmlt1839 pBBR1MCS-5-PluxR::lacZ* i no tractats en LB i a 30 °C amb absorbància inicial de  $A_{550nm}$  de 0,05 en el temps de 24 h i 48 h. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim de tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments. i \*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$  s'ha considerat significatiu respecte les soques on no s'addiciona SN mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni.

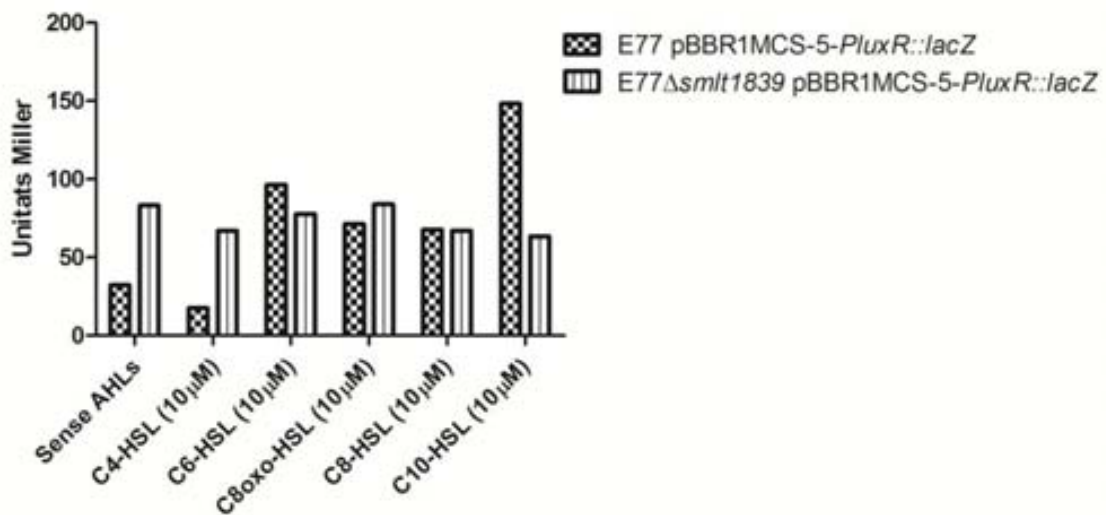
#### 4.8.2.3. Activitat β-galactosidasa sota el *PluxR* amb AHLs sintètics.

Per tal d'observar la possible relació entre les molècules d'AHLs amb l'augment de l'expressió del regulador *luxR*, s'han realitzat diferents assaigs β-galactosidasa amb presència de diferents tipus d'AHLs sintètiques a concentracions de 100 nM i 10 μM per la soca salvatge i de 10 μM per la soca mutant (Egland & Greenberg, 2000, Gamage, *et al.*, 2011). Esperaríem que si el regulador LuxR s'uneix a les AHLs, augmenti l'expressió de la β-galactosidasa en la soca salvatge mentre que en la soca mutant l'addició d'AHLs no incrementi la seva expressió ja que és deficient pel regulador LuxR. Aquests resultats s'observen a la Figura 4.45 per a la soca salvatge i mutant.

Pel que fa a la soca salvatge (Figura 4.45), observem que exceptuant la molècula sintètica C4-HSL, les molècules C6-HSL, C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL augmenten l'expressió de la β-galactosidasa respecte les condicions normals (sense afegir AHL al medi). Tot i així, aquesta inducció és menor que quan afegim sobrenedant filtrat en el cultiu, on l'augment de l'expressió és major quan afegim un 40% del sobrenedant (vegeu Figura 4.44) que si afegim un 10 % respecte el volum total (dades no mostrades). Aquest fet indicaria que hi ha altres inductors que estarien activant l'expressió del regulador LuxR. Els resultats preliminars indiquen que les AHLs al unir-se al regulador LuxR podrien formar un complex LuxR-AHL que

activa el propi promotor si comparem els valors obtinguts amb l'addició d'AHLS respecte el cultiu on no s'addiciona. També hem observat que l'expressió del gen *luxR* és concentració dependent de la molècula sintètica addicionada degut que l'addició de les molècules d'AHLS a concentració de 100 mM obté valors UM inferiors als cultius que s'han tractat amb AHLS a concentració 10  $\mu$ M (dades no mostrades).

Pel que fa la soca mutant (Figura 4.45), l'addició d'AHLS sintètiques (10  $\mu$ M) en el medi no augmenta l'expressió respecte el cultiu analitzat en condicions normals. Com ja hem mencionat anteriorment l'expressió del gen *lacZ* en la soca mutant és major que en la soca salvatge després de 24h. Tanmateix l'addició de sobrenedant estimula l'expressió en la soca mutant (vegeu Figura 4.44) de la mateixa manera que en la soca salvatge fet que indicaria que probablement existeix una regulació inductora per part del sobrenedant que no exerceixen les AHLs.



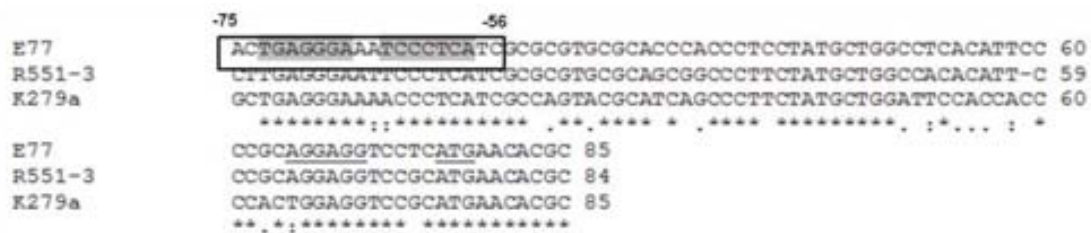
**Figura 4.45.** Regulació de l'expressió del regulador LuxR en *S. maltophilia* E77 i *S. maltophilia* E77 $\Delta$ smt1839 que conté plasmidi amb la fusió entre la regió promotora del gen *luxR* i el gen *lacZ* (pBBR1MCS-5-PluxR::lacZ). Representació de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa expressada en Unitats Miller en cultius on s'han addicionat diferents AHLs(10 $\mu$ M) en LB a 30  $^{\circ}$ C i 24 h amb absorbància inicial de  $A_{550nm}$  de 0,05. Mancança de tres assaigs independents.

Els resultats indiquen que probablement les AHLs s'uneixen al regulador LuxR a i no podem excloure la possibilitat que la regulació d'aquest depengui d'altres estímuls probablement relacionats amb el sistema de QS via un regulador encara no identificat.

#### 4.8.3. Cerca *in silico* de la caixa *lux* en el promotor funcional del gen *luxR*.

Si el regulador LuxR de *S. maltophilia* s'autoregula, probablement en el seu promotor existeixi una caixa del tipus *lux*, les quals presenten estructura palindròmica. Aquestes caixes

acostumen a ser de 20 nucleòtids i tot i que la posició respecte el codó d'inici de la transcripció varia entre espècies, aquesta normalment es situa aproximadament a la posició -40 des del ATG (Fuqua, *et al.*, 2001, Ferluga, *et al.*, 2007, Patankar & Gonzalez, 2009). A la Figura 4.46, es mostra un alineament realitzat entre la regió promotora del gen *luxR* de la soca E77 la qual hem estudiat l'activitat  $\beta$ -galactosidasa amb les regions promotores del gen *luxR* de les soques de *S. maltophilia* R551-3 i K279a. Amb un requadre hem identificat una possible caixa *lux* d'aquesta regió promotora, degut que comparteix l'estructura palindròmica (ombrejada en gris) característica d'aquest tipus de caixes. Els nucleòtids subratllats a la figura es corresponen al codó d'inici de la transcripció (ATG) i a la seqüència d'unió al ribosoma (RBS).



**Figura 4.46.** Alineament múltiple de les regions promotores de la unitat transcripcional formada pels ORFs *smlt1840-smlt1839* de les soques de *S. maltophilia* E77, R551-3 i K279a realitzat amb el programa ClustalW2. Putativa caixa *lux* de 20 nt present en el promotor hipotètic del gen *luxR* emmarcada entre les posicions -56 i -75 respecte el codó ATG del gen *smlt1840* de la soca E77. Ombrejats en gris es troben els nt corresponents al palíndrom en cadascuna de les soques. Seqüència subratllada a les posicions del lloc d'unió a ribosoma (RBS) i codó d'inici de la traducció (ATG).

La hipotètica caixa *lux* palindròmica es conserva entre les diferents soques de *S. maltophilia* (vegeu Figura 4.47). La regió menys conservada es troba a la part central de la caixa *lux* hipotètica de les diferents soques de *S. maltophilia*. Aquesta caixa es situa a la regió promotora que hem identificat en els apartats anteriors, la qual es conserva en totes les soques seqüenciades i es situa a la part anterior al gen *smlt1840*, el qual forma una unitat transcripcional amb el gen *smlt1839*.



**Figura 4.47.** Alineament entre les caixes *lux* hipotètiques presents a la regió promotora de cadascuna de les soques de *S. maltophilia* realitzat amb el programa ClustalW2. La regió promotora es troba anterior a la unitat transcripcional formada pels ORFs *smlt1840-smlt1839*. Els nt que conformen el palíndrom en cadascuna de les soques de *S. maltophilia* estan ombrejats en gris.

## **4.9. Anàlisi funcional del gen *smlt4572* en *S. maltophilia* E77.**

### **4.9.1. Caracterització a nivell de producció d'AHLs de la soca mutant E77 $\Delta$ *smlt4572*.**

En el cas que el gen *smlt4572* fos l'encarregat de codificar per una sintasa o aciltransferasa productora d'AHLs esperàvem la pèrdua de detecció d'AHLs en el sobrenedant concentrat de la soca *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt4572* tal i com demostren molts altres autors al realitzar soques mutants per les proteïnes sintases (Niu, *et al.*, 2008).

El primer pas per esbrinar si la sintasa hipotètica amb ORF *smlt4572*, amb major similitud a la proteïna sintasa de la família HdtS, és la responsable de la síntesi de les molècules d'AHLs detectades en el sobrenedant de *S. maltophilia* E77 ha estat realitzant una extracció de sobrenedant de la soca salvatge de *S. maltophilia* E77 i de la soca mutant E77 $\Delta$ *smlt4572*. Posteriorment, s'ha prosseguit amb un bioassaig sobre la CCF, on s'ha fet una cromatografia amb els sobrenedants de les dues soques (salvatge i mutant pel gen *smlt4572*). Els resultats obtinguts demostren que el mutant E77 $\Delta$ *smlt4572* produeix les mateixes AHLs que la soca salvatge fet que va fer decidir-nos a aturar la caracterització d'aquest mutant en aquest punt i continuar amb la caracterització del regulador del tipus LuxR.

Aquest fet suggereix que l'aciltransferasa escollida no té l'acció dual descrita per les aciltransferases homòlogues a la HdtS, les quals coordinen la biosíntesi de membrana i la producció d'AHLs.

## **4.10. Anàlisi funcional del gen *smlt1839* en *S. maltophilia* E77.**

Ni el model de QS del tipus AHL ni el rol que juga el regulador LuxR han estat estudiats en *S. maltophilia*. A continuació es presenten els estudis realitzats a nivell funcional del regulador LuxR de *S. maltophilia* E77 per abordar i aprofundir en la implicació d'aquest regulador en la motilitat del tipus *swarming* i el desenvolupament dels biofilms en aquesta espècie. Diversos autors coincideixen en que els reguladors del tipus LuxR estan implicats en tots dos processos en diverses espècies bacterianes i suggereixen que molt probablement tots dos fenotips estan relacionats (Shrout, *et al.*, 2006).

### **4.10.1. Formació de biofilms en *S. maltophilia* E77 i en el mutant E77 $\Delta$ *smlt1839*.**

La formació de biofilms és un fenotip d'elevada rellevància biomèdica i nombrosos autors han demostrat en altres bacteris gram negatius patògens la importància directa del regulador

LuxR en aquest desenvolupament (Huber, *et al.*, 2001, Tomlin, *et al.*, 2005, Gamage, *et al.*, 2011). Els resultats aquí presents són una primera aproximació de l'afectació de la mutació en el regulador *luxR* en el procés de formació de biofilms de la soca de *S. maltophilia* E77.

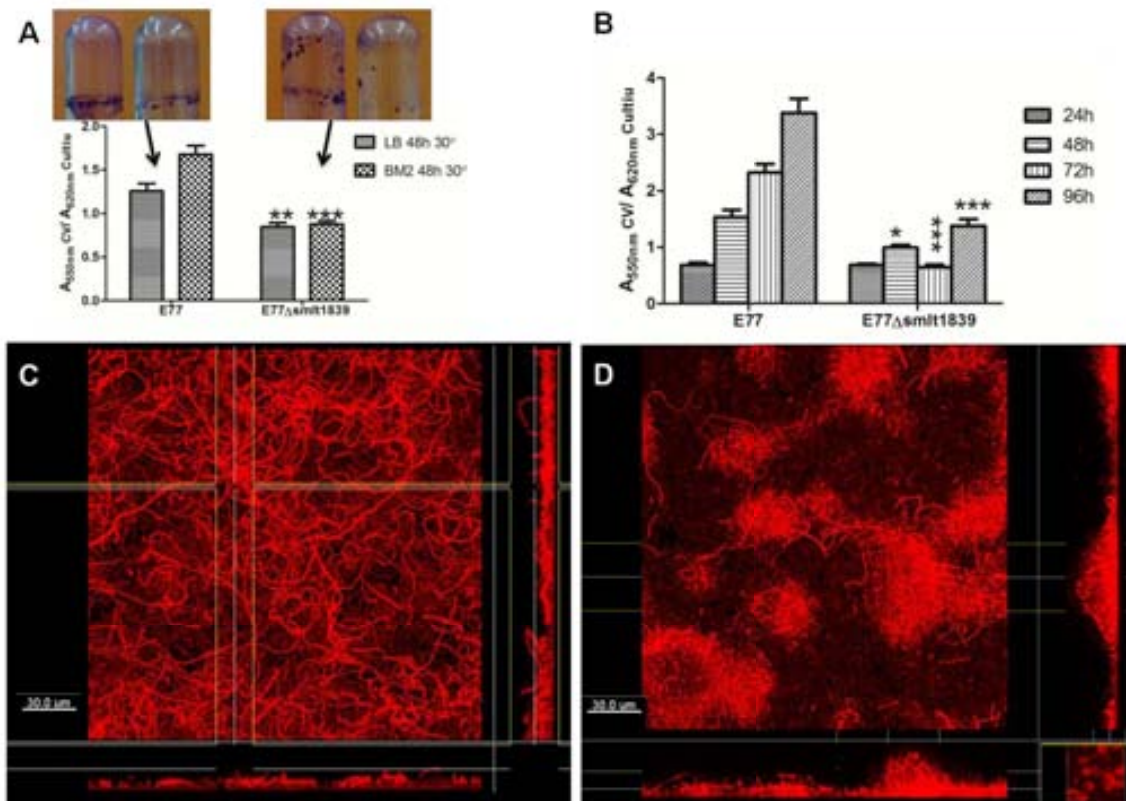
Hem abordat aquest objectiu des de diferents estratègies i perspectives, a l'hora de quantificar i valorar fenotípicament els biofilms formats per a la soca salvatge de *S. maltophilia* E77 i la soca mutant *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*.

Un assaig simple en plaques de poliestirè de 96 pous permet analitzar la formació de biofilms i fer un primera valoració dels mecanismes genètics involucrats en aquest procés sota diferents condicions de cultiu. En aquest assaig els bacteris creixen en els pous i s'avalua l'adhesió de les cèl·lules a la superfície abiòtica. Un cop eliminades les cèl·lules del sobrenedant, les cèl·lules adherides formadores del biofilm es quantifiquen després d'ésser tenyides amb CV (O'Toole & Kolter, 1998).

Primerament adonar-nos de que les primeres diferències observades entre la soca mutant i salvatge apareixen a partir de les 48 h del desenvolupament del biofilm en *S. maltophilia* E77 tal i com mostren les gràfiques A i B de la Figura 4.48. En aquestes dues gràfiques es fa una quantificació de la formació de biofilms en plaques de 96 pous en medi ric de LB a 48 h i 30 °C i medi mínim de BM2 a diferents temps (24 h a 96 h) i temperatura de 30 °C. Les absorbàncies revelen que a partir de 48 h apareixen les primeres diferències significatives ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) pel que fa a la quantificació de biofilms en la placa de 96 pous mitjançant tinció amb CV en tots dos medis (A), les quals es mantenen al llarg del temps (72 h i 96 h) amb valors significatius de  $p < 0,001$  (B).

A més a més hem observat reiteradament a ull nu, que la pel·lícula que es forma a la part més superficial del medi de cultiu en cadascun dels pous és diferent entre la soca salvatge i mutant a partir de 48 h. És per aquest motiu que s'assaja aquesta pel·lícula en tubs de vidre en les mateixes condicions de cultiu i es fa una tinció amb CV passades 48 h de l'anell que es forma a la part més superficial també anomenat *pellicle*. A les tincions dels anells mostrades a la Figura 4.48-A, hi ha evidències de que el biofilm format a la part més superficial del medi és diferent entre la soca salvatge i mutant pel gen *luxR*, ja que es forma una pel·lícula continua en la soca salvatge mentre que en la soca mutant aquesta pel·lícula és més trencadissa i tènue. Suposem que per aquest motiu l'anell o halo tenyit amb el CV sigui més evident en la soca salvatge en tots dos medis que en la soca mutant, el qual és més tènue o inexistent.





**Figura 4.48.** **A**, quantificació relativa ( $A_{550nm}CV/A_{620nm}Cultiu$ ) del biofilm format en plaques de 96 pous en medi LB i BM2 durant 48 h a 30°C de les soques *S. maltophilia* E77 i *S. maltophilia* E77Δsmlt1839 i tinció de la pel·lícula de biofilm formada en la part més superficial del tub de vidre en les mateixes condicions. **B**, quantificació relativa ( $A_{550nm}CV/A_{620nm}Cultiu$ ) del biofilm format en plaques de 96 pous en BM2 a 24 h, 48 h, 72 h i 96 h a 30 °C. CLSM imatges de l'arquitectura de biofilm de *S. maltophilia* E77 (**C**) i *S. maltophilia* E77Δsmlt1839 (**D**) després de 96h d'incubació en medi FABL en les cambres de flux. La imatge central mostra la simulació de fluorescència de les projeccions obtingudes de dalt a baix i les imatges dels costats mostren les seccions verticals (Imaris). La barra en C i D indica 30 μm. Els resultats en A i B són la mitjana de com a mínim de tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$  s'ha considerat significatiu mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni. En aquest anàlisi s'indiquen les diferències significatives entre la formació de biofilm de la soca mutant pel gen *smlt1839* respecte la soca salvatge a diferents temps i medis.

