






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

TESI DOCTORAL

Factors de Resistència i Virulència Relacionats amb el Quorum
Sensing i la Regulació del Metabolisme i Homeòstasi Lipídica en
Stenotrophomonas maltophilia

Xavier Coves Lozano

Gener 2022



Institut de Biotecnologia i Biomedicina



Departament de Genètica i de Microbiologia

Factors de Resistència i Virulència Relacionats amb el Quorum Sensing i la Regulació del Metabolisme i Homeòstasi Lipídica en
Stenotrophomonas maltophilia

Tesi Doctoral presentada per **Xavier Coves Lozano** per optar al **Grau de Doctor** per la Universitat Autònoma de Barcelona. Programa de **Doctorat de Microbiologia** de la Facultat de Biociències.

Vist-i-plau dels Directors de la Tesis,

Dr. Isidre Gibert González

Dr. Daniel Yero Corona

Bellaterra, Gener 2022

Als meus pares i a la Laura.

AGRAÏMENTS

M'agradaria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que d'una manera o altra han format part d'aquest camí.

En primer lloc, agrair al Dr. Isidre Gibert per donar-me la confiança per a poder desenvolupar la tesi en el seu laboratori. Des d'aquell primer dia on ens vam conèixer per a realitzar les pràctiques del Màster, fins a aquest darrer dia on escric aquestes paraules, gràcies. Gràcies per confiar, per deixar-me aprendre i sobretot, pel teu valor professional i humà, que ha fet aquest camí més senzill. Espero poder trobar-me persones tan generoses com tu en el meu futur, perquè ets part important de qui sóc actualment.

En segon lloc, vull expressar el meu màxim agraïment al meu codirector, el Dr. Daniel Yero. Ets responsable de l'amor i el respecte que tinc cap a la ciència. Amb cada suggerència has millorat aquest treball i tinc una admiració enorme per la teva dedicació i honestedat. En tots aquests anys he descobert una persona agraïda, divertida i curiosa que m'ha fet créixer en tots el sentits.

A tots dos, Isidre i Daniel, gràcies infinites. Si més endavant arribo a ser una fracció del que sou vosaltres em donaré per satisfet. Formeu un gran equip professional, però per mi el més important són els valors que transmeteu. Un autèntic plaer haver compartit tots aquests anys amb vosaltres.

També, tot i no formar part oficialment d'aquest treball, vull dedicar-te un lloc especial a tu, Pol. Des de les teves "boges" idees (que la majoria han resultat no ser-ho) fins a tots els teus consells i experiències, hi ha molta part de tu en aquesta tesi. Tens una manera de veure les coses envejable, i la teva perspectiva ha donat una qualitat enorme a aquesta tesi. També em quedo amb totes les converses amb cafè en mà al pati de l'IBB, i amb tots aquells partits de futbol on sortíem del món "científic" i on tant hem gaudit. Et desitjo tots els èxits professionals i el més important, que gaudeixis dels teus dos tresors.

A la resta de companys del laboratori, també agrair-vos fer tota aquesta etapa més feliç. A tu, Sònia, per acollir-me al laboratori i per ensenyar-me a treballar de manera organitzada. Encara recordo els meus primers dies, on amb tota la paciència em vas introduir en aquest món. Gràcies també a la Celeste per tota la seva col·laboració i bona disposició. També, gràcies per la teva alegria diària. De la mateixa manera, Meissi, un plaer haver treballat amb tu, he gaudit de la teva presència al laboratori i tinc una gran admiració per a com has compaginat la tesi amb la teva vida personal. A tu, Pablo, agrair-te la teva dedicació i la teva experiència en el dia a dia. Tot i que no hem compartit línia de recerca, hem compartit les penes del dia a dia. A tots us desitjo la millor de les sorts en cada un dels

vostres camins. Als company de bioinformàtica, Xavi i Òscar, també agrair-vos tota l'ajuda durant aquests anys i els vostres comentaris. Òscar, des dels inicis on vas lluitar per a que aprenguéss a picar codi fins a tot el suport en la part *in silico* d'aquest treball. Sense la teva disposició, molta part d'aquest treball no hagués estat possible. I a tu Xavi, per totes les crítiques constructives i tota la ajuda donada aquests anys. La teva experiència també es veu reflectida en aquesta tesi. Finalment, a tota la gent que ha passat pel laboratori aquests anys, on he tingut la sort de poder ajudar a alguns de vosaltres en treballs de final de grau i tesines. Especialment a tu Marc, perquè tinc la certesa que la teva capacitat et portarà allà on tu vulguis. Espero que tinguis èxit en tot el que et proposis, i que la feina que vam començar junts acabi donant grans resultats.

Als companys de fora del laboratori també agrair-vos tots els bons moments que hem passat. A la gent de Llevats, especialment. Al Diego, una persona excel·lent que m'ha donat alegria dia a dia; al Carlos, per la seva ironia i per la confiança que ens vam tenir des d'un principi; al Marcel pel seu humor únic i al Santo, perquè a banda dels bons moments com a equip organitzador de la Fondue, ets una persona increïble. Molta sort a tots i enhorabona per l'ambient que vas crear al lab! També menció especial a tu Jara, per la relació que hem tingut des del primer dia i per tots els riures que m'has tret durant tants anys! Podria seguir un a un, però en general agrair a tota la gent que ha passat per l'IBB perquè he conegut persones increïbles.

Però no puc tancar els agraïments a gent de l'IBB sense adreçar-me a tu, Miguel. Empezar y acabar el día hablando un rato contigo ha sido increíble, siempre has estado disponible para unos ratos de risas y para hablar sobre la vida. Un placer haber conocido a alguien como tú, y te desearé siempre lo mejor, aunque seas del Ajax ;-). Igualment, a les companyes d'administració, per lluitar sempre amb les urgències de darrera hora, així com a tot el personal tècnic de suport.

Uwe, I can't summarize how grateful I am. You accepted me for the intership at your lab and you have been the best host I could ever had. Your knowledge and experience are indescribable, and I still miss all the conversations about life and science we had during my stay. You helped not only in the scientific work, but also you became a fantastic tourist guide during those 3 winter months, which I enjoyed so much. Thank you so much, also to Dörte and Manuel for all your help and kindness. During my stay in Börstel, I met one of the funniest and greatest people, which are Ivan and Draginja. Ivan, we got along since the very first moment, and I have to blame you for introducing me into the climbing world. I really enjoyed every day with you and I am still waiting for you to come back to Barcelona. And you, Draginja, were the one who made my day a little better during those months. You were an amazing support and one of the best people I have ever met. I hope the very best for you.

Finalment, agrair a tots els meus amics per acompanyar-me en aquest camí. Especialment a vosaltres Jose, Roderó, Xifró, Romero, Peña i Kapde. Tant el dia a dia com tots els viatges realitzats m'heu fet sentir afortunat de poder compartir i viure tantes experiències amb vosaltres. També a la família Santiago, perquè m'han cuidat com si formés part de la seva família i m'han ajudat des de petit. Os debo tanto! De la mateixa manera, tots els companys de la uni, on poc a poc vam anar creixent, però sempre gaudint de tota l'experiència. Aquí te incluyo Jose, porque aunque te conocí despues de la uni te considero como uno más. Junto con Elena hemos vivido grandes momentos, tanto de vecinos confinados como en viajes, de los que todavía tenemos unos cuantos pendientes! Jefa, gràcies per ser com ets i per haver insistit tant amb aquesta tesi, sento que també l'has patit.

Als meus companys actuals de Werfen. A tu, Noe, perquè en uns moments no massa fàcils per a mi vas ser la llum que m'alegrava els dies. Dono gràcies de que apareguessis en el moment en el que ho vas fer i espero compartir amb tu tots els anys i experiències possibles. A tu Joan, perquè és un plaer viatjar amb tu i aprendre de tu, i perquè també has apretat per a que aquesta tesi fos una realitat. A tu, Maria, pel teu suport i per la teva comprensió. T'admiro enormement i és un gust absolut formar part del teu equip. I a tí, Lucas, porque tu apoyo se dejó notar desde el primer día.

A la família Gimferrer, per acollir-me des del primer moment, i per estar sempre disponibles. Gràcies per tot. A tu, Josep Maria, especialment per la teva insistència en saber com va la tesi. A tu, Rosa, perquè sempre t'has preocupat per a que estigués bé.

Però si hi ha una cosa que us he d'agair és haver portat a aquest món a la Laura. Tu ets més que la meva companya de vida, ho ets tot. Has patit com ningú aquesta tesi, tot el que t'hauria d'agair no cap en aquestes pàgines. Ets el meu suport més gran, i cada dia em sento afortunat de que els nostres camins es creuessin. T'admiro enormement, em complementes en tots els sentits. Tu ets tot el que necessito.

A la meva família, que sempre ha confiat en mi. Als meus avis, que sempre m'han malcriat i ho han donat tot per mi. Perquè l'amor l'he conegut amb vosaltres i us en dono les gràcies. En especial als meus pares, que des de petit em van ensenyar a ser crític i que m'ho han donat tot, sense vosaltres mai hagués arribat aquí. A tu, papa, perquè des de ben petit vas despertar en mi la curiositat d'aprendre, i perquè has marcat el meu caràcter i m'has fet ser com sóc. I a tu, mama, perquè sé que ningú hagués gaudit com tu amb el resultat d'aquests anys. Vas marxar massa aviat, i sé que haguessis fet l'impossible per veure com el teu fill defensava la tesi. El meu major agraiment és per a tu, per a estimar-me com ho vas fer i per entregar-te amb tot per a que jo fos feliç.

Aquesta tesi és per tu.

INDEX

RESUM	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> : característiques generals	9
1.1.1. Taxonomia	9
1.1.2. Hàbitat i biologia	9
1.1.3. Rellevància clínica: Resistència a antibiòtics i factors de virulència	10
1.2. <i>Quorum Sensing</i>	13
1.2.1. Generalitats del <i>Quorum Sensing</i>	13
1.2.2. Perspectiva històrica del <i>Quorum Sensing</i>	13
1.2.3. Classificació dels sistemes de QS.....	15
1.2.4. Sistemes de <i>Quorum Sensing</i> basat en AHLs.....	17
1.2.5. Sistema de QS basat en DSF	18
1.2.6. <i>Quorum Sensing</i> en <i>S. maltophilia</i>	19
1.3. Metabolisme i homeòstasi lipídica en <i>S. maltophilia</i>	22
1.3.1. Homeòstasi de la membrana: estructura i composició.....	22
1.3.2. Biosíntesi dels fosfolípids de membrana.....	24
1.3.3. Transport i manteniment dels fosfolípids de membrana: sistema Mla	24
1.3.4. Síntesi i degradació de lípids	26
2. OBJECTIUS	31
3. MATERIALS I MÈTODES	35
3.1. Soques bacterianes, condicions de creixement i reactius.....	35
3.1.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i <i>Xanthomonas campestris</i>	35
3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
3.1.3. <i>Escherichia coli</i>	35
3.1.4. Condicions de creixement	36
3.1.5. Conservació	36
3.1.6. Medis de cultiu	36
3.1.7. Solucions stock	38
3.2. Tècniques generals de Biologia molecular	40
3.2.1. Oligonucleòtids i vectors plasmídics	40
3.2.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
3.2.3. Extracció plasmídica de DNA	41
3.2.4. Clonatge molecular	41

3.3. Generació de mutants i complementació <i>in trans</i>	42
3.3.1. Disseny: el sistema pGPI-Scel/pDAI-Scel-SacB	43
3.3.2. Complementació <i>in trans</i> dels mutants	45
3.3.3. Marcatge de cèl·lules amb GFP i Tomato	45
3.4. Seqüenciació de RNA (RNA-Seq) i anàlisi de dades	46
3.4.1. Seqüenciació de RNA	46
3.4.2. Anàlisi d'enriquiment de les dades	47
3.4.3. Anàlisi per PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR)	47
3.5. Assajos fenotípics	48
3.5.1. Biofilm en plaques de 96 pous	48
3.5.2. Biofilm en plaques tractades i microscòpia confocal (CLSM)	48
3.5.3. Microscòpia electrònica	49
3.5.4. Susceptibilitat a antibiòtics i a altres compostos	50
3.5.5. Infeció en larves de <i>G. mellonella</i>	50
3.5.6. Assaig NPN de permeabilitat de membrana	51
3.5.7. Bioassaig de DSF	51
3.6. Producció de proteïnes	52
3.7. Assajos d'unió Proteïna-DNA	52
3.8. Àcids grassos totals en <i>S. maltophilia</i> per GC-MS	53
3.9. Assajos d'unió de compostos-proteïna (MST i nano-DSF)	53
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	57
4.1. Canvis en l'expressió gènica global a <i>S. maltophilia</i> en condicions relacionades amb QS	57
4.1.1. Canvis en l'expressió gènica dependents de la densitat poblacional	57
4.1.2. Efecte de les molècules de QS DSF i AHLs en el transcriptoma de <i>S. maltophilia</i>	61
4.1.3. Integració entre la resposta a AHLs i DSF	65
4.1.4. Relació del QS amb el regulador Anr	67
4.1.5. Reguloma de SmoR	69
4.1.6. Homeòstasi del ferro en el mutant de SmoR	72
4.2. Caracterització del regulador de tipus TetR Smlt2053 en resposta a senyals relacionades amb el QS	73
4.2.1. Identificació del motiu d'unió al DNA	73
4.2.2. Efectes fenotípics associats al regulador Smlt2053	77
4.2.3. Transcriptòmica del regulador Smlt2053	79
4.2.4. Assajos d'unió a promotors	81
4.2.5. Assajos d'unió a àcids grassos	84
4.2.6. Assajos d'unió a senyals de QS	86

4.2.7. Caracterització dels gens candidats <i>smlt2944</i> i <i>smlt0264-smlt0268</i> i en la resposta a senyals de QS i a Smlt2053	88
4.3. Caracterització del sistema de transport de fosfolípids Mla a <i>S. maltophilia</i> i el seu paper en resistència i virulència	91
4.3.1 Identificació del sistema Mla a <i>S. maltophilia</i>	91
4.3.2. Implicació del sistema Mla en fenòmens de resistència associats a una membrana alterada	93
4.3.3. Alteració de la formació de biofilm en el mutant Mla	97
4.3.4. Alteració de la membrana externa i augment de la permeabilitat en mutants pel sistema Mla.....	102
4.3.5. Contingut total d'àcids grassos en el mutant Mla.....	105
4.3.6. Rol de la proteïna d'unió a substrat MlaC en el transport de fosfolípids	107
5. DISCUSSIÓ GENERAL.....	113
6. CONCLUSIONS	125
7. REFERÈNCIES	129
8. ANNEX	151

RESUM

Stenotrophomonas maltophilia és un patògen oportunista que està adquirint importància donat l'augment en la prevalença d'infeccions nosocomials. Tot i ser un microorganisme ambiental amb una virulència limitada, *S. maltophilia* presenta una resistència intrínseca a múltiples antibiòtics podent causar infeccions persistents, especialment en pacients immunocompromesos i pacients amb fibrosi quística. En els darrers anys s'ha profunditzat en l'estudi dels mecanismes de virulència implicats en les infeccions per *S. maltophilia* i en els seus mecanismes de regulació. Se sap que el *Quorum Sensing* (QS) és l'eina principal de comunicació intercel·lular emprada per a microorganismes patògens per a regular funcions implicades en la seva virulència.

S. maltophilia presenta un sistema de QS mediat per la molècula autoinductora (AI) de naturalesa lipídica DSF (*Diffusible Signal Factor*) i aquest està implicat en l'expressió de factors de virulència. Més enllà d'aquest QS mediat per DSF, també té un regulador que detecta molècules AI de la família AHL (N-acil-L-homoserina lactona) anomenat SmoR. Aquest treball s'ha centrat en primer lloc en caracteritzar la resposta a nivell d'expressió gènica global als dos tipus de senyals AIs per a trobar mecanismes implicats en patogènesi i virulència. També s'ha investigat el grup de gens que poden estar regulats per SmoR per tal de determinar les funcions biològiques d'aquest regulador.

Aquesta primera part ha permès determinar la resposta a nivell transcriptòmic a situacions d'elevada densitat cel·lular, com la fase estacionària de creixement i la presència exògena d'AHLs i DSF. Cal destacar la interconnexió observada entre tots dos sistemes, indicant un punt de regulació comuna, i la presència de diferents reguladors transcripcionals.