Per tal d'investigar més acuradament les diferències en el desenvolupament del biofilm entre *S. maltophilia* E77 salvatge i mutant pel gen *luxR*, s'han utilitzat cambres artificials sotmeses a un flux continu que permeten analitzar els biofilms sota condicions hidrodinàmiques i estudiar a temps real el desenvolupament del biofilm sobre una superfície de vidre. Aquest estudi s'ha fet a partir de condicions determinades, ja utilitzades prèviament en *S. maltophilia* K279a pels autors Ryan, et al., (2008) i que s'expliquen més detalladament en l'apartat de Materials i Mètodes 3.16. Per altra banda, acoblar aquesta tècnica a l'ús de la microscòpia laser confocal (CLSM) ens permet monitorar a temps real les estructures del biofilm que es van formant al llarg del temps i obtenir imatges tridimensionals de la construcció del biofilm de les soques d'estudi. El marcatge de cèl·lules s'ha realitzat a partir de



l'electroporació del plasmidi pMP7605 (Lagendijk, *et al.*, 2010), el qual conté una fusió entre el promotor *tac* i la proteïna mCherry sobre la soca salvatge i mutant. Aquest marcatge s'ha realitzat amb aquesta proteïna per a estudiar les interaccions interespecífiques en biofilms mixtes formats entre *S. maltophilia* (expressió en *trans* proteïna mCherry en vector replicatiu) i *P. aeruginosa* (marcada amb la proteïna Gfp mitjançant la inserció en el cromosoma amb el transposó mini-Tn7 (Choi & Schweizer, 2006)). Aquests biofilms mixtes ens interessa estudiar-los en un futur degut que aquests dos organismes coexisteixen en biofilms a la natura i són patògens nosocomials de rellevada importància, els quals són aïllats molt freqüentment formant coinfecció en el pulmó en pacients amb FQ (Graff & Burns, 2002, Berg, *et al.*, 2005). Les soques de *S. maltophilia* E77 marcades amb el plasmidi pMP7605 van ser testades al laboratori a nivell de creixement i formació de biofilms en plaques de 96 pous i no es van observar diferències respecte les soques no marcades.

A la part inferior de la Figura 4.48, en les imatges C i D, es mostren els resultats preliminars per manca de tres experiments independents. Tot i així, creiem que són resultats molt interessants ja que corroboren les diferències significatives en la formació de biofilms quantificades en les plaques de 96 pous entre la soca salvatge i mutant. L'inspecció visual de les imatges obtingudes pel CLSM (Figura 4.48 (C i D)), denoten diferències entre la soca salvatge i la mutant després de 96 h d'incubació, no només a nivell de cobertura del substrat i gruix (com ja s'havia previst en els assaigs de tinció en plaques de 96 pous) sinó que també demostren diferències significatives a nivell d'estructura del biofilm. La imatge C, corresponent a la soca salvatge *S. maltophilia* E77pMP7605, manté la mateixa estructura filamentosa de biofilms que la soca clínica K279a tal i com ja havien constatat i descrit els autors Ryan, *et al.*, (2008), la qual és molt diferent a l'estructura de *mushrooms* altament descrita en *P. aeruginosa* (Davies, *et al.*, 1998). Aquesta estructura tridimensional filamentosa composta de cadenes de cèl·lules s'ha descrit també en l'espècie *S. marcescens* (Labbate, *et al.*, 2004, Rice, *et al.*, 2005). Amés a més observem que la soca mutant pel regulador LuxR (imatge D) tendeix a perdre aquesta estructura filamentosa així com el cobriment de la superfície no és uniforme degut a la formació d'estructures aberrants.

Durant les primeres 24h l'aspecte del biofilm entre la soca salvatge i mutant és molt similar en aquest assaig (dades no mostrades). L'estructura del biofilm es va diversificant un cop s'ha produït l'adhesió inicial de les cèl·lules a la superfície, la qual tendeix a ser més feble en els assaigs realitzats en la soca mutant (un cop superades les 48h). Aquest aspecte fenotípic

visualitzat amb el microscopi làser confocal corrobora els valors quantitius obtinguts amb la tinció de CV passades 48h.

No s'han pogut fer estudis estadístics de les imatges capturades mitjançant el programari COMSTAT per manca de tres experiments independents en el temps. Aquest, permet fer un anàlisi de totes les imatges obtingudes i calcular de forma objectiva paràmetres com la biomassa, el gruix del biofilm i recobriment de la superfície entre altres característiques a partir de diferents experiments independents. Tot i els esforços dedicats en posar a punt aquesta tècnica creiem que calen més assaigs per tal de corroborar el fenotip esmentat anteriorment i poder realitzar estudis estadístics amb les imatges capturades al llarg del temps. Queden per analitzar també, els biofilms formats conjuntament entre les soques de *S. maltophilia* i *P. aeruginosa*.

Respecte els estudis realitzats anteriorment per Ryan *et al.*, (2008), en aquest treball s'ha avançat pel que fa al marcatge de cadascuna de les soques. Mitjançant la metodologia emprada, ens permet investigar al llarg del temps el desenvolupament i morfologia dels biofilms de cadascuna de les espècies estudiades en el biofilm mixt sense la necessitat de tenyir les cèl·lules i aturar l'experiment en cada anàlisi.

#### **4.10.2. Motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 i en el mutant E77 $\Delta$ smlt1839.**

Molts estudis recents han relacionat la importància de la motilitat del tipus *swarming* amb la capacitat de formar biofilms de *P. aeruginosa* (Shrout, *et al.*, 2006, Caiazza, *et al.*, 2007, Overhage, *et al.*, 2008). Aquest és el primer treball realitzat que examina el possible rol del QS en la regulació de la motilitat del tipus *swarming* en l'espècie *S. maltophilia*.

La motilitat del tipus *swarming*, es mesura emprant plaques de *swarming* que ens permeten assajar aquesta motilitat a partir de la sembra d'una colònia sobre la superfície d'una placa d'agar semi-sòlida i avaluar el diàmetre i la morfologia del halo després d'un període d'incubació. La composició del medi és determinant per iniciar el procés de *swarming* i és específic per a cada espècie. Les condicions més òptimes per aquesta motilitat han estat estudiades al laboratori per Ferrer-Navarro, *et al.*, (2013) i el mètode escollit per aquest treball és explicat en l'apartat de Materials i Mètodes 3.17.

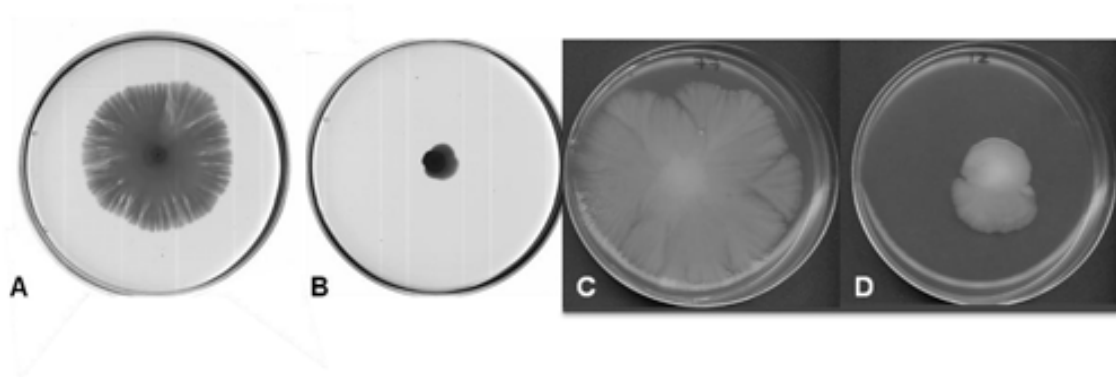
Per tal d'investigar si la motilitat del tipus *swarming* podria estar regulada pel regulador LuxR de *S. maltophilia* E77 s'ha realitzat una comparativa entre la soca salvatge *S. maltophilia* E77 i la soca mutant pel regulador *luxR*.

A la Figura 4.49, es mostra el fenotip de la motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* E77 en les plaques de medi BM2-agar (0,5%) a 30 °C després de 7 dies (A) i 11 dies (C) d'incubació. No és una velocitat de moviment a través de la placa molt elevada si ho comparem amb *P. aeruginosa* la qual pot colonitzar tota la placa en 24h en quasi les mateixes condicions. Altres autors com ara Julkowska, *et al.*, (2005) ja han descrit motilitats lentes tal i com el que succeeix a *S. maltophilia*.

En aquesta mateixa Figura 4.49, també veiem que la soca que té deletat el regulador *luxR*, *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*, és deficient per aquest tipus de motilitat després de 7 dies (B) o 11 dies d'incubació (D), mentre que la colònia de la soca salvatge colonitza tota la superfície d'agar després de 11 dies d'incubació (C). Les soques han estat inoculades al centre de la placa on es forma un botó cel·lular i des d'allà les cèl·lules de la soca salvatge adquireixen el fenotip de *swarm cells* i colonitzen de forma coordinada tota la superfície mostrant un fenotip ramificat, mentre que en la soca mutant no es produeix aquesta diferenciació. Altres autors ja han descrit la deficiència fenotípica en aquest tipus de motilitat en mutants realitzats sobre reguladors de QS del tipus LuxR (Kohler, *et al.*, 2000, Huber, *et al.*, 2001, Lazenby, *et al.*, 2013).

Les diferències en el comportament de la soca mutant respecte la soca salvatge pel que fa a les motilitats del tipus *swimming* i *twitching* són indistingibles, el que indica que aquest tipus de motilitat no estaria regulada pel regulador LuxR en *S. maltophilia*, mentre que la motilitat del tipus *swarming* sí sembla està influenciada per aquest regulador.

La manca de motilitat del tipus *swarming* en les espècies de *P. aeruginosa*, *S. liquefaciens* o *B. cepacia* s'ha demostrat que es deu a la manca de producció de biotensioactius controlats pel QS (Ochsner & Reiser, 1995, Lindum, *et al.*, 1998, Huber, *et al.*, 2001).



**Figura 4.49.** Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 salvatge (A i C) i mutant *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* (B i D) en medi BM2-agar (0,5%) a 30 °C durant 7 dies (A i B) i 11 dies d'incubació (C i D). Inòcul de colònia fresca en el centre de les placa de *swarming*. Aquests resultats són l'exemple visual de mínim tres experiments independents. Plaques de Petri de 90 mm.

#### 4.11. Efecte dels inhibidors de *quorum sensing* en *S. maltophilia* E77.

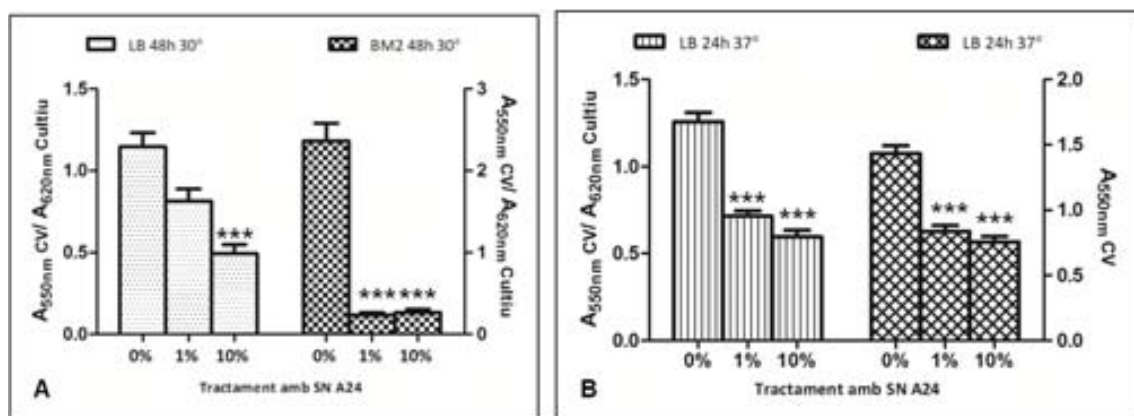
Durant la darrera dècada, s'han realitzat nombrosos estudis per tal d'investigar l'efecte dels IQS en diferents processos biològics regulats pel QS en les diferents espècies bacterianes. En aquest treball, ens centrarem amb l'efecte de la lactonasa en diferents processos biològics que hem vist que podrien estar regulats pel QS en *S. maltophilia* E77, degut que hem observat diferències significatives entre la soca mutant i salvatge pel gen *luxR* en els fenotips de *swarming* i formació de biofilms.

Diversos treballs han estudiat l'efecte que podria tenir en la soca d'estudi l'expressió heteròloga del gen *aiiA* provinent de la soca *B. subtilis* A24, que codifica per l'enzim lactonasa sota el promotor constitutiu *lac* en un vector d'expressió replicatiu. S'estudia l'expressió d'aquest gen per tal d'identificar diferents processos regulats pel QS, com podrien ser la formació de biofilms i la motilitat (Reimmann, *et al.*, 2002, Liu, *et al.*, 2011). Altres autors subratllen que els sobrenedants provinents de diferents soques de *Bacillus* sp., degraden les AHLs produïdes per *B. pseudomallei* atribuint-ho a que l'enzim lactonasa s'allibera a l'espai extracel·lular sense necessitat d'expressar el gen *aiiA* de forma heteròloga per tal d'estudiar l'activitat IQS en la soca d'estudi (Ramli, *et al.*, 2012). Aquests autors, analitzen els efectes IQS que produeixen els sobrenedants extrets de *Bacillus* sp en la formació de biofilms i demostren que en aquest procés les AHLs són de rellevada importància en els aïllats clínics de *B. pseudomallei* (Ramli, *et al.*, 2012). A continuació mostrem els resultats obtinguts en aquest treball a partir de sobrenedants extrets de *B. subtilis* A24 en dos processos que podrien estar regulats pel QS en *S. maltophilia* E77 permetent-nos interpretar com afecten les AHLs

detectades en el sobrenedants d'aquesta espècie, així com la importància que suposa la permanència del regulador del tipus LuxR en aquesta espècie.

#### 4.11.1. Efecte de l'enzim lactonasa AiiA com a IQS en la formació de biofilms.

En aquest apartat hem estudiat l'efecte que té el sobrenedant filtrat provinent d'un cultiu de nit a 30 °C en medi LB de la soca *B. subtilis* A24 en la formació de biofilms en la soca d'estudi *S. maltophilia* E77 en plaques de 96 pous. Tal i com presentem a la Figura 4.50-A, observem una disminució en el desenvolupament biofilm quan afegim un 1 % o un 10 % de sobrenedant de la soca A24 ( $p < 0,001$ ) en ambdós medis (LB i BM2) respecte els pous on no s'hi addiciona. Vegeu com s'ha realitzat aquest experiment a l'apartat de Materials i Mètodes 3.16.



**Figura 4.50.** Inhibició en la formació de biofilms de *S. maltophilia* E77 (A) i *P. aeruginosa* MPAO1 (B). Tractament amb sobrenedant (SN) de *B. subtilis* A24 a concentracions de 1% i 10% com a IQS en assaigs realitzats en plaques de 96 pous en medi LB i BM2 a 30 C i 48 h (A) o medi LB a 37°C i 24 h (B). Quantificació relativa ( $A_{550nm} CV / A_{620nm} Cultiu$ ) del biofilm format en plaques de 96 pous. Els resultats en A i B són la mitjana de com a mínim de tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments. \*\*\* $p < 0,001$  s'ha considerat significatiu mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni. En aquesta anàlisi s'indiquen diferències significatives entre la formació de biofilm amb tractament del 1 % o 10 % de SN A24 respecte la formació de biofilm sense tractament 0 % de SN A24.

Resultats similars obtenen els autors Ramli *et al.*, (2012), quan estudien l'efecte dels sobrenedant filtrat sobre diferents soques clíniques de *B. pseudomallei* i sostenen que la inhibició en la formació de biofilms és degut a l'activitat IQS dels sobrenedants de les diferents soques de *Bacillus* sp. testades degut a l'enzim AiiA. En aquest treball també s'ha realitzat el mateix experiment IQS mitjançant el sobrenedant de *B. subtilis* A24 sobre la formació de biofilms de la soca *P. aeruginosa* MPAO1 en medi LB i a 37 °C (Figura 4.50-B). Els valors obtinguts demostren activitat IQS del sobrenedant de *B. subtilis* A24 amb diferències significatives de  $p < 0,001$  entre els biofilms tractats respecte els no tractats amb sobrenedant. Les dues gràfiques mostrades per *P. aeruginosa* MPAO1 es diferencien una de l'altra en que en

la primera té en compte la densitat òptica del cultiu en cadascun dels pous o s'ha revelat la formació de biofilms mentre que l'altre no. Com podem observar la presència de fins a un 10 % de sobrenedant filtrat no afecta el creixement de les soques en cadascun dels pous ja que els valors obtinguts en funció de la densitat òptica del cultiu no condicionen els resultats obtinguts.

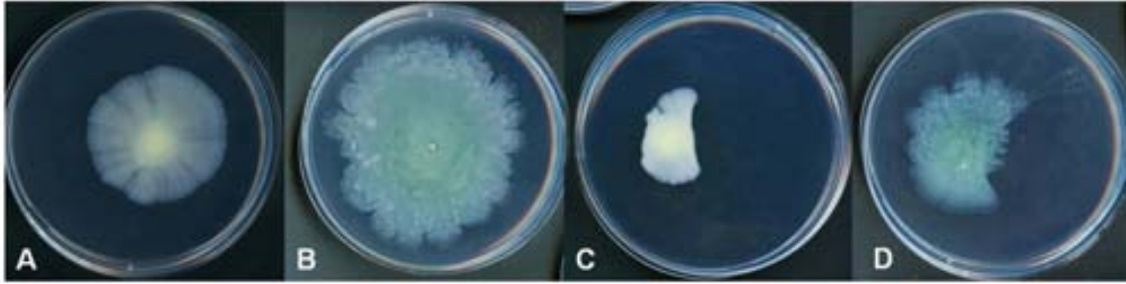
En aquest assaig hem detectat com el sobrenedant filtrat d'un cultiu de nit de *B. subtilis* A24 exhibeix activitat IQS ja que influencia en la formació de biofilms possiblement perquè degrada les AHLs que podrien tenir un rol important en aquest procés en *S. maltophilia* E77 i *P. aeruginosa* MPAO1. Aquests resultats suggereixen que seguir treballant amb diferents IQS podria ser una bona eina per paraitzar el sistema de QS en els bacteris patògens a través de la inactivació dels senyals de QS. Prèviament al nostre estudi ja s'ha demostrat l'eficàcia de compostos anàlegs a les AHLs usades com a IQS per inhibir la formació de biofilms en *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* (Ding, *et al.*, 2011).