Un dels gens implicats, amb una gran sobreexpressió en totes les condicions estudiades, ha permès caracteritzar un regulador global del metabolisme d'àcids grassos (FA, *fatty acids*) en *S. maltophilia*, la proteïna Smlt2053. S'ha identificat com a un ortòleg del regulador PsrA en *Pseudomonas aeruginosa*, que està implicat en la regulació global de la fisiologia bacteriana. En *S. maltophilia*, però, tot sembla indicar que la seva principal funció és la regulació de la β -oxidació de FAs. La fita més important ha estat identificar aquest regulador com a un receptor citoplasmàtic de DSF, la senyal principal de QS en *Xanthomonadaceae* i produïda endògenament per *S. maltophilia*. A més, també és capaç de sensar l'àcid gras més abundant en aquesta espècie, l'àcid iso-pentadecanoic (iso-C_{15:0}). Amb tot, aquest regulador presenta un vincle entre el QS i el metabolisme energètic, suggerint que *S. maltophilia* utilitza els senyals de QS com a font de carboni en els ambients complexes on sol habitar.

RESUM

Finalment, s'ha caracteritzat el sistema Mla (*maintenance of lipid asymmetry*) en *S. maltophilia*. Aquest sistema participa en el transport de fosfolípids deslocalitzats de la membrana externa, on sembla que poden ser reciclats pel metabolisme lipídic. A *S. maltophilia* aquest sistema s'ha vist implicat en fenotips de morfologia cel·lular, resistència a antibiòtics, formació de biofilm i permeabilitat de la membrana. La caracterització de la proteïna periplasmàtica d'unió a substrat MlaC d'aquest sistema ha permès verificar la seva afinitat, com a mínim, per fosfolípids de 14 carbonis, incloent l'àcid gras iso-C_{15:0}.

Amb tot, es posa de manifest la rellevància dels FAs i altres molècules de naturalesa lipídica com a senyalitzadors cel·lulars, implicat en una gran diversitat de fenotips en *S. maltophilia*. La regulació del metabolisme i homeòstasi lipídica en *S. maltophilia* podrien constituir dianes per a una intervenció antimicrobiana o una atenuació de la seva virulència.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic pathogen that is becoming relevant given the increase in the prevalence of nosocomial infections. Despite being an environmental microorganism with limited virulence, *S. maltophilia* presents an intrinsic resistance to multiple antibiotics and can cause persistent infections, especially in immunocompromised patients and patients with cystic fibrosis. In recent years, the study of the virulence mechanisms involved in *S. maltophilia* infections and their regulatory mechanisms have been deeply investigated. Quorum Sensing (QS) is known to be the main intercellular communication system used for pathogenic microorganisms to regulate functions involved in their virulence. *S. maltophilia* presents a QS system mediated by the autoinducer (AI) molecule of lipidic nature DSF (Diffusible Signal Factor) which is involved in the expression of virulence factors. Beyond this QS system mediated by DSF, *S. maltophilia* also has a regulator that sense AI molecules from the AHL (N-Acyl-L-homoserine lactone) family, known as SmoR. This work has first focused in the characterization of the global gene expression under the presence of these two AI signals, to find mechanisms involved in pathogenesis and virulence. The group of genes that might be regulated by SmoR have also been investigated to determine the biological role of this regulator.

This first part has allowed to determine the response at transcriptomic level to situations of high cell density, such as the stationary growth phase and the exogenous presence of AHLs and DSF. It is worth highlighting the observed interconnection between both systems, indicating a common regulatory pathway and the presence of different transcriptional regulators.

One of the genes involved, with considerable overexpression in all the conditions studied, has allowed to characterize a global regulator of fatty acid metabolism in *S. maltophilia*, the protein Smlt2053. In *S. maltophilia*, however, results seem to indicate that its main function is the regulation of the fatty acid β -oxidation. The main milestone has been to identify this regulator as a cytoplasmic DSF receptor, the main signal of QS in *Xanthomonadaceae* which is endogenously produced by *S. maltophilia*. In addition, it is also able to sense the most abundant fatty acid in this species, isopentadecanoic acid (iso-C_{15:0}). Altogether, this regulator presents a link between QS and energy metabolism, suggesting that *S. maltophilia* uses QS signals as a carbon source in the complex environments where it usually inhabits.

Finally, the Mla system (maintenance of lipid asymmetry) has been characterized in *S. maltophilia*. This system participates in the transport of delocalized phospholipids from the outer membrane, where it seems that they can be recycled by lipid metabolism. In *S. maltophilia* this system has shown

RESUM

to be involved in diverse phenotypes, such as cell morphology, antibiotic resistance, biofilm formation and membrane permeability. The characterization of the periplasmic substrate-binding protein MlaC of this system has allowed to verify its affinity, at least, for phospholipids of 14 carbons, including iso-C_{15:0}.

Overall, the relevance of fatty acids and other molecules of lipidic nature as cell communication signals is revealed, which are also involved in a great diversity of phenotypes in *S. maltophilia*. The regulation of lipid metabolism and homeostasis in *S. maltophilia* could constitute a target for antimicrobials or virulence attenuation.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AA	Aminoàcid
ACP	Proteïna portadora d'acils (<i>acyl carrier protein</i>)
AHL	N-Acil-L-homoserina lactona
AI	Autoinductor
BDSF	<i>Burkholderia Diffusible Signal Factor</i>
CL	Cardiolipina
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CLSM	Microscopi confocal de rastreig (<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>)
Cm	Cloramfenicol
CMI	Concentració Mínima Inhibitòria
COG	<i>Cluster of Orthologous Groups</i> (Base de dades)
CV	Cristall Violeta
DEG	Gen amb expressió diferencial (<i>Differentially expressed gene</i>)
DO	Densitat òptica
DS	<i>Downstream</i>
DSF	<i>Difussible Signal Factor</i>
EMSA	<i>Electromobility shift assay</i>
ER	Enzim de restricció
FA	Àcid gras (<i>Fatty acid</i>)
Gm	Gentamicina
GO	<i>Gene Ontology</i> (Base de dades)
H₂O_{MQ}	Aigua milli-Q (ultrapure deionized water, Merck®)
IMG	<i>Integrated Microbial Genomes</i> (Base de dades)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (Base de dades)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LCFA	Àcid gras de cadena llarga (<i>Long chain fatty acid</i>)
LOG	Fase exponencial del creixement
LPS	Lipopolisacàrid

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

MCS	Lloc de clonatge múltiple (<i>Multiple cloning site</i>)
MDR	Resistent a múltiples fàrmacs (<i>Multidrug-resistant</i>)
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MIC	Concentració mínima inhibidora (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPN	1-N-fenilnaftilamina
OMP	Proteïna de membrana externa (<i>Outer Membrane Protein</i>)
p-adj	p valor ajustat (<i>p-adjusted</i>)
pb	Parell de bases
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PL	Fosfolípid (<i>phospholipid</i>)
QS	Percepció del quòrum (<i>Quorum sensing</i>)
RNA-seq	Seqüenciació de RNA (<i>RNA sequencing</i>)
SEM	Microscopi electrònic de rastreig (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
STAT	Fase estacionària del creixement
TEM	Microscopi electrònic de transmissió (<i>Transmission Electron Microscope</i>)
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

1. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 *Stenotrophomonas maltophilia*: característiques generals

1.1.1. Taxonomia

Stenotrophomonas maltophilia va ser aïllada per primera vegada a l'any 1943. Inicialment va ser anomenada *Bacterium bookeri*, i posteriorment, a l'any 1963, se la va renombrar com a *Pseudomonas maltophilia* (1). Més endavant, es va reclassificar en el gènere *Xanthomonas* com a *Xanthomonas maltophilia* en base als anàlisis de rRNA i altres anàlisis fenotípics (2). Finalment, després dels estudis d'hibridació de DNA-rRNA i el mapeig dels gens del rRNA 16S, es va crear el gènere bacterià *Stenotrophomonas* per adaptar-se a un grup de soques similars amb un espectre nutricional limitat (3). No obstant, l'alta diversitat (genètica/fenotípic i ecològica) observada en els aïllats de *S. maltophilia* encara genera dubtes sobre l'estat taxonòmic real d'aquestes espècies, donant lloc a la idea cada cop més acceptada de la complexitat de *S. maltophilia* (4–6). A partir de l'alineament de les seqüències de 1275 gens conservats (*core*) de *S. maltophilia* (presentes en el 99% de les soques estudiades) s'han determinat 23 llinatges monofilètics per a l'espècie, dos dels quals contenen només soques ambientals. La resta de llinatges contenen tant soques ambientals com aïllats clínics (7).