#### **4.11.2. Efecte de l'enzim lactonasa AiiA com a IQS en la motilitat del tipus *swarming*.**

Experiments anteriors demostren que l'expressió heteròloga del gen *aiiA* de *B. subtilis* A24 i del *Bacillus* sp 240B1 redueix la motilitat del tipus *swarming* en *P. aeruginosa* i *B. cepacia* respectivament (Reimann, *et al.*, 2002, Wopperer, *et al.*, 2006).

En aquest apartat s'assaja el sobrenedant filtrat provinent d'un cultiu de nit ben crescut a 30 °C de la soca *B. subtilis* A24, sobre la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 quan s'addicionen 50 µl d'aquest sobrenedant en les plaques de *swarming* a 2 cm de l'inòcul inicial. Vegeu esquema a la Figura 3.20 a l'apartat de Materials i Mètodes 3.17. Com a control hem afegit a l'assaig la soca *P. aeruginosa* MPAO1.

A la Figura 4.51 (C i D), podem apreciar un cop més, l'efecte inhibitori que exerceix el sobrenedant filtrat de *B. subtilis* A24 en la motilitat de *S. maltophilia* E77 i *P. aeruginosa* MPAO1 respecte les plaques on no s'hi afegeix aquest sobrenedant (A i B) respectivament. S'evidencia l'activitat IQS del sobrenedant de *B. subtilis* A24 ja que interfereix en la motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* E77 i *P. aeruginosa* MPAO1 en la zona propera on s'ha dipositat el sobrenedant de *B. subtilis* A24. Com s'aprecia a la Figura 4.51, la motilitat de les dues soques és normal fins que sofreix l'efecte inhibitori que exerceix el sobrenedant de *B. subtilis* A24 sobre la motilitat en eixam d'ambdues soques.



**Figura 4.51.** Motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* E77 (A) i *P. aeruginosa* PAO1 (B) en plaques de medi BM2 a 30 °C durant 7 dies i 24 h respectivament. Efecte IQS del sobrenedant de *B. subtilis* A24 en la motilitat del tipus *swarming* de E77 (C) i MPAO1 (D). S'han dipositat 50 µl de sobrenedant filtrat de A24 a 2 cm de l'inòcul inicial. Aquests resultats són l'exemple visual de mínim tres experiments independents Plaques de Petri de 90 mm.

#### 4.12. Estimulació del *swarming* en *S. maltophilia* E77.

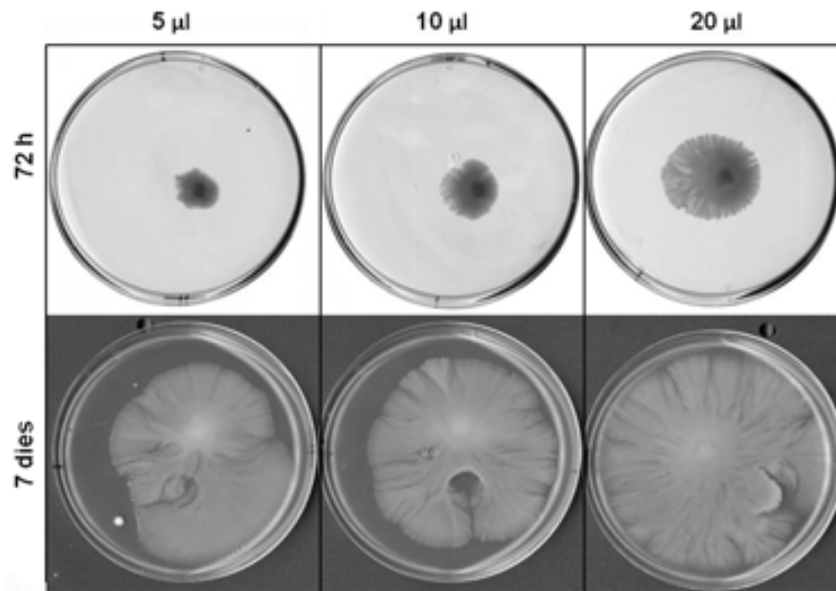
Una eina que s'ha usat en el laboratori per a estudiar la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 ha estat mitjançant l'addició de sobrenedants concentrats extrets de *P. aeruginosa* MPAO1. En aquest apartat es pretén estudiar l'activitat estimuladora del sobrenedant extret de *P. aeruginosa* MPAO1 en les plaques de *swarming* i valorar si els biotensioactius o AHLs extrets amb acetat d'etil del sobrenedant de diferents fons genètics de *P. aeruginosa* MPAO1 poden afectar a la motilitat de *S. maltophilia*.

##### 4.12.1. Efecte del sobrenedant concentrat total de *P. aeruginosa* MPAO1.

Aquest experiment s'ha dut a terme en plaques de *swarming* afegint a 2 cm del lloc de l'inòcul inicial diferents quantitats de sobrenedants concentrats provinents *P. aeruginosa* MPAO1 i s'ha estudiat l'estimulació de, la motilitat del tipus *swarming* en la soca E77 al llarg del temps.

A la Figura 4.52 es pot apreciar que els sobrenedants extrets de *P. aeruginosa* MPAO1 indueixen la motilitat del tipus *swarming* en la soca de *S. maltophilia* E77. Des de les 72h es poden observar les primeres prolongacions d'aquest moviment originades des del lloc on es diposita la colònia de *S. maltophilia* E77, mentre que en condicions normals aquest efecte no passa en tan poques hores. Després d'una setmana, el *swarming* obtingut a partir de la l'addició del sobrenedant concentrat de *P. aeruginosa* MPAO1 és quasi equivalent al *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 sense afegir cap inductor en el medi després de 11 dies (Vegeu Figura 4.49). Per tant, s'evidencia que l'addició d'extraccions de sobrenedants concentrats duplica la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 respecte les condicions normals. Aquesta inducció és concentració depenent, ja que quan afegim més quantitat de sobrenedant

concentrat la inducció és major. Inicialment podem atribuir aquesta inducció a la presència de biotensioactius en el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 que estimulin la motilitat en *S. maltophilia* E77.



**Figura 4.52.** Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 amb presència de sobrenedant concentrat extret amb acetat d'etil de *P. aeruginosa* MPAO1 durant 72 h i 7 dies en medi BM2-agar (0,5 %) a 30 °C. S'indiquen les quantitats de sobrenedant dipositades en cada placa de 5 µl, 10 µl i 20 µl respectivament a 2 cm de l'inòcul inicial. Aquests resultats són l'exemple visual de mínim tres experiments independents. Plaques de Petri de 90 mm.

#### 4.12.2. Efecte del sobrenedant concentrat total de *P. aeruginosa* MPAO1 que expressa de forma heteròloga del gen *aiiA* de *B. subtilis* A24.

Per tal de corroborar l'efecte estimulador que produeixen els biotensioactius presents en el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 en la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77, a continuació s'ha volgut estudiar com afectaria l'expressió heteròloga del gen *aiiA* en la soca *P. aeruginosa* MPAO1. El gen *aiiA* codifica per una lactonasa que disminueix la concentració de les AHLs degut a l'activitat IQS, entre elles les del tipus C4-HSL, les quals regulen unint-se al regulador RhIR la producció de ramnolípidis en *P. aeruginosa*. Els ramnolípidis són molt importants per la motilitat del tipus *swarming* en aquesta espècie (Kohler, *et al.*, 2000, Caiazza, *et al.*, 2005, Shrout, *et al.*, 2011).

##### 4.12.2.1. Caracterització dels sobrenedants de *P. aeruginosa*.

És per aquest motiu que s'ha electroporat sobre la soca *P. aeruginosa* MPAO1 el plasmidi pME6863 que conté el gen *aiiA* sota el control de promotor *lac* (*Plac::aiiA*) o bé el plasmidi pME6000 (plasmidi control sense el gen *aiiA*) dissenyats per Reimann, *et al.*, (2002). S'han

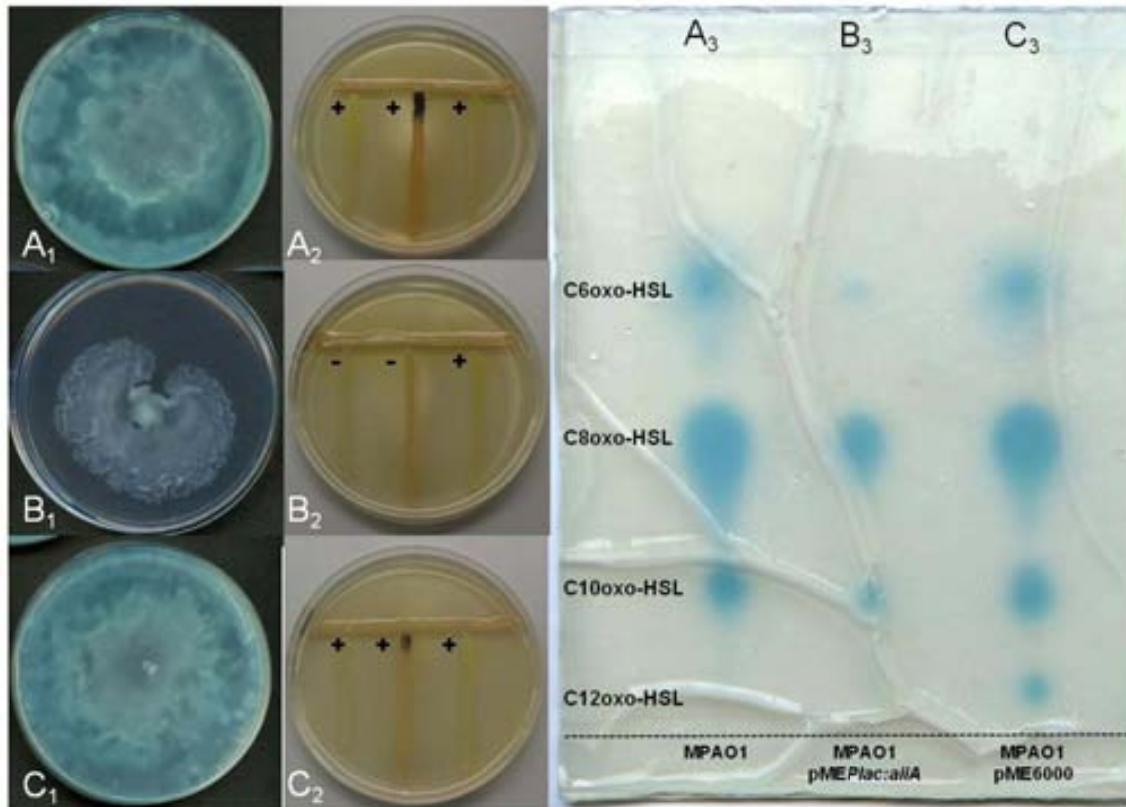


obtingut les soques de *P. aeruginosa* MPAO1 que hem anomenat en aquest treball, MPAO1pMEPlac::*aiiA* i MPAO1pME6000. A continuació, es fa una caracterització fenotípica a nivell de concentració d'AHLs a partir de bioassaigs realitzats amb diferents soques biosensores, efectació en la motilitat deguda a una disminució en la producció de ramnolípid i estimació a ull nu dels biotensioactius presents en el sobrenedant.

A la Figura 4.53, es fa un estudi a nivell de motilitat de tipus *swarming* de les soques *P. aeruginosa* MPAO1 (A<sub>1</sub>) MPAO1pMEPlac::*aiiA* (B<sub>1</sub>) i MPAO1pME6000 (C<sub>1</sub>) i observem la disminució en la motilitat del tipus *swarming* de la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA* respecte la soca salvatge i control (quan s'incuben durant 24 h a 37 °C).

Pel que fa a la caracterització d'AHLs, a la Figura 4.53, s'observa que la detecció d'AHLs produïdes per les soques MPAO1 (A<sub>2</sub>) i MPAO1pME6000 (C<sub>2</sub>) és positiva quan es realitzen els bioassaigs en forma de "T" enfrontant les estries de les soques problema amb les tres les soques biosensores escollides per aquest assaig. La detecció de les AHLs presents en el sobrenedant de la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA* (B<sub>2</sub>) és negativa amb la soca biosensora *C. violaceum* CV026 i la soca d'*E. coli* MT102 (pJBA132) degut a la degradació d'AHLs de cadena curta i llarga exercida per l'enzim lactonasa. Mentre que la detecció ha estat positiva amb el bioassaig realitzat amb la soca biosensora d'*E. coli* JM105 (pJBA89). Aquest fet es deu a que aquesta soca és més sensible que les anteriors a menors quantitats d'AHLs ja que la hidròlisi produïda per l'enzim de la lactonasa no és completa. Recordar que l'enzim lactonasa degrada tot tipus de molècules d'AHLs, tan de curta com de cadena llarga (Dong, *et al.*, 2000).

Mitjançant una segona estratègia podem afirmar que la l'expressió heteròloga del gen *aiiA* suposa una disminució de la concentració d'AHLs en la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA*. S'ha realitzat una CCF CCF dels tipus C<sub>18</sub> de fase reversa amb els sobrenedants concentrats extrets amb acetat d'etil de les tres soques d'estudi de *P. aeruginosa*. En el bioassaig realitzat damunt la CCF amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* KYC55 (la més sensible que disposem al laboratori) es pot apreciar la disminució de les AHLs en el sobrenedant de la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA* (B<sub>3</sub>) respecte les soques control MPAO1 (A<sub>3</sub>) i MPAO1pME6000 (C<sub>3</sub>). S'observen diferents taques que es corresponen a diferents tipus d'AHLs (C12oxo-HSL, C10oxo-HSL, C8oxo-HSL i C6oxo-HSL) extretes en les mateixes condicions de cultiu per cadascuna de les soques.



**Figura 4.53.** Motilitat del tipus *swarming* de les soques de *P. aeruginosa*; **A<sub>1</sub>**, MPAO1, **B<sub>1</sub>**, MPAO1pMEPlac::aiiA i **C<sub>1</sub>**, MPAO1pME6000 en medi BM2 a 37 °C i 24 h. Bioassaig soques *P. aeruginosa*; **A<sub>2</sub>**, MPAO1, **B<sub>2</sub>**, MPAO1pMEPlac::aiiA i **C<sub>2</sub>**, MPAO1pME6000 en estries horitzontals enfrontades mitjançant una "T" enfront de les tres soques biosensores disposades en les estries verticals d'esquerra a dreta: *E. coli* MT102 (pJBA132), *C. violaceum* CV026 i *E. coli* JM105 (pJBA89) en medi LB a 30 °C. CCF del tipus C<sub>18</sub> de fase reversa amb sobrenedants concentrats de les soques de *P. aeruginosa*; **A<sub>3</sub>**, MPAO1, **B<sub>3</sub>**, MPAO1pMEPlac::aiiA i **C<sub>3</sub>**, MPAO1pME6000 són separats mitjançant la capa fina i el solvent orgànic de metanol /aigua (60:40, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30° C. Plaques de Petri de 90 mm.

A continuació, s'examina la concentració de biotensioactius presents en els cultius cel·lulars de les soques de *P. aeruginosa* MPAO1, MPAO1pMEPlac::aiiA i MPAO1pME6000 a través d'un experiment molt senzill que serveix per a estimar a ull nu la concentració de biotensioactius presents en el sobrenedant. L'experiment es realitza a partir de dipositar 10 µl de sobrenedant provinent d'un cultiu de nit saturat sobre una superfície hidròfoba, com per exemple la tapa d'una placa de Petri, on s'assaja la capacitat d'un agent tensioactiu que permet disminuir la tensió superficial de l'aigua (Jain, *et al.*, 1991, Lindum, *et al.*, 1998). A la Figura 4.54 es pot observar que la concentració de ramnolípid és menor en la soca MPAO1pMEPlac::aiiA (B) degut que la gota no s'expandeix sobre la superfície de la placa de Petri de la mateixa manera que les gotes de MPAO1 (A) i control MPAO1pME6000 (C). Aquest fet, revela que l'expressió heteròloga del gen *aiiA*, el qual disminueix de forma substancial la

quantitat d'AHLs i que al seu torn implica una disminució en la producció de ramnolípids, provoqui una disminució en la motilitat de la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA*, tal i com s'ha pogut valorar en la Figura 4.53.

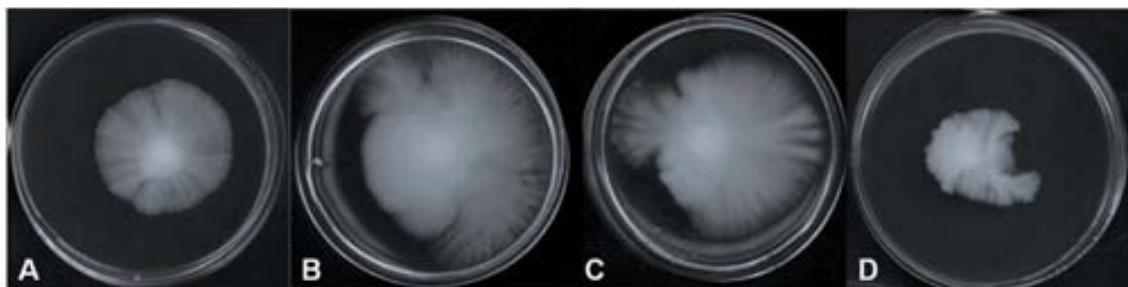


**Figura 4.54.** Test de la gota per a comparar la quantitat de ramnolípids presents en 10 µl de sobrenedant provinent de cultiu de nit saturat de les soques de *P. aeruginosa* MPAO1 (A), MPAO1pMEPlac::*aiiA* (B), MPAO1pME6000 (C) dipositats sobre la tapa d'una placa de Petri. Vista lateral.

#### 4.12.2.2. Efecte del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1pMEPlac::*aiiA*.

Un cop fet l'anàlisi fenotípic de l'expressió heteròloga del gen *aiiA* en la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA* i demostrar que la concentració d'AHLs detectades així com la concentració de ramnolípids és notòriament inferior afectant a la motilitat del tipus *swarming* respecte les soques control, s'ha prosseguit a estudiar si el sobrenedant extret de la soca MPAO1pMEPlac::*aiiA* estimula de la mateixa forma la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77.

A la Figura 4.55 es pot contemplar l'efecte en la motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* E77 (A), quan s'addicionen a les plaques de *swarming* 10 µl de sobrenedant concentrat extrets amb acetat d'etil provinents de les soques MPAO1 (B), MPAO1pME6000 (C) i MPAO1pMEPlac::*aiiA* (D). S'observa que el sobrenedant de MPAO1pMEPlac::*aiiA* no estimula la motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 tal i com hem vist que si ho fa el sobrenedant extret de MPAO1 (B) o la soca control de MPAO1pME6000 (C) i ho atribuïm a la disminució ramnolípids presents en el sobrenedant de MPAO1pMEPlac::*aiiA*.