1.1.2. Hàbitat i biologia

S. maltophilia és un bacteri ambiental omnipresent que s'ha aïllat de múltiples fonts associades a l'aigua, tant dins com fora d'entorns clínics (8–10). El seu nínxol habitual sol ser la rizosfera, i també s'han recuperat aïllats de terra, rius, animals, entre d'altres fonts (10). D'origen antropogènic (tant clínic com no clínic) s'han obtingut de fonts tan diverses com en ambients hospitalaris i aïllats humans (invasius i colonitzadors) (7).

La seva ubiqüitat en diversos hàbitats reflexa la gran diversitat genètica i metabòlica que presenta aquest microorganisme. *S. maltophilia* és un bacil gramnegatiu no fermentador, aerobi, no esporulat. En comparació a d'altres membres del gènere *Stenotrophomonas* és lleugerament més petit i posseeix un o pocs flagels polars que li confereixen mobilitat. Pel que fa el metabolisme d'aquest microorganisme, és catalasa positiu i oxidasa negatiu; a més és un bacteri aerobi capaç d'utilitzar el

INTRODUCCIÓ

nitrat com a acceptador d'electrons en absència d'oxigen. Produeix reaccions positives per ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactosidasa), lisina de carboxilasa, hidròlisis esculina i gelatinasa quan es cultiva en medis agar sang (11). És un microorganisme que freqüentment s'ha aïllat amb altres espècies provinents de pacients hospitalitzats, sent les més habituals *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* (12, 13).

1.1.3. Rellevància clínica: Resistència a antibiòtics i factors de virulència

Tot i ser un microorganisme ambiental, ja des dels anys 80 s'ha descrit com a un important patogen nosocomial, que afecta particularment els pacients immunodeprimits i pacients amb fibrosi quística causant infeccions oportunistes (10).

S. maltophilia pot causar un ampli rang d'infeccions oportunistes. El seu aïllament més freqüent en pacients hospitalitzats es dona en vies respiratòries, sent per tant les infeccions de tracte respiratori les més habituals a nivell nosocomial (14). Tot i això, aquest microorganisme és capaç d'afectar altres òrgans i teixits, causant otitis, infeccions cutànies, endocarditis i meningitis, entre d'altres (15).

S'han reportat diferents factors de virulència en *S. maltophilia*. Els factors de virulència són molècules o estructures que generalment afecten negativament la fisiologia de l'hoste, per exemple facilitant l'adhesió, colonització i invasió, i que permeten escapar la resposta immune o proveir de nutrients essencials (16). Els factors de virulència es poden classificar en extracel·lulars o associats a la cèl·lula (Figura 1). Entre els més rellevants de la segona categoria es troben la resistència a antibiòtics, la formació de biofilm, el lipopolisacàrid i el *quorum sensing* (QS) (els dos darrers explorats en major detall en les següents seccions).

INTRODUCCIÓ

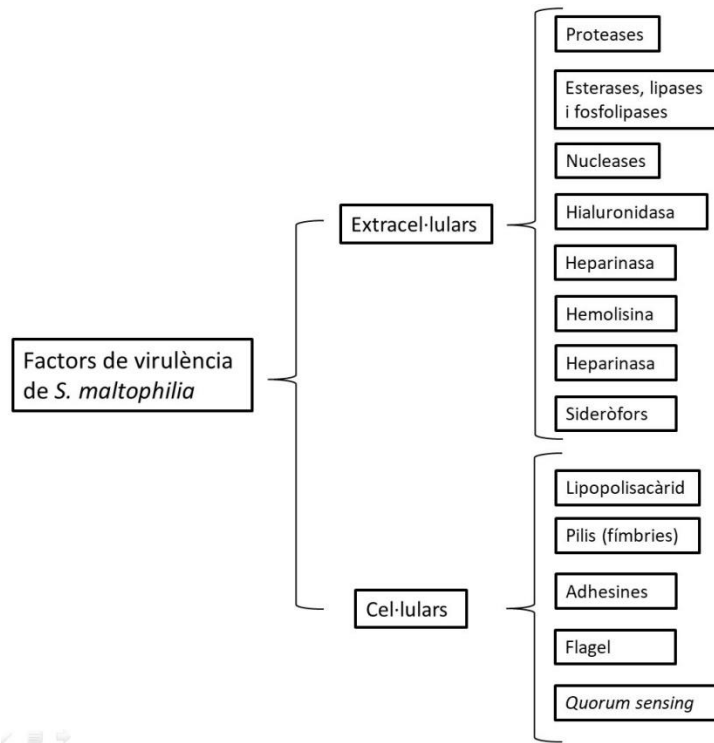


Figura 1. Factors de virulència descrits a *S. maltophilia*. Figura adaptada de Trifonova i Strateva (17).

A nivell clínic, el major repte que presenta *S. maltophilia* és la seva alta resistència intrínseca a la majoria d'antibiòtics d'ampli espectre, com són les famílies dels β -lactàmics, quinolones, aminoglicòsids i tetraciclins. Aquest fenotip *multidrug resistant* (MDR) limita molt el maneig del pacient per un escàs nombre d'alternatives terapèutiques. Aquesta resistència s'origina per la presència de diversos mecanismes com poden ser la sobreproducció de bombes de flux del tipus RND (*resistance-nodulation-division*), una baixa permeabilitat de membrana, enzims capaços de modificar molècules antimicrobianes o gens de resistència a quinolones. A més, *S. maltophilia* és capaç d'adquirir resistències via mutacions o transferència horitzontal (18). Ha estat considerat per la Organització Mundial de la Salut (OMS) com un bacteri multiresistent de preocupació, present en ambients clínics que sovint està subestimat (19, 20). Els antibiòtics disponibles per al tractament són escassos, pel que el tractament d'elecció actualment és la combinació del antibiòtic Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX), tot i que ja s'han descrit aïllats resistents a aquests antibiòtics (21). L'heteroresistència i la resistència adaptativa a alguns antibiòtics com la colistina són també una de les principals preocupacions en pacients infectats per aquests bacteris (22). Altres opcions utilitzades per a fer front infeccions actives de *S. maltophilia* inclouen l'ús de la minociclina, un derivat semisintètic de la tetraciclina que presenta bons nivells de tolerància i bones dades de susceptibilitat (23). Recentment, ha aparegut un nou antibiòtic de la classe cefalosporina, el cefiderocol, que ha mostrat bons resultats *in vitro*, però la seva eficàcia *in vivo* encara està sent discutida (24).

INTRODUCCIÓ

Un mecanisme essencial en la resistència de *S. maltophilia* és la seva capacitat per a formar biofilm. La formació de biofilm és un factor de virulència clau per *S. maltophilia*. Això es deu en part al increment de la resistència a antimicrobians que aquesta estructura confereix (10). Els biofilms consisteixen en comunitats bacterianes adherides a una superfície i envoltades d'una matriu composta principalment de polisacàrids i proteïnes (25). La formació de biofilm permet a la progressió d'una infecció pulmonar en pacients de fibrosi quística i altres malalties respiratòries cròniques (26). En *S. maltophilia*, la formació de biofilm s'ha estudiat en diferents superfícies abiòtiques, tals com tefló, vidre i poliestirè, entre d'altres, i biòtiques, tals com cultius cel·lulars o tissulars (10). Tot i que la producció de biofilm varia entre aïllats, totes les soques estudiades presenten aquesta capacitat, suggerint que és resultat d'una adaptació a ambients estressants, com és el teixit pulmonar (27). Entre els determinants gènics més rellevants en *S. maltophilia* implicats en la formació de biofilm s'han identificat els flagels, importants en les etapes inicials (28), les fimbries o pilis (29), o gens individuals com *spgM*, *rmlA*, *rpfF* (27), *bsmR* (30) i *ax21* (31). Més enllà de l'aïllament del medi exterior que aquesta estructura confereix als microorganismes, la formació de biofilm té grans implicacions en les infeccions nosocomials ja que aquestes sovint s'inicien per la formació de biofilm en dispositius intravasculars. A més, donada l'àmplia ubiqüitat d'aquest microorganisme a l'ambient, existeix una colonització freqüent per *S. maltophilia* a fluids emprats a nivell hospitalari i d'altres com solucions d'irrigació (29). És per tant el seu fenotip mutiresistent junt amb la seva capacitat per formar biofilm el que converteix les infeccions per *S. maltophilia* en un repte terapèutic (32).

Altres factors de virulència descrits en *S. maltophilia* es classifiquen com a factors extracel·lulars. Per exemple, la producció i secreció de proteases capaces de degradar teixiu connectiu i proteïnes humanes, com el cas de les proteases *StmPr1* (33), *StmPr2* (34), *StmPr3* i *StmPr4* (35). També s'han identificat esterases, lipases i fosfolipases, entre d'altres (17).

Finalment, els sideròfors han guanyat atenció donat l'extensa recerca en els darrers anys. Els sideròfors són compostos quelants amb alta afinitat pel ferro que permeten mantenir la supervivència en ambients pobres en ferro, com en les comunitats complexes on habita *S. maltophilia* (36).

Com s'ha descrit en aquesta anteriorment, les infeccions causades per *S. maltophilia* i la seva patogènesi són característiques multifactorials, determinades per nombrosos factors de virulència. Donat que molts d'aquests mecanismes estan regulats pel QS, la recerca en aquest camp s'ha accelerat durant els darrers anys, sent un dels objectius principals d'aquest treball.

1.2. *Quorum Sensing*

1.2.1. Generalitats del *Quorum Sensing*

El terme *quorum sensing* va ser emprat per primera vegada a l'any 1994 (37). El QS és el principal mecanisme de comunicació intercel·lular bacteriana. Aquest sistema de comunicació es basa en l'excreció de senyals extracel·lulars i recepció dels mateixos per a la regulació de l'expressió gènica. Aquests senyals són anomenats autoinductors (AIs) ja que tenen la capacitat d'alterar la mateixa cèl·lula que els ha secretat (38). Un punt crític en la resposta a AIs és la seva concentració en el medi. Com més elevada sigui la població bacteriana, més alta serà la concentració d'AIs secretada. És només a partir d'una concentració determinada d'AIs quan s'inicia el QS i es dona una estimulació de l'expressió gènica de la població general (39, 40). El QS està implicat, entre d'altres, en l'expressió de gens implicats en la resistència a antibiòtics, producció de toxines, síntesi d'exopolisacàrids, transferència de plasmidis, agregació i formació de biofilm, virulència i motilitat, incloent el *twitching*, el *swimming* i el *swarming* (41–44).

L'adaptació del QS al nínxol ecològic de cada espècie és fonamental. És per això que tot i que el QS és un mecanisme compartit entre diferents espècies, hi ha diversos mecanismes d'acció d'aquest sistema de comunicació exclusius de cada espècie (45). Donat l'increment cada cop més estès de resistències a antimicrobians, roman fonamental estudiar altres possibles vies essencials en la virulència de bacteris com a possibles futures dianes terapèutiques. És per això que la caracterització dels mecanismes implicats en el QS està sent tant estudiat, per a, en un futur, estudiar possibles dianes terapèutiques alternatives als antibiòtics convencionals (46).

1.2.2. Perspectiva històrica del *Quorum Sensing*

Abans de que Fuqua i col·laboradors introduïssin el terme "*quorum sensing*" a l'any 1994, altres investigadors ja havien descrit el fenomen, tot i que era anomenat autoinducció. El primer fenomen de QS es va descriure en l'espècie *Photobacterium fischeri* (més tard renombrada *Aliivibrio fischeri* o *Vibrio fischeri*) l'any 1970 (47). En aquest treball es va proposar per primer cop que la luminiscència observada en *V. fischeri* es donava per un procés d'autoinducció a través de senyals extracel·lulars i que responia a canvis a nivell transcripcional. Aquest sistema va acabar caracteritzant-se a principis dels 80, i es va observar que estava basat en únicament dues proteïnes: una sintasa que produïa la molècula AI, anomenada LuxI, i un receptor citoplasmàtic anomenat LuxR. La molècula AI en *V.*

INTRODUCCIÓ

fischeri es va identificar com a una N-acil-homoserina lactona (AHL) (48–50). Aquestes troballes van portar a definir el model bàsic del QS en *V. fischeri*, el qual és ara el paradigma per altres sistemes de QS similars (Figura 2)

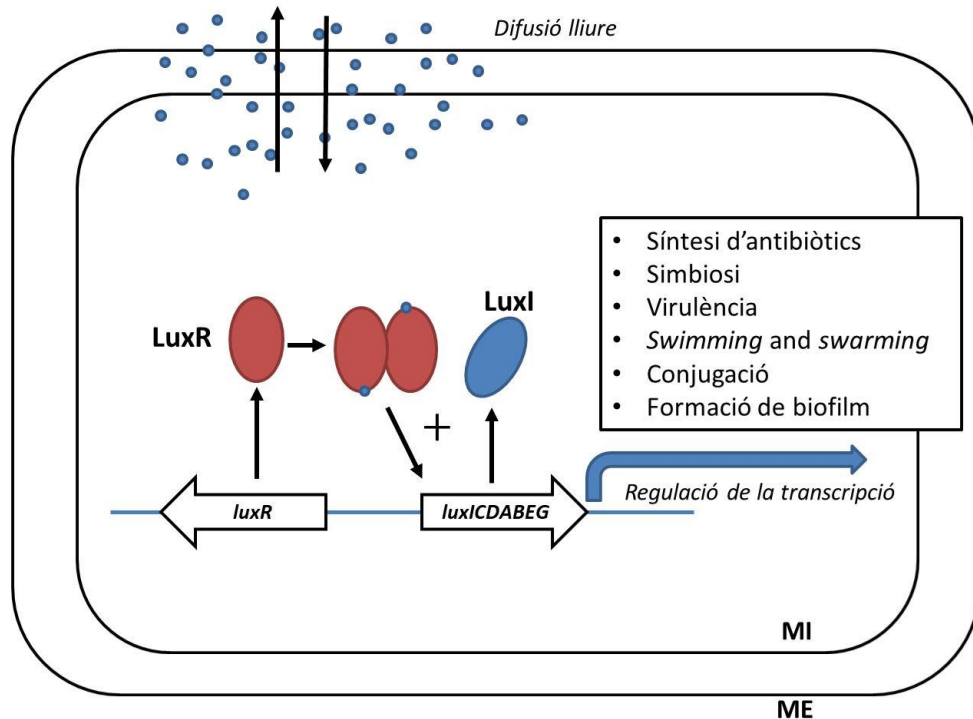


Figura 2. Sistema de QS en *V. fischeri*, paradigma dels sistemes de QS. Adaptat dels treballs de Galloway i Williams (51, 52). La sintasa LuxI produeix els senyals de tipus AHL que són reconeguts pel receptor citoplasmàtic LuxR. El complex activador LuxR-AHL regula l'expressió gènica de diversos processos cel·lulars. MI: membrana interna, ME: membrana externa.

En el sistema de *V. fischeri*, LuxI és la sintasa del senyal de tipus AHL N-3-(oxo-hexanoil)-homoserina lactona (3OC6-HSL) (50, 53). Les sintases de tipus LuxI utilitzen com a substrats la S-adenosilmetionina (SAM, major donador cel·lular de grups metil) i una cadena acil-ACP (provinent del metabolisme de lípids) per a generar la senyal AI de tipus AHL. Un cop formades, difonen lliurement a l'exterior cel·lular, augmentant la seva concentració a mesura que augmenta la població (54). LuxR actua com a receptor del senyal AHL generat i com a regulador transcripcional de la síntesi de diversos gens, en el cas de *V. fischeri* de l'activació de l'operó de la luciferasa *luxICDABE* (49, 50). L'expressió de LuxI també està regulada pel complex LuxR-AHL, pel que quan comença la síntesi d'AI s'activa una retroalimentació positiva que permet la sincronització de la població bacteriana passant d'un estat de baixa densitat cel·lular a un d'alta densitat regulat pel QS (55).