**Figura 4.55.** Motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* E77 sense addicionar cap substància a la placa (A) i amb sobrenedant concentrat de *P. aeruginosa* MPAO1 (B), MPAO1pME6000 (C) i MPAO1pMEPlac::*aiiA* (D) en medi BM2 a 30 °C durant 7 dies. S'han dipositat 10 µl de sobrenedant extret amb acetat d'etil a 2 cm de l'inòcul inicial. Aquests resultats són l'exemple visual de mínim tres experiments independents. Plaques de Petri de 90 mm.

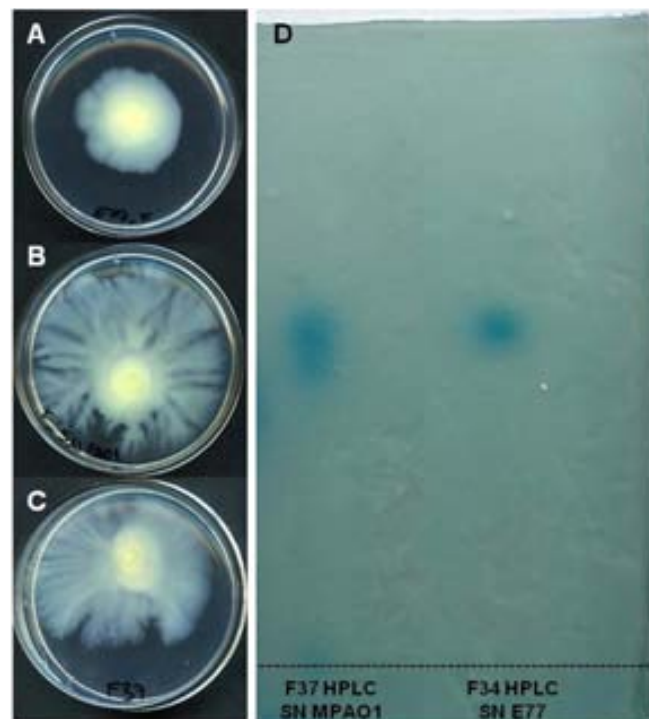
#### **4.12.3. Efecte de les fraccions obtingudes per HPLC a partir de la separació del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1.**

Una segona hipòtesi que planteja aquesta inducció en la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77, és si a través dels sobrenedants concentrats existeix una possible comunicació interespecífica entre les molècules d'AHL presents en els sobrenedants de *P. aeruginosa* MPAO1 i el regulador LuxR de *S. maltophilia* E77. Aquests sobrenedants provenen d'extraccions amb acetat d'etil, solvent que hem usat per extreure aquest tipus de molècules.

Per tal d'esbrinar si alguna molècula/molècules d'AHLs presents en el sobrenedant provinent de *P. aeruginosa* MPAO1 podria estar induint la motilitat en *S. maltophilia* E77 s'ha separat per HPLC el sobrenedant extret de la soca *P. aeruginosa* MPAO1 seguint el mateix procediment que per la soca *S. maltophilia* E77 tal i com s'explica en l'apartat de Materials i Mètodes 3.4. S'han testat en les plaques de *swarming* cadascuna de les 60 fraccions recollides per HPLC, a partir de la separació del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1, i s'ha estudiat la possible inducció del *swarming* en *S. maltophilia* E77 tal i com s'estudia amb el sobrenedant total. Només la fracció corresponent a la número 37 (F37) indueix la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 quasi de la mateixa manera que l'extracte total de sobrenedant tal i com es pot apreciar a la Figura 4.56. Per tal de distingir si aquesta inducció es pot atribuir a una molècula d'AHL s'ha realitzat un bioassaig en placa de la fracció 37 amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* KYC55 (dades no mostrades). La fracció ha estat positiva i per tant s'ha prosseguit a separar aquesta fracció mitjançant CCF per a caracteritzar de forma preliminar la molècula d'AHL present en aquesta fracció, seguint els procediments explicats en l'apartat de Materials i Mètodes 3.6.

Degut a la proximitat de la F37 activadora del *swarming* en *S. maltophilia* E77 amb el temps de retenció en HPLC de la molècula sintètica C8-HSL (F34-F35) s'ha realitzat una CCF amb les fraccions 37 i 34 corresponents a la separació per HPLC dels sobrenedants de MPAO1 i E77 respectivament. Les taques tenen temps de retenció molt similars en la CCF de *Silica gel* 60 mentre que el temps de retenció a la columna de HPLC no es corresponen amb les mateixes fraccions. El percentatge de ACN de la fracció F34 de la molècula sintètica C8-HSL en el HPLC és del 36 % v/v de ACN en aigua Chromasolv® grau HPLC (Sigma). El mateix percentatge de ACN té la fracció F34 provinent del sobrenedant de *S. maltophilia* E77 separat per HPLC per a detectar i caracteritzar les molècules d'AHLs per CCF i MS en apartats anteriors. Mentre que la fracció F37 del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 que ha activat el *swarming* en *S. maltophilia* E77 conté el 39 % v/v de ACN en aigua Chromasolv® grau HPLC (Sigma). Això ens

indica que probablement la F37 contingui la molècula C10oxo-HSL la qual per cromatografia HPLC ha de tenir un temps de retenció posterior a la C8-HSL (F34) i anterior a la C10-HSL (F44) amb la metodologia emprada en aquest treball. Les molècules C8-HSL i C10oxo-HSL migren per CCF (*Silica gel 60* o  $C_{18}$  de fase reversa) amb gairebé el mateix temps de retenció i es diferencien l'una de l'altre en que la substitució carbonil en el tercer carboni provoca una taca en forma de llàgrima (Shaw, *et al.*, 1997). La caracterització preliminar en CCF de la Fracció F37 (Figura 4.56) indica que té un valor  $R_f$  molt similar a la C8-HSL (present a la fracció F34) i que es diferencia d'aquesta per la forma de llàgrima degut a la substitució -oxo en el tercer carboni.



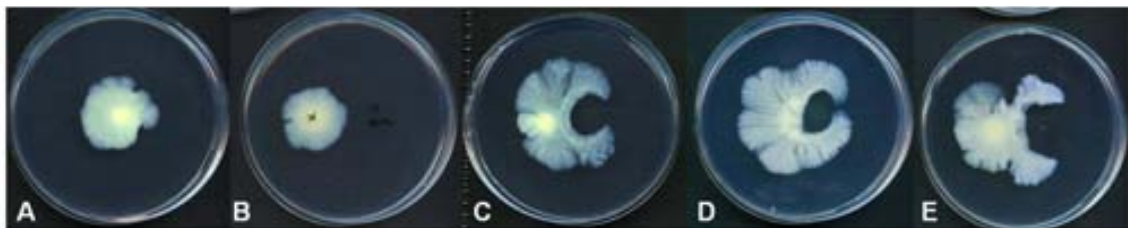
**Figura 4.56.** Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 salvatge (A), amb presència de 10  $\mu$ l de sobrenedant concentrat total extret amb acetat d'etil de *P. aeruginosa* MPAO1 (B), fracció F37 provinent de la separació per HPLC del sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 (C) en medi BM2-agar (0,5 %) a 30 °C durant 7 dies en plaques de Petri de 55 mm. D, CCF dels tipus *Silica gel 60* de les fraccions obtingudes en HPLC dels sobrenedants concentrats de *P. aeruginosa* MPAO1 (F37) i *S. maltophilia* E77 (F34) són separades mitjançant la capa fina i el solvent orgànic d'acetona/hexà (55:45, v/v). Posteriorment es revela la CCF amb una capa de medi AT-agar tou i X-gal amb suspensió de la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55 i s'incuba 24 h a 30 °C.

La inducció per part d'una molècula d'AHL sobre la motilitat de tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77 ens dona una evidència de que probablement la inducció d'aquesta motilitat podria també estar relacionada amb la presència d'AHLs en els sobrenedants concentrats extrets de *P. aeruginosa* MPAO1. Els resultats obtinguts suggereixen que el regulador LuxR juga un paper clau en aquest procés. Ja ha estat descrit anteriorment que el QS, regulat per les

molècules d' AHLs, controlen les motilitats del tipus *swimming* i *swarming* en altres espècies bacterianes (Atkinson, *et al.*, 2006, Fuqua, 2006, AL-Ghonaïem, 2009).

#### 4.12.4. Efecte de les AHLs sintètiques sobre el *swarming* en *S. maltophilia* E77.

Per a determinar si les AHLs poden induir la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77, s'han assajat diferents AHLs sintètiques a concentració de 10 mM en les plaques de *swarming*. S'han escollit per aquest assaig les molècules d' AHLs detectades en el sobrenedant de *S. maltophilia* E77. S'han dipositat 50 µl del stock d' AHLs sintètiques a concentració 10 mM resuspeses amb 10 µl de ACN al 100 % dipositats a 2 cm del lloc de sembra de l' inòcul de la colònia. A la Figura 4.57, es pot observar l'efecte inductor en la motilitat de *S. maltophilia* E77 quan s'addiciona a les plaques de *swarming* les molècules C8oxo-HSL (C), C8-HSL (D) i C10-HSL (E), respecte les plaques on no s'addiciona (A). Aquestes molècules s'han detectat en els sobrenedants de *S. maltophilia* E77. Com a control s'ha afegit ACN al 100% a la placa de *swarming* (B).



**Figura 4.57.** Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 amb presència de diferents tipus d' AHLs sintètiques a concentració final 10 mM dissoltes amb ACN al 100%. S'han dipositat 10 µl a 2 cm del lloc de l' inòcul inicial en plaques BM2-agar (0,5 %) incubades durant 5 dies a 30 °C. *S. maltophilia* E77 (A) amb presència de ACN al 100% (B), C8oxo-HSL (C), C8-HSL (D), C10-HSL (E). Plaques de Petri de 90 mm.

Observem també que es produeix un cert efecte inhibitori en el lloc on s'han dipositat els 10 µl de cada molècula sintètica (posició marcada amb una fletxa). Entenem doncs, que probablement la concentració usada en el punt d' inoculació és molt elevada i que fins que aquesta no difon per l' agar no estimula el *swarming* de *S. maltophilia* E77. El que és molt interessant és que aquest efecte inhibitori no es produeix quan només assagem el solvent d' acetoni-tril utilitzat per dissoldre les molècules. Destacar que l'addició d' AHLs en les plaques de *swarming* no estimula la motilitat en la soca mutant pel gen *luxR* (dades no mostrades).

En els assaigs anteriors hem pogut constatar que la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* està induïda per un nombre major d' AHLs diferents de les que realment s'han detectat en els sobrenedant de la soca d' estudi. Aquest fet es pot atribuir a que possiblement s' estigui produint una comunicació interespecie, ja que *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* són

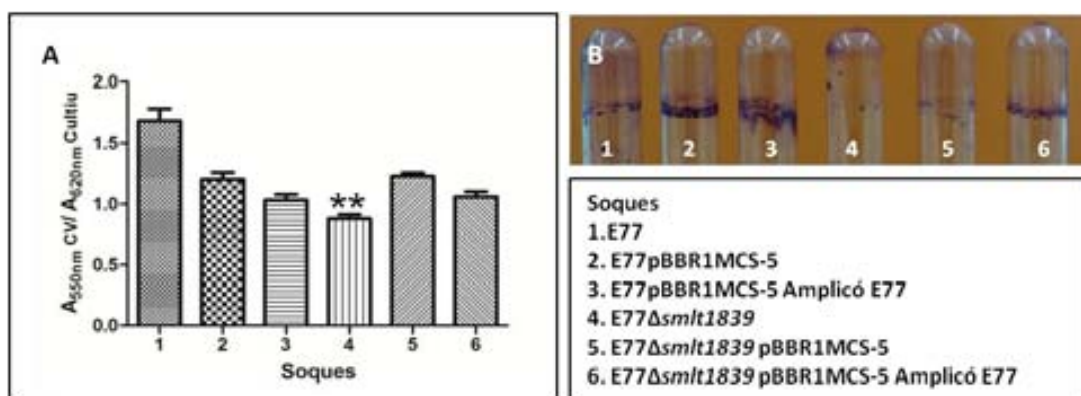


espècies bacterianes que cohabituen en diferents hàbitats naturals i probablement les molècules senyal que s'alliberen a l'espai extracel·lular interfereixen en diverses funcions biològiques com ara la motilitat.

#### 4.13. Complementació del biofilm en *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*.

La complementació en *trans* del regulador *luxR* s'ha dissenyat mitjançant l'electroporació del plasmidi pBBR1MCS-5 Amplicó E77 el qual conté el gen *luxR* amb el propi promotor. La complementació en *trans* en la soca mutant no ha funcionat quan s'assaja la formació de biofilms en plaques de poliestirè. Malgrat que el plasmidi incrementa la formació de biofilms en la soca mutant també ho fa el plasmidi control pBBR1MCS-5. Invers és l'efecte en la soca salvatge, on la introducció d'ambdós plasmidis disminueixen la formació de biofilms. Aquest resultat es mostren a la Figura 4.58-A. Tot i així, creiem que la disminució en biofilms per part del regulador no és fruit de l'acumulació de mutacions puntuals en la soca *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* degut que els diferents clons mutants obtinguts per aquest regulador han mostrat pèrdua en la formació de biofilms i mantenen el mateix fenotip en els experiments realitzats.

La complementació en tubs de vidre (Figura 4.58-B) on s'avalua la pel·lícula més superficial, observem que sí es complementa el biofilm en aquest experiment en la soca mutant i que el plasmidi control no afecta en el fons genètic salvatge o mutant pel gen *luxR*.

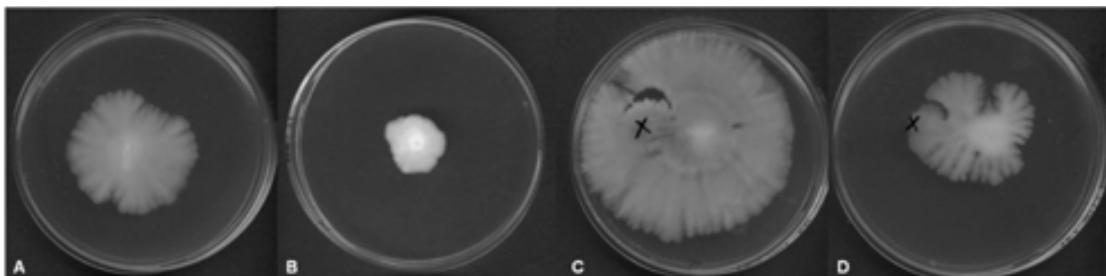


**Figura 4.58.** **A**, quantificació relativa ( $A_{550nm}CV/A_{620nm}Cultiu$ ) del biofilm format en plaques de 96 pous en medi BM2 durant 48 h a 30 °C de les soques *S. maltophilia* E77 i *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* amb els plasmidis pBBR1MCS-5 o pBBR1MCS-5 Amplicó E77. **B**, tinció de la pel·lícula de biofilm formada en la part més superficial del tub de vidre en les mateixes condicions. Els resultats en A són la mitjana de com a mínim de tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.,\*\* $p < 0,01$  s'ha considerat significatiu mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) amb comparació múltiple post-test de Bonferroni. En aquest anàlisi s'indica les diferències significatives entre la formació de biofilm de la soca salvatge respecte la soca mutant pel gen *smlt1839*.

#### 4.14. Complementació del *swarming* en *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*.

Després que diferents estratègies realitzades en el laboratori per a la complementació *in trans* del gen *smlt1839* no hagin funcionat, en aquest apartat s'ha abordat la complementació del *swarming* mitjançant l'addició de biotensioactius en les plaques on s'estudia aquesta motilitat. Els biotensioactius tenen l'habilitat de reduir la tensió superficial facilitant la migració i translocació (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Aquest mètode ja s'ha descrit anteriorment per a abordar la complementació en altres espècies bacterianes. Per exemple, els autors Huber, *et al.*, (2001), complementen la motilitat del tipus *swarming* en el mutant *luxR* anomenat *cepR* en *B. cepacia*, a partir d'addicionar en la placa de *swarming* diferents biotensioactius com per exemple serrawetina W2 extret de *S. liquefaciens*. Per a la complementació de la motilitat del tipus *swarming* en la soca mutant de *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* en aquest treball s'ha escollit el sobrenedant total i concentrat extret amb acetat d'etil de *P. aeruginosa* MPAO1.

Els experiments realitzats anteriorment ens han permès corroborar que l'estimulació de la motilitat en *S. maltophilia* E77 es deu principalment a la concentració de ramnolípid presents en el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1. A la Figura 4.59 observem la complementació del *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839*, realitzada a partir de l'addició de sobrenedant concentrat de *P. aeruginosa* MPAO1. Es pot observar que l'addició de sobrenedant concentrat provinent de MPAO1 en les plaques de *swarming* on s'estudia la motilitat de la soca *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* (D), suposa un augment de la motilitat de la soca mutant respecte la placa on no s'addiciona el sobrenedant (B) En les imatges A i C s'ha realitzat el mateix experiment en paral·lel en la soca salvatge i observem que l'addició de sobrenedant provinent de *P. aeruginosa* MPAO1 estimula fortament la motilitat d'aquesta respecte la placa on no s'addiciona.



**Figura 4.59.** Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 salvatge (A) amb 10  $\mu$ l sobrenedant MPAO1 (B). Motilitat del tipus *swarming* de la soca *S. maltophilia* E77 $\Delta$ *smlt1839* (C) amb 10  $\mu$ l sobrenedant MPAO1 (D) en medi BM2-agar(0,5 %) a 30 °C durant 7 dies. S'indica la posició on s'han dipositat 10  $\mu$ l de sobrenedant filtrat amb una creu (a 2 cm de l'asterisc). Aquests resultats són l'exemple visual de mínim tres experiments independents. Plaques de Petri de 90 mm. .



## *Discussió General*

---



## 5. DISCUSSIÓ GENERAL

### 5.1. Detecció i caracterització de les AHLs en el sobrenedant de diferents soques clíniques de *S. maltophilia*.

Durant dècades s'havia considerat que els bacteris eren organismes simples basats en dos conceptes erronis, subestimar-los degut a la grandària i a l'aparent absència de sistemes de comunicació. El terme de "comunicació" s'havia associat en gran part al regne animal, capaços de transmetre missatges utilitzant el llenguatge verbal o corporal. No obstant, en l'actualitat és obvi que els bacteris ja havien desenvolupat la capacitat de transferir missatges sense necessitat d'emprar el so o el moviment. Inequívocament, la química es pot considerar el llenguatge cel·lular més universal que opera en tots els organismes vius, incloent els bacteris. Els bacteris poden produir i detectar una gran varietat de missatges que permeten a les cèl·lules de forma individual sentir i reaccionar en un entorn en constant canvi. Els bacteris mitjançant la comunicació cel·lular a través de senyals químics, són capaços de determinar la densitat de població i la diversitat, dos factors ecològics crucials per a la supervivència.