S'han identificat homòlegs d'aquest sistema en un gran nombre d'espècies bacterianes i tots aquests controlen l'expressió gènica global depenent de la concentració cel·lular (56). Els sistemes de QS no són exclusius dels gramnegatius, ja que també se n'han descrit en grampositius. En grampositius, la

INTRODUCCIÓ

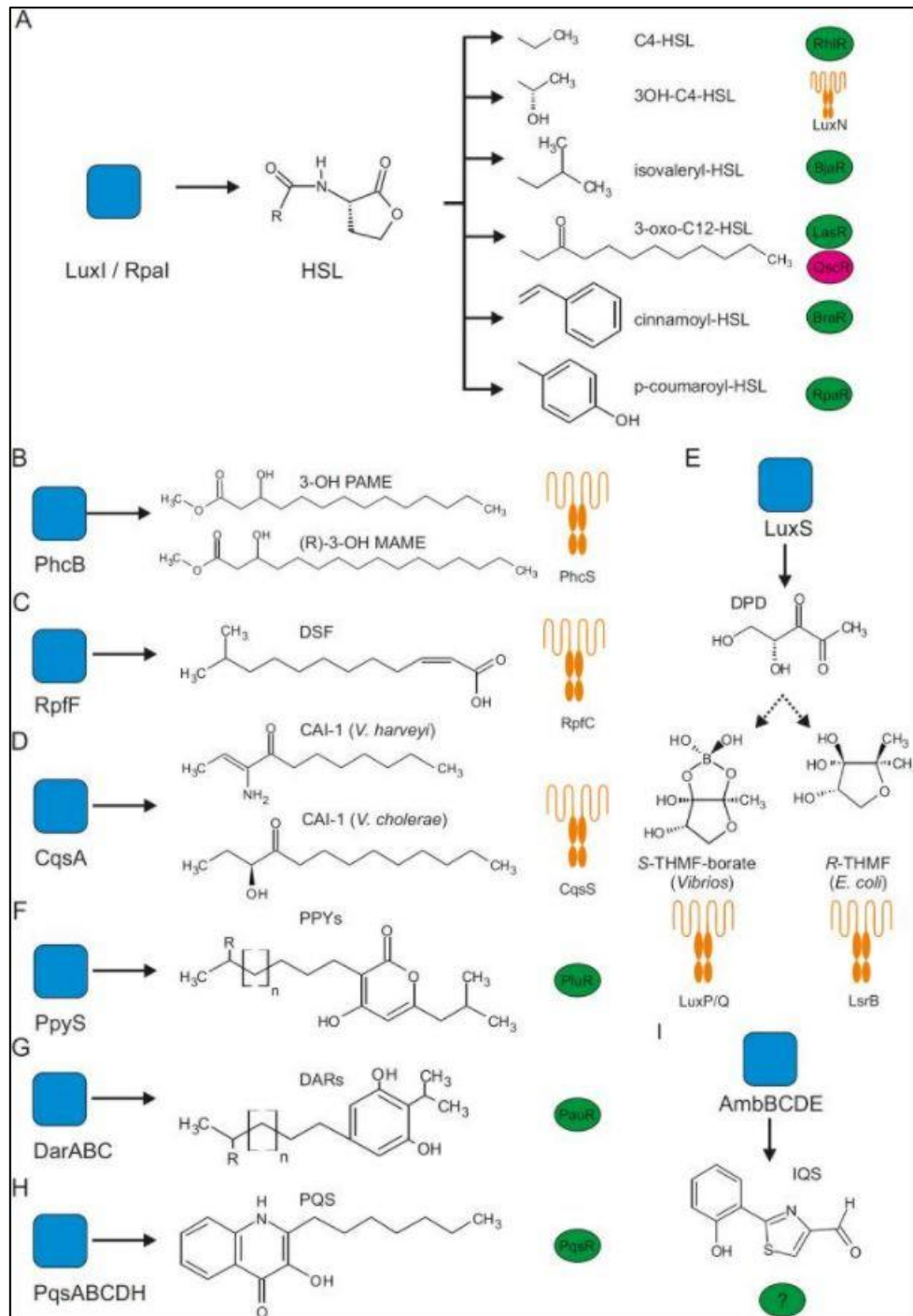


Figura 4. Sistemes de QS en bacteris gramnegatiu. Extret de la revisió de Pappenfort i Bassler (2016) (63). (A) AHLs produïdes per diferents espècies. (B) àcid metil-èster-3-hidroxipalmític (3-OH PAME) i (R)-metil-3-hidroximiristat ((R)-3-OH MAME) produïts per *Ralstonia* spp. (C) Factor difusible de senyal (DSF, *Diffusible signal factor*) produït per la família *Xanthomonadaceae* i *Burkholderiaceae*. (D) Sistema CqsA/CqsS amb la molècula CAI-1 d'algunes espècies de *Vibrio*. (E) 4,5-dihidroxi-2,3-pentadiona (DPD), AI de tipus 2 (AI-2) sintetitzats per enzims de tipus LuxS. En *Vibrio* spp. L'AI-2 utilitza un radical borat per a formar la molècula S-TMHF-borat. En bacteris entèrics i sense borat, es forma el R-TMHF. Els receptors LuxPQ i LsrB indiquen el reconeixement periplasmàtic. (F) Fotopirones sintetitzades per PpyS de *Photobacterium luminescens* detectades per PluR. (G) Molècules de dialquilresorcinols (DARs) utilitzades per *Photobacterium asymbiotica*. (H) Sistema 2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona (PQS) de *P. aeruginosa*. (I) Senyal 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehid (IQS) produïda per *P. aeruginosa* amb receptor desconegut.

1.2.4. Sistemes de *Quorum Sensing* basat en AHLs

En bacteris gramnegatius, les AHLs són els tipus de molècules AIs més comunes. Es componen d'un anell de tipus homoserina-lactona N-acilat, i una cadena acil de 4 a 18 carbonis que pot contenir diferents graus d'oxidació en la posició 3-C (52). La síntesi d'AHLs s'ha mantingut durant l'evolució suggerint beneficis directes en el *fitness* individual de cada espècie (64). Sovint el parell LuxI/LuxR es troben localitzats en el genoma en posició adjacent, tant en forma convergent com divergent, tot i que també existeixen parelles LuxI/LuxR en posicions distants del genoma (65).

S'han descrit diferents tipus de sintases d' AHL, sent la família de tipus LuxI la més extensa. S'han identificat homòlegs de LuxI que produeixen AHLs amb cadenes laterals que contenen residus d'aminoàcids aromàtics i també ramificats, essencialment en α -Proteobacteris. Alguns exemples són p-coumaroil-HSL de *Rhodopseudomonas palustris*, sintetitzada per Rpal (66), cinamoil-HSL produïda per *Bradyrhizobium* mitjançant la sintasa CinI (67) i isovaleril-HSL produïda per *Bradyrhizobium japonicum* mitjançant Bjal (68).

Un dels sistemes més estudiats de QS basat en AHLs és la xarxa de *P. aeruginosa*. Aquest gramnegatiu té dos sistemes d'AHLs complets, el sistema LasI/LasR i el sistema RhII/RhIR. Les AHLs sintetitzades per aquests sistemes són la 3OC12-HSL i la C4-HSL, respectivament (69, 70). Els reguladors dels sistemes formen complexos d'activació transcripcional. Aproximadament 300 gens són regulats pel QS en resposta a AHLs en *P. aeruginosa* (71), la majoria dels quals són factors de secreció, reguladors i enzims de vies metabòliques i factors de virulència, indicant el fort impacte que té el QS en la fisiologia bacteriana (72). Addicionalment hi ha un altre sistema basat en el senyal PQS, que augmenta la complexitat, ja que està interconnectat amb la resta de sistemes (73). De la mateixa manera, el sistema basat en IQS també és present en aquest gènere (74). A més de la regulació creuada de tots els sistemes de QS, també hi ha reguladors globals en *P. aeruginosa* relacionats amb la modulació del QS i la resposta a diversos factors ambientals, com Vfr, RelA, RpoS i el sistema GacAS/RsmAZ, entre d'altres (75, 76).