Molts bacteris gram negatius, inclosos els patògens, detecten la població existent i controlen l'expressió d'un elevat nombre de fenotips a partir dels components de QS de la família LuxI/R mitjançant la producció i resposta a la molècula AI del tipus AHL (Boyer & Wisniewski-Dye, 2009). Malgrat l'existència de nombrosos estudis realitzats en aquest camp en altres bacteris patògens amb els quals *S. maltophilia* coinfecta o són filogenèticament propers, limitats estudis s'han realitzat per tal d'esbrinar l'existència d'un possible mecanisme de comunicació regulat per les AHLs en *S. maltophilia* sinó que tots els estudis s'han focalitzat en el sistema de QS mediat pel DSF. Probablement degut al fet que es reconeixen fàcilment en el genoma tots els gens d'aquest sistema.

No s'ha informat que *S. maltophilia* disposi d'un sistema de QS regulat per les molècules senyal del tipus AHLs, degut que el seu genoma no codifica per una proteïna de la família del tipus LuxI o sintasa tot i que sí presenta una proteïna del tipus LuxR amb domini d'unió a AHLs (Crossman, *et al.*, 2008). L'ús de biosensors d'AHLs és una eina molt útil per l'estudi de sistemes de QS regulats per les AHLs en bacteris gram negatius. Estratègies com la PCR o la hibridació del DNA per a detectar sistemes de QS basats en la producció d'AHLs no es poden usar degut a la baixa similitud entre seqüències de nucleòtids entre els gens *luxI* i *luxR* homòlegs (Steindler & Venturi, 2007).

En el present estudi, hem investigat la presència d'un possible sistema de QS regulat per les molècules senyal del tipus AHL en les soques clíniques *S. maltophilia* E77 i M30 prèviament caracteritzades en el nostre laboratori per Ferrer-Navarro, *et al.*, (2013) i en la soca clínica de referència K279a amb genoma seqüenciat (Crossman, *et al.*, 2008).

Per tal de detectar si *S. maltophilia* produeix molècules senyal del tipus AHLs s'han escollit diferents soques biosensores, entre elles la soca ultrasensible d'*A. tumefaciens* KYC55, i s'han realitzat diferents tipus de bioassaigs que pretenen aportar més informació als pocs treballs realitzats fins a dia d'avui pel que fa a la detecció de molècules del tipus AHLs en aquesta espècie. Els únics treballs realitzats en aquest sentit, només s'han basat en l'estudi d'extractes crus del sobrenedant a partir de bioassaigs en sembra en forma de "T" els quals no han induït sota les condicions emprades les soques biosensores *C. violaceum* CV026 i *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Schaefer, *et al.*, 2000, Zhu, *et al.*, 2001, Veselova, *et al.*, 2003). Malgrat que aquestes soques detecten AHLs de cadena curta i llarga respectivament, fins a dia d'avui no s'han realitzat bioassaigs a partir d'extractes de sobrenedant concentrats per a la detecció d'AHLs en *S. maltophilia*.

Els experts subratllen que amb un resultat negatiu en el bioassaig no es pot concloure rigorosament que la soca problema no sigui productora d'AHLs, degut que hi ha diversos motius a tenir en compte davant d'un resultat negatiu. Una de les raons podria ser que la soca a provar produeixi AHLs amb una nova estructura no detectada pel ventall de soques biosensores existents. Podria ser també que la soca produís baixes concentracions d'AHLs, les quals estiguessin per sota del llindar de detecció de les soques biosensores. És molt important remarcar que el sistema de QS s'activa en diferents condicions ambientals que potser no es poden reproduir al laboratori, per tant, és probable que succeeixin falsos negatius quan s'utilitzen bacteris biosensors en segons quines condicions s'estudiï la producció d'AHLs. Altres factors importants a tenir en compte a l'hora de preservar la integritat de la molècula, és per exemple controlar el pH del cultiu, degut que les AHLs s'hidrolitzen en condicions bàsiques com ja hem comentat anteriorment. Un altre aspecte important és la difusió de les AHLs en funció de la permeabilitat de la membrana, la qual cosa pot afectar en la purificació i detecció d'aquestes (Steindler & Venturi, 2007).

En aquest treball hem detectat les AHLs produïdes en *S. maltophilia* E77 mitjançant els assaigs realitzats amb la soca biosensora d' *A. tumefaciens* KYC55 mentre que la soca *C. violaceum* CV026 i les soques d'*E. coli* portadores de plasmidis biosensors basats en la

proteïna LuxR de *V. fischeri* no han servit per a detectar les AHLs presents en el sobrenedant de diferents soques clíniques de *S. maltophilia*. Així doncs, basant-nos amb els resultats obtinguts amb les tres soques biosensores i en la bibliografia, els resultats en aquest treball ens suggereixen que probablement *S. maltophilia* produeix AHLs només de cadena llarga i a baixa concentració en les condicions estudiades en el laboratori, degut que només amb la soca biosensora ultrasensible *A. tumefaciens* KYC55 hem pogut caracteritzar les AHLs a partir de sobrenedants concentrats. En tot cas, la producció d'AHLs sembla ser estesa entre les soques de *S. maltophilia* ja que s'han detectat AHLs en diferents soques clíniques de diferents procedències.

Inicialment, les primeres proves realitzades en medi sòlid amb la soca biosensora *A. tumefaciens* KYC55, van suggerir la presència d'AHLs en els sobrenedants crus de *S. maltophilia*. Tal i com s'ha descrit, la metodologia que suposa la concentració del sobrenedant és necessària per a una detecció més acurada de totes les AHLs produïdes per l'espècie a estudiar i posterior anàlisi per HPLC, CCP i MS. Els estudis realitzats mitjançant les cromatografies en HPLC i CCF en combinació amb els bioassaigs, han mostrat diferents fraccions positives amb diferents valors  $R_f$  que han permès predir la possible presència d'AHLs diferents en el sobrenedant de les soques de *S. maltophilia* M30 i E77. Finalment s'ha usat l'espectrometria de masses, la qual és una tècnica indispensable en tots els treballs que pretenen caracteritzar i corroborar la presència de les molècules d'AHLs en els sobrenedants de les soques d'estudi. Malgrat que també s'han detectat les AHLs en les soques clíniques de *S. maltophilia* M30 i K279a, la caracterització per MS només s'ha realitzat amb les fraccions corresponents de la soca E77 degut que ha estat la soca clínica on s'ha detectat major senyal d'AHLs en les condicions estudiades. Aquest fet és repeteix a la bibliografia i es coneix que diferents soques d'una mateixa espècie, a vegades amb diferències entre soques clíniques o ambientals, produeixen diferents concentracions d'AHLs sota les mateixes condicions de cultiu (Lewenza, *et al.*, 1999).

En les condicions emprades, l'assaig per MS ens ha permès detectar inequívocament les AHLs presents en les fraccions prèviament caracteritzades per bioassaigs, HPLC i CCF de la soca *S. maltophilia* E77 a través de la comparativa amb les AHLs sintètiques. Aquesta metodologia identifica l'estructura de forma inequívoca de les molècules del tipus AHLs gràcies a que aquestes estan compostes d'un anell invariable que no pot ser destruït en el procés de MS i que produeix un fragment de 102  $m/z$ , el qual es correspon amb l'anell lactona. Així doncs, després de la caracterització preliminar de les fraccions del HPLC per CCF i bioassaig, s'ha

pogut caracteritzar la presència de tres molècules d'AHLS diferents a partir del fraccionament de l'ió corresponent a la massa/carrega per a cada molècula esperada en cada fracció. La divisió d'aquests ions ha originat el fraccionament de l'anell i de la cadena per cadascuna de les AHLs detectades corresponents a les molècules d'AHLS: C8oxo-HSL, C8-HSL i C10-HSL, senyal definitiu per a afirmar la presència d'AHLS en cada fracció.

Tanmateix no podem excloure la possibilitat que altres molècules d'AHLS siguin sintetitzades amb menor abundància per *S. maltophilia* o que no hagin estat detectades amb aquesta metodologia.

Malgrat que en les espècies de *Xanthomonas* sp. no s'ha detectat una sintasa del tipus LuxI en el genoma, en el treball realitzat per Cha, *et al.*, (1998) es va detectar la presència d'AHLS en els sobrenedants concentrats de diferents espècies de *Xanthomonas* sp. (entre elles *X. campestris* i *X. oryzae*). A partir de la caracterització aproximada dels extractes de sobrenedants totals separats per CCF, es van detectar la presència de com a mínim dos AHLs diferents en el sobrenedant d'aquest gènere, amb temps de retenció similars a les molècules C8oxo-HSL i C8-HSL emprant la soca biosensora *A. tumefaciens* NT1(pZLR4), la qual no és tan sensible com l'*A. tumefaciens* KYC55. El sistema de detecció d'AHLS basat en *A. tumefaciens* (*PtraG::lacZ*) es considera el més sensitiu i versàtil de tots (Zhai, *et al.*, 2012).

L'ús de sobrenedants provinents de la soca de *P. aeruginosa* MPAO1, han servit com a control durant la caracterització de les AHLs en *S. maltophilia*. Els resultats obtinguts confirmen que els bioassaigs realitzats amb les diferents soques biosensores s'han realitzat correctament i que són eines robustes per a aquesta finalitat. Això ho podem confirmar gràcies a que la metodologia utilitzada per a la detecció d'AHLS en *S. maltophilia*, ha permès detectar en *P. aeruginosa* MPAO1 sis de les sis AHLs diferents descrites per aquesta espècie.

Degut a la presència d'AHLS en el sobrenedant de *S. maltophilia*, en aquest treball s'ha fet una cerca *in silico* en el genoma de *S. maltophilia* K279a per a buscar la sintasa responsable de la producció d'AHLS en aquesta espècie. La cerca s'ha realitzat a partir de seqüències motlles pertanyents a les tres famílies de sintases ja descrites. S'ha escollit com a sintasa hipotètica productora d'AHLS en *S. maltophilia*, una proteïna anotada com aciltransferasa codificada per l'ORF *smlt4572*, la qual ha presentat amb les eines bioinformàtiques emprades en aquest treball, els majors valors d'identitat amb la proteïna HdtS. Tot i que la caracterització a nivell de seqüència, dominis i motius, ens ha dut a delectonar l'ORF *smlt4572*, els resultats obtinguts no han validat que fos la sintasa responsable de la síntesi d'AHLS en *S. maltophilia* E77.

Propers estudis haurien de centrar-se en localitzar el gen responsable de la síntesi de les molècules d'AHLS en *S. maltophilia* a partir de la predicció bioinformàtica i posterior validació experimental ampliant la cerca *in silico* realitzada en aquest treball o mitjançant un procés de cribratge que permeti detectar directament els transformants en *E. coli* que contenen el gen de la sintasa de *S. maltophilia*. Actualment, es coneix que ja no tan sols els membres de la família LuxI i AinS/LuxM són els responsables de la síntesi d'AHLS sinó que altres membres de la família de les aciltransferasa ja s'ha demostrat que són capaces també de produir AHLS (Laue, *et al.*, 2000, Rivas, *et al.*, 2007).

## 5.2. Caracterització de la funcionalitat del domini d'unió a AHLS del regulador LuxR de *S. maltophilia* E77.

Atès que hi ha anotat en tots els genomes seqüenciats de *S. maltophilia* un únic regulador del tipus LuxR amb domini d'unió a AHL i DNA, s'ha iniciat en aquest treball la seva caracterització. A través d'un primer anàlisi *in silico* entre les soques seqüenciades de *S. maltophilia* i la soca d'estudi escollida E77 s'ha pogut observar que aquest conté els dominis conservats d'unió a AHL i DNA en totes les soques estudiades (ambientals i clíniques), malgrat que conté dos residus no conservats en el domini d'unió a AHLS. En els genomes seqüenciats de *S. maltophilia* hi ha anotades més proteïnes LuxR però cap altra conté el domini d'unió a AHL.

Els experts indiquen sobre els diferents reguladors del tipus LuxR, que el domini d'unió al DNA és molt conservat mentre que el d'unió a AHLS és més variable, probablement per acomodar-se a la varietat de molècules AI que s'hi poden unir (Vannini, *et al.*, 2002, Zhang, *et al.*, 2002).

En l'arbre filogenètic realitzat per tal de relacionar els LuxR de *S. maltophilia* entre els reguladors ja estudiats (Figura 4.35), s'observa que els LuxR de *S. maltophilia* estan més propers als reguladors d'espècies bacterianes associades a plantes ja sigui de forma simbiònt o patògena, del grup de LuxR "solos" anomenat PAB i el LuxR TraR amb sintasa cognada TraI d'*A. tumefaciens*.

Tot i que l'arbre filogenètic mostra que el regulador LuxR de *S. maltophilia* és més proper a espècies fitopatògenes, les quals formen part del grup PAB, els estudis *in silico* ens han permès determinar que existeixen diferències en el domini d'unió a AHLS degut que les substitucions originades en els residus conservats del domini d'unió a AHLS són diferents entre

el grup PAB i els LuxR de *S. maltophilia*. Tot i així, les substitucions han mantingut les característiques hidrofòbiques o aromàtiques dels aminoàcids substituïts en tots dos casos. Els treballs realitzats entorn aquestes modificacions en el domini d'unió a AHLs del grup PAB, semblaria que s'han originat en aquestes espècies per acomodar-se als compostos alliberats per les plantes tot i que no es descarta que aquest compost tingui una estructura similar a les AHLs (Gonzalez & Venturi, 2013).

La presència i seqüència similar d'ortòlegs del regulador LuxR amb els mateixos residus conservats en el domini d'unió a AHLs en totes les soques de *S. maltophilia* indica que el gen *luxR* forma part dels gens compartits en el genoma (*genoma core*) i que a més a més la proteïna LuxR podria jugar un rol conservat associat amb la detecció i resposta a molècules senyal del tipus AHLs endògenes o exògenes. És per aquest motiu que s'ha iniciat la seva caracterització mitjançant l'avaluació de l'especificitat d'unió entre la proteïna LuxR de *S. maltophilia* E77 a les AHLs detectades en el sobrenedant. Així doncs, hem pogut corroborar que malgrat els dos residus modificats en el domini d'unió a les AHLs, el regulador LuxR de *S. maltophilia* E77 reconeix dos de les AHLs endògenes detectades en el sobrenedant de *S. maltophilia*. El fet que no detectem unió a la molècula C10-HSL pot deure's als factors comentats anteriorment que probablement puguin donar-nos un fals negatiu per aquesta unió, mitjançant l'ús de soques biosensores no prou sensibles per aquesta molècula.

El fet que el LuxR de *S. maltophilia* contingui dos residus diferents en el domini d'unió d'AHLs podria ser perquè d'aquesta manera és capaç d'unir-se a un ventall d'AHLs més ampli del que s'ha pogut estudiar en aquest treball.

### **5.3. Cerca del promotor *luxR* en *S. maltophilia* i estudi de l'expressió del regulador *luxR* en la soca E77.**

Mitjançant la comparativa genòmica de la regió anterior al gen *luxR* de les soques seqüenciades i la soca d'estudi E77, s'ha localitzat i predit un promotor hipotètic del gen *luxR*. Els assaigs d'expressió de la regió promotora hipotètica fusionada amb el gen *lacZ* han servit per confirmar la funcionalitat del promotor *luxR* predit.

Els resultats obtinguts en aquest treball, recorden als resultats presentats anteriorment per altres autors, pel que fa a l'expressió del gen *luxR*. Hem pogut constatar efectes similars al que succeeix en *P. aeruginosa*, és a dir, major expressió del regulador al final de la fase logarítmica i durant la fase estacionària tal i com també s'ha predit per altres reguladors de QS



(Schuster, *et al.*, 2004, Subramoni & Venturi, 2009, Gamage, *et al.*, 2011). L'Anàlisi comparatiu d'expressió del gen *luxR*, entre la soca salvatge i mutant al llarg del temps, ens indica que la regulació del gen *luxR* depèn d'altres estímuls probablement relacionats amb el sistema de QS, via un regulador encara no identificat que regula l'expressió d'aquest en funció de la fase de creixement. A més a més, hem pogut observar que tot i addicionar AHLs en la fase inicial del cultiu, l'activació de la transcripció del regulador LuxR no s'inicia fins que el cultiu no entra en fase estacionària (Schuster, *et al.*, 2003, Schuster, *et al.*, 2004). Tanmateix observem diferències d'expressió entre els cultius on s'addicionen AHLs exògenes respecte els cultius on no s'addicionen, fet que ens suggereix que possiblement el complex LuxR-AHL estigui activant l'expressió del gen *luxR*, ja que en la soca mutant no s'ha observat cap canvi d'expressió. L'estudi de l'expressió del regulador *luxR* utilitzant un medi de cultiu condicionat, on s'ha afegit sobrenedant d'un cultiu de nit saturat, activa molt notòriament l'expressió d'aquest quan es compara l'expressió del regulador *luxR* en aquells cultius on s'ha afegit medi LB fresc. Aquestes diferències també s'expliquen per altres autors, que sostenen que l'absència d'inhibidors en el medi activa la transcripció dels gens de QS regulats per la fase de creixement (Yarwood, *et al.*, 2005).

Ja hem esmentat que el patró de la regulació en funció a la fase de creixement està reportat per altres espècies bacterianes com *P. aeruginosa*. Els autors Schuster, *et al.*, (2003) i (2004), demostren que la majoria dels més de 300 gens regulats pel QS (6 % del genoma de *P. aeruginosa*) s'indueixen durant la transició entre la fase logarítmica i la fase estacionària independentment de la presència d'alts nivells d'AHLs exògenes agregades en les fases inicials o del factor sigma per a l'activació RpoS. Conclouen que tot i l'addició d'AHLs en el cultiu, els gens de QS no s'activen fins que la densitat òptica del cultiu no entra en fase estacionària. Sostenen que altres factors limiten la transcripció d'aquests gens en fases inicials o logarítmiques del creixement. La seva hipòtesi es basa en que els reguladors LasR i RhIR són limitants en les fases inicials de creixement i que l'abundància augmenta a mesura que el cultiu creix.

També hem obtingut resultats similars als que obtenen els autors Yarwood, *et al.*, (2005), els quals conclouen que el medi de cultiu LB conté un inhibidor/s que poden prevenir la inducció de molts gens regulats pel QS-AHL fins que aquest inhibidor no és consumit per *P. aeruginosa*. Sostenen en que la substància inhibidora està present en l'extracte de llevat i triptona del medi de cultiu de creixement (LB), degut que el tractament amb medi on s'ha

cregut prèviament un cultiu activa la transcripció gènica dels gens regulats pel QS a fases més inicials.

Per tant, s'ha pogut observar que la resposta a les AHLs per part dels gens regulats pel QS és un fenomen contínuament influenciat i modificat per les condicions ambientals i que la manera simplista de creure que el QS coordina l'expressió dels gens a través de la densitat poblacional on les molècules senyal s'acumulen fins a una concentració lliandar, subestima la complexitat d'aquest circuit de regulació.

A l'analitzar la regió promotora del gen *luxR* de *S. maltophilia* E77 i de les altres soques seqüenciades hem localitzat una caixa *lux* hipotètica amb estructura palindròmica que probablement permeti la unió del complex LuxR-AHL.

Futurs estudis haurien d'anar direccionats a identificar els gens diana regulats pel regulador LuxR en resposta a les AHLs o altres condicions de cultiu, així com identificar la caixa *lux* consens seleccionant les bases del palíndrom crucials per a la unió d'aquest regulador.

#### **5.4. Participació del regulador LuxR en la formació de biofilms en *S. maltophilia* E77.**

Els estudis publicats en el transcurs de la darrera dècada suggereixen que el QS juga un paper clau en el desenvolupament dels bacteris en els biofilms, per tant el QS sembla ésser una nova diana terapèutica molt valuosa pel tractament d'infeccions relacionades amb biofilms.

En el present treball, s'ha analitzat el fenotip de la soca mutant respecte la soca salvatge pel que fa a la quantificació del biofilm adherit en plaques de poliestirè al llarg del temps i emprant diferents medis. Utilitzant aquest simple mètode, hem mostrat les diferències significatives detectades entre la soca salvatge de *S. maltophilia* i la soca mutant pel gen *luxR*, pel que fa a l'habilitat de formar biofilm. Els resultats obtinguts suggereixen que el regulador LuxR pot jugar un paper clau durant aquest procés en *S. maltophilia*. D'altra banda, la inspecció a temps real del desenvolupament de biofilms a partir del creixement en cambres de vidre sotmeses a un flux continu i posterior inspecció en el microscopi CLSM, ha revelat diferències en la morfologia quan es compara la soca salvatge i mutant. Ambdós mètodes han revelat que el LuxR no és responsable de la l'adhesió inicial sinó que l'arquitectura del biofilm es veu afectada *a posteriori*.

Ha estat ben documentat que el creixement i formació de biofilms és un greu problema en la medicina i indústria (Costerton, *et al.*, 1995). En conseqüència hi ha un fort interès en trobar molècules que inhibeixin el QS bacterià. El bloqueig de les interaccions entre els bacteris els obliga a valer-se per si mateixos de forma individual (LaSarre & Federle, 2013).

Resultats ensenyats en aquest treball mitjançant l'estratègia amb l'ús d'inhibidors de QS, basada en els estudis de Ramli, *et al.*, (2012) també han demostrat efectes en la disminució de la formació de biofilm en *S. maltophilia* E77 i *P. aeruginosa* MPAO1, a través de la hidròlisi de les AHLs produïda per una lactonasa present en el sobrenedant de *B. subtilis* A24, addicionats a l'assaig durant el procés de formació de biofilms. Els resultats obtinguts indiquen la possible activitat IQS exercida per les lactonases presents en el sobrenedant de *B. subtilis* via la degradació d'AHLs.

En el cribatge virtual desenvolupat per Ding, *et al.*, (2011), demostren que un compost anomenat emodin és capaç d'inhibir l'adhesió i posterior formació de biofilms en *P. aeruginosa* i *S. maltophilia* mitjançant la proteòlisi dels reguladors de QS del tipus LuxR. Els autors no entenen com el compost emodin exerceix la mateixa inhibició en els biofilms de *S. maltophilia* degut que no està reportat que disposi d'un sistema de QS regulat per les AHLs.

Mitjançant el blocatge de reguladors de QS en experiments realitzats per Ding, *et al.*, (2011) o amb enzims que hidrolitzen les AHLs realitzats en aquest treball, hem pogut observar que la formació de biofilms en *S. maltophilia* E77 i *P. aeruginosa* MPAO1 s'inhibeix mentre que les taxes de creixement no es veuen influenciades per l'addició d'IQS. Aquests resultats assenyalen que el regulador LuxR en *S. maltophilia* és important pel desenvolupament d'aquestes estructures.

L'activitat lactonasa del gen *aiiA* es creu que és una eina molt útil per a investigar el rol de les AHLs en aquelles espècies bacterianes on les funcions biològiques regulades per les AHLs no han estat descrites. Com s'ha vist en aquest treball generar el mutant basant-nos amb homologia de seqüència de les proteïnes del tipus LuxI (sintases d'AHLs), és i resulta ser una estratègia difícil, perquè els percentatges de similitud de seqüència entre els diferents gèneres són bastant baixos (entre un 28-35 %) (Dong, *et al.*, 2000, Reimmann, *et al.*, 2002).

El treball portat a terme, evidencia la importància del regulador LuxR en el procés de formació de biofilm. Destacar que el QS no és un procés essencial per a la cèl·lula i els mutants deficients en QS no han mostrat defectes de creixement. A més a més podem interrelacionar

que les diferències fenotípiques observades a partir de 48 h en el procés de formació de biofilms en *S. maltophilia* es poden relacionar segurament amb l'augment d'expressió del gen *luxR* quan aquest entra en fase estacionària, basant-nos amb els resultats d'expressió del gen *luxR* en les mateixes condicions de cultiu.

El QS com a nova diana terapèutica és interessant ja que el tractament amb IQS no s'ha vist que provoqui una supressió del creixement cel·lular i no exerceix pressió selectiva que produeixi el desenvolupament de futures resistències. Mitjançant l'anàlisi semi-quantitatiu del biofilm format en plaques de poliestirè, s'ha detectat activitat IQS de l'enzim lactonasa present en el sobrenedant de *B. subtilis* sobre el biofilm de *S. maltophilia*. Per aquest motiu, les perspectives de futur haurien d'aprofundir en l'activitat IQS de l'enzim lactonasa en diferents experiments on s'estudii l'estructura i desenvolupament del biofilm de *S. maltophilia*. Així com també, observar l'activitat IQS del gen *aiiA* sota un promotor fort compatible en *S. maltophilia* que s'expressi de forma heteròloga o a través d'uns altres compostos IQS.

### **5.5. Participació del regulador LuxR en la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77.**

La motilitat del tipus *swarming* és una forma especial de translocació que permet als bacteris moure's a la part superior d'una superfície de manera coordinada, sovint caracteritzada per tenir un aspecte colonial en forma de dendrita.

Al laboratori aquest tipus de motilitat s'estudia de forma rutinària per discernir si la soca d'estudi és capaç de moure's en superfícies semi-sòlides. Existeixen molts medis usats en la bibliografia per a descriure la motilitat del tipus *swarming* depenent de l'espècie bacteriana o de l'assaig realitzat. Hi ha molts factors que defineixen el diàmetre i morfologia del halo com per exemple, el medi, la concentració de sucres i d'agar escollits, entre altres (Henrichsen, 1972, Harshey & Matsuyama, 1994, Niu, *et al.*, 2005). Es coneix que el *swarming* i el seu fenotip depenen en gran mesura de l'estat nutricional de les cèl·lules i les propietats físiques de la superfície, per tant aquest assaig depèn fortament dels paràmetres experimentals (Harshey, 1994, Eberl, *et al.*, 1999). Des d'un punt de vista aplicat, influir en aquesta motilitat es creu que pot ajudar a controlar la colonització i que pot tenir importants aplicacions, entre elles a nivell sanitari, on inhibir aquesta funció pot proporcionar una estratègia terapèutica alternativa per a combatre contaminacions microbianes en dispositius mèdics i infeccions (Daniels, *et al.*, 2004).

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori per Ferrer-Navarro, *et al.*, (2013), descriuen la motilitat del tipus *swarming* en diferents soques clíniques de *S. maltophilia* sent fenotípicament major en la soca E77, soca clínica d'estudi en aquest treball. Recentment el grup de Roscetto, *et al.*, (2012), han descrit la possible implicació d'una xaperona en la motilitat del tipus *swarming* de *S. maltophilia* després de 24h d'incubació però no relacionen que aquesta motilitat estigui regulada pel QS, ni descriuen que la motilitat tingui un fenotip del tipus ramificat, tal i com s'explica en l'estudi previ realitzat en el laboratori i en aquest treball.

Els resultats presentats, mostren que el regulador LuxR de *S. maltophilia* participa en la regulació de la motilitat del tipus *swarming* en aquesta espècie, degut que la mutació en el gen *luxR* provoca la supressió d'aquest fenotip. En canvi les motilitats del tipus *swimming* i *twitching* no s'han vist afectades per aquesta deficiència en les condicions estudiades.

No és sorprenent que el regulador LuxR només sigui responsable d'afectar a la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia*, perquè ja s'ha descrit en altres espècies com per exemple *B. cepacia* (Huber, *et al.*, 2001). Treballs previs publicats amb altres reguladors del tipus LuxR, ja han determinat que són importants per aquesta motilitat, per exemple en les espècies de *P. aeruginosa*, *S. liquefaciens* o *B. cepacia* (Ochsner & Reiser, 1995, Lindum, *et al.*, 1998, Huber, *et al.*, 2001).

Per altra banda, mitjançant l'addició de sobrenedant de *B. subtilis* A24, també s'ha pogut apreciar l'activitat IQS que exerceix el sobrenedant sobre les *swarm cells*, inhibint aquesta motilitat a través de la placa, ja sigui en *S. maltophilia* E77 com en *P. aeruginosa* MPAO1.

El fet que en *S. maltophilia* s'hagin descrit tres tipologies de motilitat diferents (*swimming*, *twitching* i *swarming*), probablement reflecteix la varietat d'hàbitats on es troba, sent fenotípicament més evident en les soques procedents d'aïllats clínics (Huang, *et al.*, 2006, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2013). Aquesta dada, pot corroborar la importància de la motilitat en la colonització i patogènia d'aquesta espècie. Fins a dia d'avui cap estudi ha posat de manifest que el regulador LuxR és important per a la regulació de la motilitat del tipus *swarming*.

La motilitat ha estat molt relacionada amb la virulència de *P. aeruginosa*, la qual juga un paper important en la mobilització i la colonització de diferents ambients, adhesió dels bacteris a la superfície i formació de biofilms. Els autors Overhage, *et al.*, (2007), evidencien que és possible obtenir mutants deficients en el *swarming* sense alterar el flagel, el pili tipus IV o la

concentració de ramnolípid, per tant es considera que aquest tipus de motilitat és un mecanisme complex ja que un ampli nombre de gens diferents el poden influenciar.

Contràriament a això, s'ha detectat que els mutants deficients en el *swarming* mostren un deteriorament en la formació de biofilms indicant doncs l'estreta relació entre aquests dos estadis de desenvolupament (Overhage, *et al.*, 2007). Per tant, tot i que haguem demostrat que el regulador LuxR podria ésser una bona diana terapèutica amb la qual seguir treballant per a pal·liar la patogènia de *S. maltophilia*, no és sorprenent que ambdós fenotips siguin regulats en *S. maltophilia* per a altres vies de regulació i de vegades també per diferents sistemes de QS tal i com succeeix en altres espècies bacterianes (Suppiger, *et al.*, 2013).

### **5.6. Estratègies per a la complementació de la soca mutant pel gen *luxR* en *S. maltophilia* E77.**

Malgrat que no s'ha pogut realitzar una complementació en *trans* del gen *luxR* que restauri el fenotip de la soca mutant en la formació de biofilms i *swarming*, diferents clons mutants *luxR* s'han analitzat per ambdós fenotips per assegurar que el fenotip obtingut no és fruit d'una mutació puntual. A més a més, mitjançant l'enzim lactonasa com a IQS, hem pogut apreciar l'efecte inhibitori exercit sobre la formació de biofilms i *swarming*. Aquests resultats ens permeten valorar que possiblement el regulador LuxR en *S. maltophilia* està implicat en aquests dos processos. Cal remarcar que, l'estudi de la degradació de les AHLs per part d'IQS com les lactonases, permet estudiar el possible impacte del QS en els bacteris gram negatius sense necessitat de realitzar mutants en les sintases d'AHLs (Liu, *et al.*, 2011).

Hem pogut constatar que el sobrenedant concentrat de *P. aeruginosa* MPAO1 estimula la motilitat en *S. maltophilia* i restaura el fenotip deficient per aquesta motilitat en la soca mutant pel gen *luxR*. Mentre que l'addició del sobrenedant de *P. aeruginosa* que produeix menor concentració de ramnolípid no estimula la motilitat en *S. maltophilia* salvatge. Aquest efecte s'ha pogut corroborar mitjançant l'expressió heteròloga del gen *aiiA* que codifica per una lactonasa en *P. aeruginosa* MPAO1. Gràcies a l'activitat IQS que exerceix la sobreproducció de l'enzim lactonasa, aquesta soca disminueix la concentració d'AHLs i ramnolípid presents en el sobrenedant.

La translocació a través de la superfície es coneix que pot ser facilitada per molècules químiques, factors quimiotàctics o molècules senyal. Els biotensioactius com la serrawetina de *S. liquefaciens* (Eberl, *et al.*, 1999), ramnolípid de *P. aeruginosa* (Kohler, *et al.*, 2000) i

surfactina de *B. subtilis* faciliten el *swarming*. La bibliografia descriu la restauració en la motilitat del tipus *swarming* en els mutants deficients pels reguladors del tipus LuxR, mitjançant l'addició en les plaques de *swarming* de biotensioactius per a complementar aquest fenotip. Per exemple la deficiència en el *swarming* identificada en el mutant CepR, regulador de QS del tipus LuxR en *B. cepacia*, també es complementa adicionant biotensioactius de procedències diverses (Huber, *et al.*, 2001). A *X. oryzae* la mutació del LuxR "solo" OryR afecta la motilitat del tipus *swarming* i els autors Gonzalez, *et al.*, (2013) no aconsegueixen restaurar el fenotip a partir de l'expressió en *trans* del gen *oryR*, sinó amb l'addició de macerats d'arròs.

S'ha proposat també que el DSF i set àcids grassos saturats i insaturats derivats d'aquests produïts en *S. maltophilia* tenen un paper humectant en la motilitat de *S. maltophilia*, els quals s'han descrit que faciliten la translocació radial en superfície independent de flagel (Huang & Lee Wong, 2007). Cal assenyalar que aquesta motilitat és molt diferent fenotípicament al *swarming*. El sistema DSF es va descriure per primer cop a *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) i està molt conservat en *S. maltophilia* i en el complex de *B. cepacia* (Bcc) el qual conté 17 espècies molt relacionades entre sí. En el complex Bcc, s'inclouen patògens oportunistes que originen el major nombre de casos d'infeccions en pacients de FQ (Suppiger, *et al.*, 2013). Molts treballs han demostrat la implicació en la patogènia i virulència del sistema del tipus DSF en el grup Bcc, i sembla ser que els mutants en les proteïna Rpf<sub>BC</sub> i Rpf<sub>CBC</sub> tenen un efecte pleiotròpic en el fenotip (Deng, *et al.*, 2009, Ryan, *et al.*, 2009, McCarthy, *et al.*, 2010). Els sistemes de QS presents a Bcc són el CepI/R regulat per les AHLs i la molècula senyal BDSF, els quals juguen un paper clau en la comunicació cèl·lula-cèl·lula i controlen trets fenotípics similars que inclouen: la formació de biofilms, l'activitat proteolítica, motilitat i regulació de diversos factors de virulència. En alguns casos són regulats de forma comuna mentre que altres no i, els autors suggereixen que, els dos sistemes de senyalització operen en paral·lel i es superposen en la regulació d'un conjunt de gens (Schmid, *et al.*, 2012, Deng, *et al.*, 2013, Suppiger, *et al.*, 2013).

Les espècies de *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* es troben de forma ubíqua en l'ambient i s'aïllen freqüentment en diversos nínxols que inclouen des de la rizosfera, plantes i pulmons amb FQ. Un fet important en la comunicació interespecífica originada pel DSF de *S. maltophilia* K279a, s'ha demostrat en el treball realitzat per Ryan, *et al.*, (2008). En aquest veuen que el DSF produït per *S. maltophilia* és reconegut per *P. aeruginosa* gràcies a la presència d'una quinasa sensora capaç de sensar el DSF, el qual l'influencia a nivell de desenvolupament de biofilms i tolerància a polimixines B i E (colisina). *P. aeruginosa* no conté un *cluster* del tipus *rpf*

ni cap sintasa propera a la proteïna RpfF. Recentment els autors Davies i Marques., (2009), amb el seu treball han demostrat que *P. aeruginosa* durant el seu creixement allibera un àcid gras capaç de provocar la dispersió dels biofilms i la inhibició d'aquests a escala intraespecífica, interespecífica (sobre un ampli rang de bacteris gram negatius i positius) i interregnes afectant els biofilms de *C. albicans*. Aquest curt àcid gras, anomenat 2-cis-decenoic està estructuralment relacionat amb el DSF i es sintetitza a partir d'una Enoyl coA hidratasa amb identitat del 30% respecte la proteïna Enoyl coA hidratasa RpfF de *X. campestris* (Davies & Marques, 2009)

Malgrat l'efecte humectant del DSF i 7 derivats d'aquests produïts en *S. maltophilia* dels quals no es coneix l'estructura, descartem que el sobrenedant de *P. aeruginosa* que estimula el *swarming* en *S. maltophilia* sigui perquè produeix un àcid gras proper al DSF que actuaria com a agent humectant. El treball realitzat amb sobrenedants, IQS i sobrenedants extrets de fons genètics deficientes en ramnolípids degut a la hidròlisi de les AHLs presents en el sobrenedant, evidencien que altres molècules senyals, biotensioactius i reguladors indueixen i regulen el *swarming* en *S. maltophilia*.

### **5.7. Efecte de les AHLs en la motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77.**

Majoritàriament els bacteris a la natura formen comunitats microbianes, per tant la comunicació interespecie és un recerca molt important ja que existeixen molts sistemes de QS implicats en vies de regulació molt importants. La importància biològica de que les espècies siguin capaces de respondre a AHLs exògenes, s'ha proposat que es podria deure a que és un mecanisme que serveix per a detectar la població existent en el ambient. Per tant, és molt important comprendre i establir el rol dels gens i proteïnes implicats en aquesta comunicació interespecífica en les comunitats (Ryan & Dow, 2008).