Els diferents sistemes, a trets generals, regulen característiques tan rellevants com la citotoxicitat, motilitat, disponibilitat de ferro, resposta a l'estrès, evasió immune, formació de biofilm, resistència a antibiòtics, entre d'altres (76). Tot i ser *P. aeruginosa* el paradigma del QS basat en AHLs, aquesta complexitat de vies interconnectades s'observa en molts altres organismes, posant de manifest la importància del QS en la regulació de l'expressió gènica global.

INTRODUCCIÓ

1.2.5. Sistema de QS basat en DSF

La família del DSF (*Diffusible Signal Factor*) representa un important tipus de QS en gramnegatius que es troba en diversos patògens bacterians (77) (Figura 5A). Aquesta petita molècula de naturalesa lipídica (àcid cis-11-metil-2-dodecenoic) es va descriure per primer cop en el fitopatogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), tot i que en els darrers anys s'ha descrit que la família de senyals DSF és més diversa (78, 79) (Figura 5B). Els senyals de tipus DSF regulen múltiples processos cel·lulars, tals com la producció de factors de virulència, resistència a antibiòtics, formació de biofilm, entre d'altres (77).

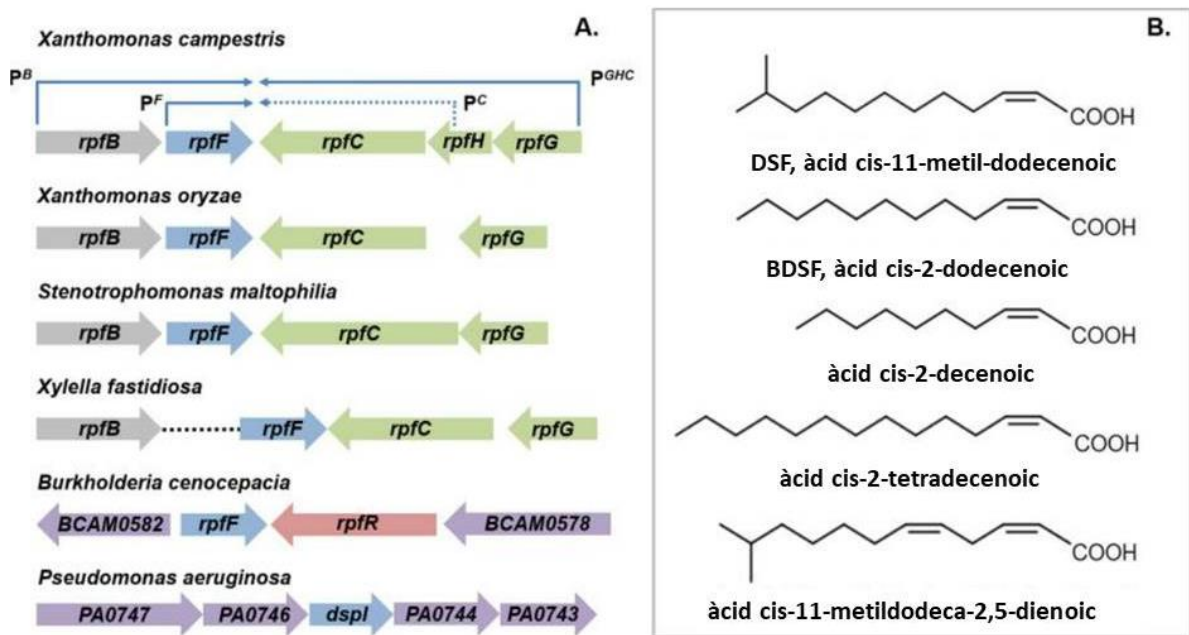


Figura 5. Família de senyals de tipus DSF i organització genòmica. Figura extreta i adaptada de Ryan i col·laboradors (77). (A) RpfF és l'enzim encarregat de la síntesi de DSF o derivats en totes les espècies. En el gènere *Burkholderia* el receptor és RpfR, mentre que per la família *Xanthomonadaceae* la detecció i regulació es dona pel sistema de dos components RpfCG, organitzats en un operó que es transcriu convergentment a *rpfF*. La proteïna RpfH, present en *X. campestris* no té una funció caracteritzada. RpfB, en el mateix operó que *rpfF*, és una lligasa de FAs i en *X. fastidiosa* es localitza fora del clúster *rpf*. En *P. aeruginosa* el gen *dspl* codifica per un homòleg de RpfF i es localitza en un clúster d'enzims implicats en el metabolisme de FAs. Es desconeix el receptor de la senyal. (B)

Els senyals de tipus DSF són diversos, tot i que tots comparteixen una característica química important: un enllaç doble *cis*-2 en un àcid gras insaturat, el qual és indispensable per a l'activitat senyalitzadora (80). El QS basat en DSF s'ha classificat en tres categories diferents d'acord al context genòmic dels seus representants. La primera categoria està representada per aquelles espècies on els gens que codifiquen els components claus es troben colocalitzats en el clúster *rpf* (*regulation of*

INTRODUCCIÓ

pathogenicity factors). Tots els representants d'aquesta categoria de DSF formen part de la família *Xanthomonadaceae*, amb exemples ben caracteritzats a *Xanthomonas sp.*, *Xylella fastidiosa*, *Lysobacter enzymogenes* i *S. maltophilia* (77, 81, 82). Aquesta categoria inclou la molècula canònica de DSF descrita en *Xcc*.

La segona categoria està representada per patògens oportunistes com *Burkholderia cenocepacia* i *Cronobacter turicensis*, els quals no tenen el clúster *rpf* típic de les *Xanthomonadaceae*. En canvi, tenen una sintasa del senyal i el seu receptor contigus en el genoma que són transcrits convergentment, produint un senyal anomenat BDSF (àcid cis-2-dodecenoic) (83).

Finalment, la tercera categoria va aparèixer arran de la identificació de l'àcid cis-2-decenoic en el patogen oportunista *P. aeruginosa*, el qual està sintetitzat per la hidratasa d'enoil-CoA Dspl, tot i que és el sistema menys caracteritzat dels tres (84, 85).

1.2.6. Quorum Sensing en *S. maltophilia*

El mecanisme de QS més estudiat en *S. maltophilia* és el mediat per DSF. El clúster responsable de l'activació del QS mediat per DSF en *S. maltophilia*, així com dins de l'ordre Xanthomonadales, és el clúster *rpf* (86). Dins d'aquest clúster hi ha codificats gens claus de la síntesi i percepció de DSF així com de la transducció del senyal. A nivell d'organització aquests gens es troben distribuïts en dos operons adjacents que es transcriuen convergentment. El primer operó conté els gens que codifiquen per la lligassa de FAs RpfB i la sintasa RpfF. El segon operó codifica per un sistema de dos components que inclouen el sensor quinasa RpfC i el regulador citoplasmàtic RpfG (87). Una de les proteïnes que no es troben codificades en aquest clúster, a diferència del que veiem en *Xanthomonas sp.*, és la proteïna transmembrana RpfH (87).

Una característica diferencial del sistema DSF en *S. maltophilia* és la presència de dues variants del clúster *rpf* (87). Inicialment, arrel de dos estudis publicats a l'any 2011 i posteriorment al 2014, es pensava que un grup significatiu de soques de *S. maltophilia* no tenien el gen *rpfF* (27, 88). Més endavant, un estudi poblacional del sistema de QS mediat per DSF va revelar que, a diferència d'altres Xanthomonadales, *S. maltophilia* presenta dues variants de *rpfF* (anomenades *rpfF-1* i *rpfF-2*) (87). Més recentment, l'existència d'aquests dos al·lels de *rpfF* en aïllats clínics i ambientals de *S. maltophilia* ha estat validada per una anàlisi de genòmica poblacional (89). Les dues variants de *rpfF* difereixen, en particular, en la seqüència que codifica els darrers 108 residus de la regió N-terminal

INTRODUCCIÓ

(87). La prevalença de totes dues variants és d'aproximadament un 55% per la variant *rpfF-1* i d'un 45% de la variant *rpfF-2* (81).