Els resultats obtinguts en aquest estudi, revelen que la inducció en la motilitat és multifactorial, ja que hem pogut observar que el *swarming* en *S. maltophilia* E77 també s'indueix amb l'addició d'AHLs sintètiques exògenes. La bibliografia utilitza aquest assaig per estimular la motilitat o bé per a restaurar el fenotip de Isoques deficientes per aquesta motilitat, quan el que interessa és complementar una mutació produïda per una proteïna sintasa. Destacar que s'ha descrit en un treball, un possible efecte humectant de les molècules d'AHLs de cadena llarga (a partir de dotze carbonis), sobre la motilitat del tipus *swarming* a



*Rhizobium etli* (Daniels, *et al.*, 2006). En tot cas, la inducció per part de les AHLs sobre la soca salvatge i no sobre la soca mutant en el gen *luxR* ens evidencia que concentracions elevades d'aquestes molècules AI són capaces d'induir el *swarming* en aquesta espècie.

Diversos autors ja han demostrat amb anterioritat que el *swarming* i el *swimming* poden estar regulats per les AHLs. Per exemple, AL-Ghoniaem, *et al.*, (2009) demostren que la motilitat del tipus *swimming* és induïda per un nombre major d'AHLs diferents de les que realment s'han detectat en els sobrenedant de la soca d'estudi i ho atribueixen a diferents raons. Com ara que no detecten certes molècules perquè estan a concentracions inferiors del límit de detecció de la soca biosensora o que directament són AHLs que no produeix la soca sinó que són produïdes per altres bacteris amb qui cohabita en l'hàbitat natural i que interfereixen en la seva motilitat produint-se una comunicació interespecie.

Una altra via per a corroborar l'efecte multifactorial sobre l'estimulació del *swarming* en *S. maltophilia* s'ha determinat mitjançant el fraccionament del sobrenedant de *P. aeruginosa* a través del qual s'ha detectat que probablement la molècula C10oxo-HSL podria induir el *swarming* en *S. maltophilia*, després d'una tentativa caracterització de la fracció a través de separació per HPLC i CCF i posterior bioassaig. S'ha demostrat en aquest treball que els biotensioactius presents en el sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 activen la motilitat de *S. maltophilia* E77. Per tant, cal considerar la possibilitat de que a més a més dels biotensioactius, part de la inducció en la motilitat de *S. maltophilia* E77, es produeixi per una comunicació interespecífica entre el sobrenedant de *P. aeruginosa* a partir d'una molècula autoinductora com la C10oxo-HSL. Pel que hem pogut observar, l'estimulació del *swarming* en la soca d'estudi es produeix amb un nombre major d'AHLs que les detectades en el sobrenedant.

## 5.8. Present i futur de l'estudi del QS bacterià.

Molts estudis han demostrat que el QS és un procés de regulació molt més complex que el que es va descriure inicialment, i que els gens *luxI* i *luxR* estan regulats, directament o indirectament, per un nombre de reguladors transcripcionals o post-transcripcionals que responen a les condicions ambientals (Boyer & Wisniewski-Dye, 2009). Per tant, el panorama actual és molt més complex que el model simple inicial que involucrava només una AHL sintasa, una molècula senyal d'AHL i el regulador LuxR específic que responia a una alta densitat poblacional. Els gens de QS s'insereixen en una xarxa de regulació global on la síntesi

del senyal d'AHL és molt sensible a la fase de creixement i als factors ambientals. D'altra banda, diferents sistemes de QS poden coexistir dins d'un sol bacteri i l'ajust entre aquests permet l'expressió de fenotips regulats pel QS. Fins i tot s'ha pogut detectar que les xarxes de regulació de QS, a vegades són soca específica i presenten diversos patrons de regulació de QS dins de soques de la mateixa espècie

En els biòtops naturals, la senyalització bacteriana està sotmesa a molts factors, tan abiòtics (tals com el pH, temperatura i composició del medi) com biòtics (altres membres de la comunitat). L'acumulació d'AHLs es basa en l'estabilitat, la difusió, el segrest, la inactivació d'AHLs i la distribució. Més enllà, pot patir interferències interespècies o interregnes, com per exemple les molècules produïdes per cèl·lules eucariotes, les quals han desenvolupat estratègies per interferir en la senyalització bacteriana i protegir-se de bacteris patògens.

Per tant, és evident que la senyalització d'AHL és molt més que una qüestió de quòrum, donada la complexitat de les xarxes de regulació i el nombre de factors que afecten a la senyalització de QS. Els diferents sistemes de QS bacterians ens proporciona una gran visió de les diferents xarxes de senyalització presents en molts patògens bacterians els quals presenten múltiples molècules de senyalització i vies de regulació i transcripció gènica.

Fins a dia d'avui, el sistema de comunicació mediat per la molècula senyal DSF s'ha estudiat en diversos treballs de *S. maltophilia*. En canvi, aquest treball s'ha centrat en iniciar el coneixement de les bases moleculars i fisiològiques que es corresponen amb un sistema de QS regulat per les molècules AI del tipus AHLs, no descrit fins ara en l'espècie de *S. maltophilia*. Els resultats obtinguts evidencien que els membres de *S. maltophilia* podrien dominar diferents sistemes de comunicació. Futurs estudis haurien d'anar dirigits en conèixer si ambdós sistemes operen d'una forma independent l'un de l'altre o convergeixen per a controlar l'expressió de certs gens i si l'activitat d'ambdós sistemes de QS està controlada via un regulador comú que encara resta per identificar. És sabut que, una de les dificultats de treballar amb sistemes de QS rau en que és una eina complicada en aquelles espècies que coexisteixen diferents sistemes de QS. Això és degut al fet que les vies de regulació i transcripció gènica moltes vegades estan relacionades i la manca d'un sistema pot sostenir-se per l'existència d'un altre.

*Conclusions*

---



## 6. CONCLUSIONS

1. Els bioassaigs realitzats amb la soca biosensora d'*A. tumefaciens* KYC55 han demostrat la presència d'AHLS en el sobrenedant de soques clíniques de *S. maltophilia*. El posterior fraccionament per cromatografia HPLC i de capa fina, i posterior anàlisi per espectrometria de masses, han corroborat la presència de tres AHLs: la C8oxo-HSL, la C8-HSL i la C10-HSL.
2. L'expressió del gen *luxR* en *S. maltophilia* E77 depèn de la fase de creixement en què es troba el cultiu, la qual és màxima en cultius saturats, fet que indica una resposta davant d'altres densitats poblacionals, coincident amb una resposta tipus *quorum sensing*. L'addició d'AHLS exògenes suposa un increment de l'expressió del gen *luxR*, fet suggereix que el complex LuxR-AHL pot activar la transcripció del regulador.
3. La regió promotora del gen *luxR* conté una hipotètica caixa d'unió *lux* conservada i pot constituir el lloc d'unió del complex LuxR-AHL, el qual podria ser el responsable de l'autoregulació de l'expressió de *luxR* detectada.
4. L'anàlisi d'unió de C8oxo-HSL i C8-HSL a LuxR demostren la presència d'un domini d'unió específic en aquest regulador per a les molècules del tipus AHL.
5. La deleció del gen *luxR* suposa una disminució en la formació de biofilm. Tant l'anàlisi semi-quantitatiu (amb cristall violeta) com la inspecció morfològica a temps real (en cambres de vidre sotmeses a flux continu), confirmen la implicació d'aquest regulador en la gènesi del biofilm.
6. L'absència de *luxR* afecta negativament la motilitat del tipus *swarming* i l'addició de sobrenedant concentrat de *P. aeruginosa* MPAO1 complementa el fenotip de la soca mutant probablement degut als ramnolípids presents que actuen com a biotensioactius.
7. La cerca per similitud de seqüència en els genomes de *Stenotrophomonas* seqüenciats disponibles a les bases de dades del NCBI i l'estudi posterior amb una soca mutant per a una hipotètica sintasa (codificada en el gen *smlt4572*), no han permès determinar la sintasa d'AHLS en *S. maltophilia*.

## Conclusions

8. La importància del QS regulat per les AHLs en la formació de biofilms i motilitat del tipus *swarming* en *S. maltophilia* E77, s'ha evidenciat a partir de l'activitat inhibidora de quorum sensing (IQS) que exerceix l'enzim lactonasa AiiA de *B. subtilis* A24, ja que inhibeix el desenvolupament d'ambdós processos.
9. Els assaigs realitzats amb les AHLs sintètiques estimulen el *swarming* de la soca salvatge i no de la defectiva en el gen *luxR*. El sobrenedant de *P. aeruginosa* MPAO1 conté una AHL C10oxo-HSL que també estimula la motilitat de la soca salvatge actuant de forma interespecífica, tal i com succeeix amb el sobrenedant total.

## *Bibliografia*

---





## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abbott IJ, Slavin MA, Turnidge JD, Thursky KA & Worth LJ (2011) Stenotrophomonas maltophilia: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* **9**: 471-488.
- Ahmer BM (2004) Cell-to-cell signalling in Escherichia coli and Salmonella enterica. *Mol Microbiol* **52**: 933-945.
- AL-Ghoniaem MI, A.S.S. Ibrahim and A.A. Al-Salamah (2009) Swimming motility in Agrobacterium tumefaciens is controlled by quorum sensing and inhibited by garlic bulb extract. *Res. J. Microbiol* **4**: 345-354.
- Alonso A & Martinez JL (1997) Multiple antibiotic resistance in Stenotrophomonas maltophilia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1140-1142.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, *et al.* (2006) A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114-1128.
- Andersen JB, Heydorn A, Hentzer M, *et al.* (2001) gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol* **67**: 575-585.
- Andersson RA, Eriksson AR, Heikinheimo R, *et al.* (2000) Quorum sensing in the plant pathogen Erwinia carotovora subsp. carotovora: the role of expR(Ecc). *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 384-393.
- Anwar H, Dasgupta MK & Costerton JW (1990) Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 2043-2046.
- Atkinson S, Chang CY, Sockett RE, Camara M & Williams P (2006) Quorum sensing in Yersinia enterocolitica controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol* **188**: 1451-1461.
- Bainton NJ, Bycroft BW, Chhabra SR, *et al.* (1992) A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in Erwinia. *Gene* **116**: 87-91.
- Barber CE, Tang JL, Feng JX, *et al.* (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of Xanthomonas campestris is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24**: 555-566.
- Barnard AM & Salmond GP (2007) Quorum sensing in Erwinia species. *Anal Bioanal Chem* **387**: 415-423.
- Bassler BL (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**: 421-424.
- Bassler BL & Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* **125**: 237-246.
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE & Silverman MR (1993) Intercellular signalling in Vibrio harveyi: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* **9**: 773-786.
- Berg G, Roskot N & Smalla K (1999) Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of Stenotrophomonas maltophilia. *J Clin Microbiol* **37**: 3594-3600.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1673-1685.
- Bertani I & Venturi V (2004) Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere Pseudomonas putida WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5493-5502.
- Bhardwaj AK, Vinothkumar K & Rajpara N (2013) Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **8**: 68-83.
- Bjarnsholt T, Jensen PO, Rasmussen TB, *et al.* (2005) Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infections. *Microbiology* **151**: 3873-3880.

- Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, *et al.* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* **151**: 373-383.
- Boon C, Deng Y, Wang LH, *et al.* (2008) A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *ISME J* **2**: 27-36.
- Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R & Carfi A (2007) Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem* **282**: 13592-13600.
- Boyer M & Wisniewski-Dye F (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 1-19.
- Brooke JS (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* **25**: 2-41.
- Brooke JS (2014) New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther* **12**: 1-4.
- Byers JT, Lucas C, Salmond GP & Welch M (2002) Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* **184**: 1163-1171.
- Caiazza NC, Shanks RM & O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 7351-7361.
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 3603-3612.
- Camara M, Williams P & Hardman A (2002) Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* **2**: 667-676.
- Cámara M, Daykin M & Chhabra SR (1998) 6.12 Detection, Purification, and Synthesis of *N*-acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signal Molecules. *Methods in Microbiology*, Vol. Volume 27 (Peter Williams JK & George S, ed. eds.), p. pp. 319-330. Academic Press.
- Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, Dessaux Y & Faure D (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4989-4993.
- Case RJ, Labbate M & Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* **2**: 345-349.
- Cases I & de Lorenzo V (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* **3**: 105-118.
- Colnaghi Simionato AV, da Silva DS, Lambais MR & Carrilho E (2007) Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *J Mass Spectrom* **42**: 1375-1381.
- Conway BA, Venu V & Speert DP (2002) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* **184**: 5678-5685.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M & Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**: 435-464.
- Covaceuszach S, Degrassi G, Venturi V & Lamba D (2013) Structural insights into a novel interkingdom signaling circuit by cartography of the ligand-binding sites of the homologous quorum sensing LuxR-family. *Int J Mol Sci* **14**: 20578-20596.
- Cox AR, Thomson NR, Bycroft B, Stewart GS, Williams P & Salmond GP (1998) A pheromone-independent CarR protein controls carbapenem antibiotic synthesis in the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*. *Microbiology* **144 ( Pt 1)**: 201-209.
- Crossman L & Dow JM (2004) Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* **6**: 623-629.

- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, *et al.* (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* **9**: R74.
- Cruz SA, Popat R, Rybtke MT, *et al.* (2012) Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling* **28**: 835-842.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD & Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1119-1129.
- Chai Y & Winans SC (2004) Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol Microbiol* **51**: 765-776.
- Chai Y, Zhu J & Winans SC (2001) TrlR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrlR:TraR dimers. *Mol Microbiol* **40**: 414-421.
- Chan KG, Atkinson S, Mathee K, *et al.* (2011) Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol* **11**: 51.
- Chan YY & Chua KL (2005) The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *J Bacteriol* **187**: 4707-4719.
- Chan YY, Bian HS, Tan TM, *et al.* (2007) Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **189**: 4320-4324.
- Chernin LS, Winson MK, Thompson JM, *et al.* (1998) Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J Bacteriol* **180**: 4435-4441.
- Choi KH & Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**: 153-161.
- Choi KH, Kumar A & Schweizer HP (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391-397.
- Christensen BB, Haagensen JA, Heydorn A & Molin S (2002) Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2495-2502.
- Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Palmer RJ, Jr., Nielsen AT, Givskov M & Molin S (1999) Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol* **310**: 20-42.
- Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C & Greenberg EP (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2752-2757.
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J & Greenberg EP (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3587-3590.
- Daniels R, Vanderleyden J & Michiels J (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 261-289.
- Daniels R, Reynaert S, Hoekstra H, *et al.* (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14965-14970.
- Danino VE, Wilkinson A, Edwards A & Downie JA (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**: 511-525.
- Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 114-122.
- Davies DG & Geesey GG (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* **61**: 860-867.

- Davies DG & Marques CN (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**: 1393-1403.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C & Iglewski BH (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1865-1873.
- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcantara N, Martinez MB & Giron JA (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* **5**: 625-636.
- Deng Y, Boon C, Eberl L & Zhang LH (2009) Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase. *J Bacteriol* **191**: 7270-7278.
- Deng Y, Wu J, Tao F & Zhang LH (2011) Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev* **111**: 160-173.
- Deng Y, Lim A, Wang J, *et al.* (2013) Cis-2-dodecenoic acid quorum sensing system modulates N-acyl homoserine lactone production through RpfR and cyclic di-GMP turnover in *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Microbiol* **13**: 148.
- Deziel E, Lepine F, Milot S & Villemur R (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005-2013.
- Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I & Piccolomini R (2004) Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 151-160.
- Di Bonaventura G, Pompilio A, Zappacosta R, Petrucci F, Fiscarelli E, Rossi C & Piccolomini R (2010) Role of excessive inflammatory response to *Stenotrophomonas maltophilia* lung infection in DBA/2 mice and implications for cystic fibrosis. *Infect Immun* **78**: 2466-2476.
- Di Bonaventura G, Prosseda G, Del Chierico F, *et al.* (2007) Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**: 529-537.
- Dickschat JS (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* **27**: 343-369.
- Ding X, Yin B, Qian L, *et al.* (2011) Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Med Microbiol* **60**: 1827-1834.
- Dong YH, Wang LY & Zhang LH (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1201-1211.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ & Zhang LH (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3526-3531.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF & Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**: 813-817.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX & Tang JL (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10995-11000.
- Drenkard E (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**: 1213-1219.
- Dubern JF & Diggle SP (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882-888.

- Dubois T, Faegri K, Perchat S, *et al.* (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog* **8**: e1002629.
- Dunlap PV (1999) Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 5-12.
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH & Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444-2449.
- Eberl L, Molin S & Givskov M (1999) Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**: 1703-1712.
- Eberl L, Winson MK, Sternberg C, *et al.* (1996) Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**: 127-136.
- Egland KA & Greenberg EP (2000) Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J Bacteriol* **182**: 805-811.
- El-Sayed AK, Hotherhall J & Thomas CM (2001) Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology* **147**: 2127-2139.
- El-Sayed AK, Hotherhall J, Cooper SM, Stephens E, Simpson TJ & Thomas CM (2003) Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chem Biol* **10**: 419-430.
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, *et al.* (2001) Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1198-1209.
- Engbrecht J & Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4154-4158.
- Engbrecht J, Nealson K & Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773-781.
- Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, *et al.* (2002) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **70**: 1783-1790.
- Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK & Dimopoulos G (2009) Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 719-730.
- Farrand SK, Qin Y & Oger P (2002) Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymol* **358**: 452-484.
- Ferluga S & Venturi V (2009) OryR is a LuxR-family protein involved in interkingdom signaling between pathogenic *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *J Bacteriol* **191**: 890-897.
- Ferluga S, Bigirimana J, Hofte M & Venturi V (2007) A LuxR homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for optimal rice virulence. *Mol Plant Pathol* **8**: 529-538.
- Ferrer-Navarro M, Planell R, Yero D, *et al.* (2013) Abundance of the Quorum-Sensing Factor Ax21 in Four Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* Correlates with Mortality Rate in a New Zebrafish Model of Infection. *PLoS ONE* **8**: e67207.
- Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, *et al.* (2007) Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **189**: 4964-4968.
- Fried L, Lassak J & Jung K (2012) A comprehensive toolbox for the rapid construction of lacZ fusion reporters. *J Microbiol Methods* **91**: 537-543.
- Fuqua C (2006) The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J Bacteriol* **188**: 3169-3171.

- Fuqua C & Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 685-695.
- Fuqua C, Winans SC & Greenberg EP (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**: 727-751.
- Fuqua C, Parsek MR & Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439-468.
- Fuqua WC & Winans SC (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796-2806.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
- Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M & Spring DR (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**: 28-67.
- Gamage AM, Shui G, Wenk MR & Chua KL (2011) N-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* **157**: 1176-1186.
- Geske GD, O'Neill JC & Blackwell HE (2008) Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Soc Rev* **37**: 1432-1447.
- Gilson L, Kuo A & Dunlap PV (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**: 6946-6951.
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, *et al.* (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**: 6618-6622.
- Glessner A, Smith RS, Iglewski BH & Robinson JB (1999) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol* **181**: 1623-1629.
- Gonzalez JE & Marketon MM (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 574-592.
- Gonzalez JF & Venturi V (2013) A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci* **18**: 167-174.
- Gonzalez JF, Myers MP & Venturi V (2013) The inter-kingdom solo OryR regulator of *Xanthomonas oryzae* is important for motility. *Mol Plant Pathol* **14**: 211-221.
- Gould TA, Herman J, Krank J, Murphy RC & Churchill ME (2006) Specificity of acyl-homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry. *J Bacteriol* **188**: 773-783.
- Graff GR & Burns JL (2002) Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis. *Chest* **121**: 1754-1760.
- Gray KM & Garey JR (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**: 2379-2387.
- Gulmez D, Cakar A, Sener B, Karakaya J & Hascelik G (2010) Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing. *J Infect Chemother* **16**: 322-328.
- Haagensen JA, Klausen M, Ernst RK, Miller SI, Folkesson A, Tolker-Nielsen T & Molin S (2007) Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **189**: 28-37.
- Haas D & Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* **3**: 307-319.
- Ham JH (2013) Intercellular and intracellular signalling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* **14**: 308-322.

- Hanzelka BL, Stevens AM, Parsek MR, Crone TJ & Greenberg EP (1997) Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**: 4882-4887.
- Hao G, Zhang H, Zheng D & Burr TJ (2005) luxR homolog avhR in *Agrobacterium vitis* affects the development of a grape-specific necrosis and a tobacco hypersensitive response. *J Bacteriol* **187**: 185-192.
- Harshey RM (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389-394.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.
- Harshey RM & Matsuyama T (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8631-8635.
- Hastings JW (2004) Bacterial quorum-sensing signals are inactivated by mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3993-3994.
- He YW, Xu M, Lin K, et al. (2006) Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol* **59**: 610-622.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.
- Hentzer M, Eberl L, Nielsen J & Givskov M (2003) Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs* **17**: 241-250.
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**: 3803-3815.
- Heydorn A, Ersboll B, Kato J, et al. (2002) Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2008-2017.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86.
- Hothersall J, Murphy AC, Iqbal Z, et al. (2011) Manipulation of quorum sensing regulation in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 to increase mupirocin production. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 1017-1026.
- Huang JJ, Han JI, Zhang LH & Leadbetter JR (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5941-5949.
- Huang TP & Lee Wong AC (2007) Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Res Microbiol* **158**: 702-711.
- Huang TP & Wong AC (2007) A cyclic AMP receptor protein-regulated cell-cell communication system mediates expression of a FecA homologue in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5034-5040.
- Huang TP, Somers EB & Wong AC (2006) Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **188**: 3116-3120.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, et al. (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**: 2517-2528.
- Hugh R & Ryschenkow E (1961) *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *J Gen Microbiol* **26**: 123-132.
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14339-14344.

- Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H & Trevors JT (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **13**: 271-279.
- Jayaraman A & Wood TK (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* **10**: 145-167.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH & Quax WJ (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 46-65.
- Julkowska D, Obuchowski M, Holland IB & Seror SJ (2005) Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J Bacteriol* **187**: 65-76.
- Kalia VC & Purohit HJ (2011) Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit Rev Microbiol* **37**: 121-140.
- Kendall MM & Sperandio V (2007) Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 10-15.
- Kirisits MJ & Parsek MR (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol* **8**: 1841-1849.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP & de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C & Pechere JC (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990-5996.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kowalko JE & Seibert ME (2008) The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization. *Infect Immun* **76**: 3131-3140.
- Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M & Kjelleberg S (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**: 692-698.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Legendijk EL, Validov S, Lamers GE, de Weert S & Bloemberg GV (2010) Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 81-90.
- LaSarre B & Federle MJ (2013) Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 73-111.
- Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, *et al.* (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** ( Pt 10): 2469-2480.
- Lazenby JJ, Griffin PE, Kyd J, Whitchurch CB & Cooley MA (2013) A quadruple knockout of lasIR and rhlIR of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 that retains wild-type twitching motility has equivalent infectivity and persistence to PAO1 in a mouse model of lung infection. *PLoS ONE* **8**: e60973.
- Leadbetter JR & Greenberg EP (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**: 6921-6926.
- Lee J, Jayaraman A & Wood TK (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* **7**: 42.
- Lee JH, Lequette Y & Greenberg EP (2006) Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol* **59**: 602-609.



- Lequette Y, Lee JH, Ledgham F, Lazdunski A & Greenberg EP (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* **188**: 3365-3370.
- Lewenza S, Conway B, Greenberg EP & Sokol PA (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**: 748-756.
- Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 999-1007.
- Liaw SJ, Lee YL & Hsueh PR (2010) Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 126-130.
- Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR & Zhang LH (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**: 849-860.
- Lindsay A & Ahmer BM (2005) Effect of *sdiA* on biosensors of N-acylhomoserine lactones. *J Bacteriol* **187**: 5054-5058.
- Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Molin S & Givskov M (1998) N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**: 6384-6388.
- Lira F, Hernandez A, Belda E, Sanchez MB, Moya A, Silva FJ & Martinez JL (2012) Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, a clinical isolate and a model strain. *J Bacteriol* **194**: 3563-3564.
- Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dye F, Williams P & Downie JA (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* **37**: 81-97.
- Liu X, Jia J, Papat R, *et al.* (2011) Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. *BMC Microbiol* **11**: 26.
- Looney WJ, Narita M & Muhlemann K (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* **9**: 312-323.
- Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.
- Maeda T, Garcia-Contreras R, Pu M, Sheng L, Garcia LR, Tomas M & Wood TK (2012) Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J* **6**: 493-501.
- Malott RJ, Baldwin A, Mahenthiralingam E & Sokol PA (2005) Characterization of the *cciIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **73**: 4982-4992.
- Manfield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P & Kjelleberg S (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145 (Pt 2)**: 283-291.
- Manfield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S & Givskov M (2002) Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**: 1119-1127.
- Mashburn LM & Whiteley M (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**: 422-425.
- Matsukawa M & Greenberg EP (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 4449-4456.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D & Defago G (1998) Salicylic Acid Biosynthetic Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* **88**: 678-684.
- McAdams HH, Srinivasan B & Arkin AP (2004) The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nat Rev Genet* **5**: 169-178.

- McCarthy Y, Dow JM & Ryan RP (2011) The Ax21 protein is a cell-cell signal that regulates virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **193**: 6375-6378.
- McCarthy Y, Yang L, Twomey KB, *et al.* (2010) A sensor kinase recognizing the cell-cell signal BDSF (cis-2-dodecenoic acid) regulates virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* **77**: 1220-1236.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, *et al.* (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143 ( Pt 12)**: 3703-3711.
- Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F & Ahmer BM (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* **183**: 5733-5742.
- Milton DL (2006) Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* **296**: 61-71.
- Miller JM (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Molin S & Tolker-Nielsen T (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 255-261.
- Molina L, Constantinescu F, Michel L, Reimmann C, Duffy B & Defago G (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* **45**: 71-81.
- More MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A & Winans SC (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**: 1655-1658.
- Moreira CG, Weinschenker D & Sperandio V (2010) QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. *Infect Immun* **78**: 914-926.
- Nasser W & Reverchon S (2007) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387**: 381-390.
- Nealson KH & Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**: 496-518.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
- Nemoto K, Hirota K, Murakami K, Taniguti K, Murata H, Viducic D & Miyake Y (2003) Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* **49**: 121-125.
- Ng WL & Bassler BL (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**: 197-222.
- Ni N, Li M, Wang J & Wang B (2009) Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev* **29**: 65-124.
- Nicodemo AC & Paez JI (2007) Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**: 229-237.
- Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA & Rather PN (2008) Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* **190**: 3386-3392.
- Niu C, Graves JD, Mokuolu FO, Gilbert SE & Gilbert ES (2005) Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J Microbiol Methods* **62**: 129-132.
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- Ochsner UA & Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6424-6428.

- Oger P, Kim KS, Sackett RL, Piper KR & Farrand SK (1998) Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of *traR*, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol Microbiol* **27**: 277-288.
- Overhage J, Lewenza S, Marr AK & Hancock RE (2007) Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J Bacteriol* **189**: 2164-2169.
- Overhage J, Bains M, Brazas MD & Hancock RE (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2671-2679.
- Palleroni NJ & Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 606-609.
- Pamp SJ & Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 2531-2539.
- Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY & Lee JK (2003) AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**: 1541-1550.
- Parsek MR & Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8789-8793.
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L & Iglewski BH (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**: 1127-1130.
- Patankar AV & Gonzalez JE (2009) Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 739-756.
- Pearson JP, Pesci EC & Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**: 5756-5767.
- Pearson JP, Van Delden C & Iglewski BH (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**: 1203-1210.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH & Greenberg EP (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1490-1494.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH & Greenberg EP (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 197-201.
- Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givskov M & Nielsen J (2005) Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem* **3**: 253-262.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP & Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11229-11234.
- Podbielski A, Peterson JA & Cleary P (1992) Surface protein-CAT reporter fusions demonstrate differential gene expression in the *vir* regulon of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **6**: 2253-2265.
- Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V & Di Bonaventura G (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 41-47.
- Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, et al. (2010) Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* **10**: 102.

- Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, *et al.* (2011) Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* **11**: 159.
- Ramli NS, Eng Guan C, Nathan S & Vadivelu J (2012) The effect of environmental conditions on biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. *PLoS ONE* **7**: e44104.
- Rasmussen TB & Givskov M (2006) Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* **152**: 895-904.
- Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, *et al.* (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**: 1325-1340.
- Reimann C, Ginet N, Michel L, *et al.* (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**: 923-932.
- Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW & Kjelleberg S (2005) Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* **187**: 3477-3485.
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, *et al.* (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147**: 3249-3262.
- Rivas M, Seeger M, Jedlicki E & Holmes DS (2007) Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3225-3231.
- Rocco F, De Gregorio E, Colonna B & Di Nocera PP (2009) *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: a start-up comparison. *Int J Med Microbiol* **299**: 535-546.
- Rocha-Estrada J, Aceves-Diez AE, Guarneros G & de la Torre M (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 913-923.
- Rodelas B, Lithgow JK, Wisniewski-Dye F, *et al.* (1999) Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* **181**: 3816-3823.
- Romero M, Acuna L & Otero A (2012) Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Pat Biotechnol* **6**: 2-12.
- Roschetto E, Angrisano T, Costa V, *et al.* (2012) Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **194**: 5864-5874.
- Ryan RP & Dow JM (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* **154**: 1845-1858.
- Ryan RP, McCarthy Y, Watt SA, Niehaus K & Dow JM (2009) Intraspecies signaling involving the diffusible signal factor BDSF (*cis*-2-dodecenoic acid) influences virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *J Bacteriol* **191**: 5013-5019.
- Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, *et al.* (2008) Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **68**: 75-86.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, *et al.* (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* **7**: 514-525.
- Sambrook JR, D. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaefer AL, Hanzelka BL, Parsek MR & Greenberg EP (2000) Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol* **305**: 288-301.

- Schmid N, Pessi G, Deng Y, *et al.* (2012) The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in *Burkholderia cenocepacia* H111. *PLoS ONE* **7**: e49966.
- Schuster M, Urbanowski ML & Greenberg EP (2004) Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15833-15839.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T & Greenberg EP (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066-2079.
- Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS & Greenberg EP (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**: 973-985.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Jr., Rinehart KL & Farrand SK (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6036-6041.
- Shih GC, Kahler CM, Swartley JS, Rahman MM, Coleman J, Carlson RW & Stephens DS (1999) Multiple lysophosphatidic acid acyltransferases in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **32**: 942-952.
- Shrout JD, Tolker-Nielsen T, Givskov M & Parsek MR (2011) The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bull* **36**: 367-373.
- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M & Parsek MR (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**: 1264-1277.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ & Greenberg EP (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**: 762-764.
- Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ & Dow JM (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38**: 986-1003.
- Smith JN & Ahmer BM (2003) Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol* **185**: 1357-1366.
- Smith RS & Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**: 56-60.
- Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Gingues S, Forstner J & Kooi C (2003) The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* **149**: 3649-3658.
- Steidle A, Allesen-Holm M, Riedel K, Berg G, Givskov M, Molin S & Eberl L (2002) Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6371-6382.
- Steindler L & Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**: 1-9.
- Stevens AM & Greenberg EP (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* **179**: 557-562.
- Stevens AM, Queneau Y, Soulere L, von Bodman S & Doutheau A (2011) Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chem Rev* **111**: 4-27.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG & Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Subramoni S & Venturi V (2009) PpoR is a conserved unpaired LuxR solo of *Pseudomonas putida* which binds N-acyl homoserine lactones. *BMC Microbiol* **9**: 125.
- Subramoni S & Venturi V (2009) LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* **155**: 1377-1385.

- Subramoni S, Gonzalez JF, Johnson A, *et al.* (2011) Bacterial subfamily of LuxR regulators that respond to plant compounds. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4579-4588.
- Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G & Eberl L (2013) Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the Burkholderia cepacia complex. *Virulence* **4**: 400-409.
- Surette MG, Miller MB & Bassler BL (1999) Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio harveyi: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1639-1644.
- Swings J, De Vos, P., Van der Mooter, M., and Deley, S. (1983) Transfer of Pseudomonas maltophilia HUGH 1981 to the genus Xanthomonas as Xanthomonas maltophilia (HUGH 1981). *comb. nov. Int J Syst Bacteriol* **33**: 40-413.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
- Teitzel GM & Parsek MR (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2313-2320.
- Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE & Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* **111**: 117-151.
- Tolker-Nielsen T & Sternberg C (2011) Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 1**: Unit 1B 2.
- Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA & Ceri H (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5208-5218.
- Turrientes MC, Baquero MR, Sanchez MB, *et al.* (2010) Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental Stenotrophomonas maltophilia populations. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1746-1758.
- Urbanowski ML, Lostroh CP & Greenberg EP (2004) Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified Vibrio fischeri LuxR protein. *J Bacteriol* **186**: 631-637.
- Uroz S, Dessaux Y & Oger P (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem* **10**: 205-216.
- Uroz S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Oger P & Dessaux Y (2005) N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by Rhodococcus erythropolis W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology* **151**: 3313-3322.
- Valade E, Thibault FM, Gauthier YP, Palencia M, Popoff MY & Vidal DR (2004) The PmlI-PmlR quorum-sensing system in Burkholderia pseudomallei plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J Bacteriol* **186**: 2288-2294.
- Valdezate S, Vindel A, Martin-Davila P, Del Saz BS, Baquero F & Canton R (2004) High genetic diversity among Stenotrophomonas maltophilia strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol* **42**: 693-699.
- Van Houdt R, Givskov M & Michiels CW (2007) Quorum sensing in Serratia. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 407-424.
- Vannini A, Volpari C, Gargioli C, *et al.* (2002) The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J* **21**: 4393-4401.
- Venturi V & Subramoni S (2009) Future research trends in the major chemical language of bacteria. *HFSP J* **3**: 105-116.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J & Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**: 496-506.
- Veselova M, Kholmeckaya M, Klein S, *et al.* (2003) Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 794-798.

- von Bodman SB, Majerczak DR & Coplin DL (1998) A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7687-7692.
- Von Bodman SB, Bauer WD & Coplin DL (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455-482.
- Wang LH, Weng LX, Dong YH & Zhang LH (2004) Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* **279**: 13645-13651.
- Wang LH, He Y, Gao Y, *et al.* (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51**: 903-912.
- Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.
- Waters V, Yau Y, Prasad S, *et al.* (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 635-640.
- Waters VJ, Gomez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK & Prince A (2007) Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun* **75**: 1698-1703.
- Wei HL & Zhang LQ (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 267-280.
- Welch M, Todd DE, Whitehead NA, McGowan SJ, Bycroft BW & Salmond GP (2000) N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *EMBO J* **19**: 631-641.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC & Mattick JS (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- White CE & Winans SC (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1135-1148.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
- Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dye F, Lithgow JK & Downie JA (2002) N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* **184**: 4510-4519.
- Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**: 3923-3938.
- Williams P, Winzer K, Chan WC & Camara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1119-1134.
- Winson MK, Swift S, Fish L, *et al.* (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185-192.
- Winson MK, Camara M, Latifi A, *et al.* (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9427-9431.
- Wisniewski-Dye F & Downie JA (2002) Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 397-407.
- Wopperer J, Cardona ST, Huber B, Jacobi CA, Valvano MA & Eberl L (2006) A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1579-1587.
- Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Molin S, Givskov M & Hoiby N (2004) Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* **53**: 1054-1061.

- Yao Y, Martinez-Yamout MA, Dickerson TJ, Brogan AP, Wright PE & Dyson HJ (2006) Structure of the Escherichia coli quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J Mol Biol* **355**: 262-273.
- Yarwood JM, Volper EM & Greenberg EP (2005) Delays in Pseudomonas aeruginosa quorum-controlled gene expression are conditional. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9008-9013.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, *et al.* (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **70**: 5635-5646.
- Zhai C, Zhang P, Shen F, Zhou C & Liu C (2012) Does Microcystis aeruginosa have quorum sensing? *FEMS Microbiol Lett* **336**: 38-44.
- Zhang L, Li XZ & Poole K (2000) Multiple antibiotic resistance in Stenotrophomonas maltophilia: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 287-293.
- Zhang L, Jia Y, Wang L & Fang R (2007) A proline iminopeptidase gene upregulated in planta by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris. *Mol Microbiol* **65**: 121-136.
- Zhang L, Morrison M, P OC, Evans P & Rickard CM (2013) Genome Sequence of Stenotrophomonas maltophilia Strain AU12-09, Isolated from an Intravascular Catheter. *Genome Announc* **1**.
- Zhang RG, Pappas KM, Brace JL, *et al.* (2002) Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* **417**: 971-974.
- Zheng D, Zhang H, Carle S, Hao G, Holden MR & Burr TJ (2003) A luxR homolog, aviR, in Agrobacterium vitis is associated with induction of necrosis on grape and a hypersensitive response on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 650-658.
- Zhu H, Thuruthyl SJ & Willcox MD (2001) Production of N-acyl homoserine lactones by gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clin Experiment Ophthalmol* **29**: 150-152.
- Zhu J & Winans SC (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1507-1512.
- Zhu J, Chai Y, Zhong Z, Li S & Winans SC (2003) Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in Mesorhizobium huakuii. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6949-6953.
- Zhu J, Beaber JW, More MI, Fuqua C, Eberhard A & Winans SC (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* **180**: 5398-5405.