Més enllà d'aquestes dues variants definides per *rpfF*, s'ha vist que existeixen al·lels variants del gen del sensor *rpfC* anomenades *rpfC-1* i *rpfC-2*. Aquestes variants estant presents amb una associació fixa entre les variants *rpfF* i *rpfC*, és a dir, que aquelles soques que tinguin la variant *rpfF-1* tindran necessàriament la variant *rpfC-1* i viceversa (87). Les diferències a nivell aminoacídic entre aquests dos al·lels de *rpfC* es troben en la seva longitud i estructura secundària. RpfC-1 mostra 10 regions transmembrana a la regió N-terminal que estan altament relacionades amb el complex RpfC-RpFH que constitueix el domini sensor de DSF a *Xcc* (90). Per contra, RpfC-2 manca 5 d'aquests dominis transmembrana com en la RpfC de *Xylella fastidiosa* RpfC (87, 91).

Totes aquestes diferències descrites entre les variants del clúster *rpf* afecten fortament la síntesi, percepció i regulació de DSF dels processos biològics en *S. maltophilia*. Sorprenentment, mentre que les soques *rpf-1* mostren una producció evident de DSF en condicions de creixement estàndard, els aïllats de *rpf-2* requereixen còpies addicionals de *rpfF-2* o l'absència del component sensor / repressor *rpfC-2* per aconseguir nivells detectables de DSF (87). Els aspectes mecànics de la síntesi i percepció de DSF en *S. maltophilia rpf-1* semblen ser similars als reportats per a l'organisme model *Xcc*. Tots dos microorganismes sintetitzen l'àcid cis-11-metil-2-dodecenoic com a senyal principal de DSF (92). RpfF de *Xcc* produeix senyals addicionals de DSF, incloent l'àcid cis-2-dodecenoic, l'àcid cis-11-metildodeca-2,5-dienoic, i l'àcid cis-10-metil-2-dodecenoic (93–95). També s'ha descrit la producció de set derivats de l'àcid cis-11-metil-2-dodecenoic per una soca de *S. maltophilia* (WR-C) (96). Més recentment, però, l'àcid canònic cis-11-metil-2-dodecenoic va ser l'únic àcid gras insaturat trobat en els sobrenadants de cultiu de les soques *S. maltophilia* E77 (RpfF-1) i M30 (RpfF-2) (87, 97).

Tal i com està descrit en *B. cenocepacia* i *Xcc* per a la síntesi BDSF i DSF (95, 98), tant les proteïnes RpfF-1 com RpfF-2 de *S. maltophilia* semblen tenir una doble activitat acil-ACP deshidratasa i tioesterasa que catalitzen la conversió de (R)-3-hidroxi-11-metil-dodecanoil-ACP a DSF en dos passos (86). A més, l'activitat tioesterasa de totes les proteïnes RpfF sembla ser inespecífica, trencant una varietat de substrats acil-ACP de cadena mitjana i llarga i generant així FAs lliures que després s'alliberen a l'entorn extracel·lular (86, 95, 98). En *S. maltophilia* el principal àcid gras produït per la activitat tioesterasa és l'àcid 13-metil-tetradecanoic o àcid iso-pentadecanoic (iso-C_{15:0}), que també és el àcid gras més abundant en els fosfolípids tant de *Xanthomonas sp.* com de *S. maltophilia* (99). Sorprenentment, iso-C_{15:0} en realitat es considera un biomarcador fosfolipídic de FAs pels bacteris grampositius (100) i sembla estar present només en bacteris gramnegatius que mostren comunicació DSF. Curiosament, el DSF i el iso-C_{15:0} es generen a través de la mateixa via biosintètica (101), la qual

INTRODUCCIÓ

cosa suggereix una possible connexió entre la producció de DSF i la síntesi de membranes (86). En aquest sentit, la presència de iso-C_{15:0} en el medi sembla modular la producció de DSF en soques *rpf-1*, potser perquè el sensor intacte RpfC-1 és capaç de detectar aquest àcid gras, alliberant així RpfF-1 deixant-lo actiu capaç de sintetitzar DSF posteriorment (86). També, diversos factors ambientals addicionals modulen la síntesi de DSF en soques *rpf-1*. Per exemple, mentre que els medis rics a 28°C semblen ser les condicions de cultiu òptimes per aconseguir altes quantitats de DSF en el sobrenedant, s'ha vist que en medis amb restricció de ferro s'indueix la producció de DSF a través del sistema Fur en la soca K279a (102). Contràriament a les soques *rpf-1*, la síntesi de DSF en soques *rpf-2* sembla estar reprimida permanentment sota condicions normals. No obstant això, la presència de DSF exogen desencadena la producció de DSF en aquestes variants (86). Aquestes troballes suggereixen que les soques *rpf-2* requereixen un desequilibri estequiomètric (RpfF-2>RpfC-2) per a la producció de DSF i que el component 5-TMR del sensor de RpfC-2 és molt més específic que el de RpfC-1, fent que RpfF-2 estigui lliure i per tant actiu només quan detecta DSF.

La deleció de *rpfF-1* en la soca clínica *S. maltophilia* E77 resulta en la formació alterada de biofilms, reducció de la motilitat bacteriana i reducció de la virulència en els models d'infecció en *Caenorhabditis elegans* i *zebrafish* (87). En la soca clínica K279a (*rpfF-1*), la deleció del gen *rpfF* també desencadena una disminució de la resistència als antibiòtics, secreció de proteases, i un lipopolisacàrid alterat (81). En la soca ambiental WR-C, els senyals derivats de DSF estimulen la motilitat del flagel (96) i la deleció de *rpfF* o *rpfB* disminueix l'expressió del receptor fèrric de citrat FecA (96). Recentment, s'ha demostrat que el DSF produït per la soca 44/33 contribueix a la secreció de vesícules de membrana externa (103).

Contràriament a les observacions en el mutant de *rpfF-1*, la mutació de *rpfF-2* no altera significativament la formació de biofilms, la motilitat bacteriana o la virulència en la soca clínica M30. Aquests resultats estan en línia amb el fet que la variant *rpfF-2* sembla estar permanentment reprimida (87). No obstant això, quan les subpoblacions *rpf-1* i *rpf-2* cohabituen, es potencien tant la producció de DSF com la capacitat de virulència de tota la població (86). Això suggereix que les soques *rpf-2* han evolucionat com a un grup receptor, en termes de comunicació DSF, mostrant un fenotip letàrgic deficient en DSF en condicions de cultiu únic fins que la presència de bacteris productors de DSF (per exemple, *Xcc* o *S. maltophilia rpf-1*) desencadena la comunicació recíproca de DSF. Clarament, es requereix més recerca per a comprendre millor el paper del sistema DSF en la subpoblació *rpf-2 S. maltophilia*, inclosos els avantatges i desavantatges específics d'aquest comportament en particular. S'ha demostrat que *S. maltophilia* interactua, a través de la producció de DSF, amb bacteris, llevats i fins i tot plantes no relacionades. En particular, el senyal DSF produït per la soca K279a de *S. maltophilia* és detectat per *P. aeruginosa* a través del sensor quinasa PA1396,

INTRODUCCIÓ

modulant la formació de biofilm i la resistència als antibiòtics (104), així com la virulència i persistència en pulmons de pacients amb fibrosi quística (105). Així mateix, la síntesi de DSF per la soca K279a afecta al creixement planctònic i biofilm de *C. albicans* i inhibeix la seva transició morfològica (106). Finalment, el DSF produït per la soca ambiental R551-3 provoca un efecte positiu sobre la germinació de les plantes i el creixement de la colza (107).

Respecte al sistema de QS de tipus AHL, s'ha demostrat que *S. maltophilia* no produeix nivells detectables d'AHLs (108, 109), hipòtesi reforçada per la manca d'homòlegs de sintases de tipus LuxI en els genomes disponibles. Tot i així, sí s'ha detectat activitat AHL en algunes *Stenotrophomonas sp.* aïllades dels sediments de sistemes de tractament d'aigües (110, 111) i en fangs (112, 113). A banda del gènere *Stenotrophomonas*, l'activitat AHL també s'ha detectat en d'altres membres de la família *Xanthomonadaceae*, com *Thermomonas* (114), *Lysobacter* (112) i *Xanthomonas sp.* (109). Donada l'elevada diversitat genòmica dins el gènere *Stenotrophomonas*, no es pot descartar la identificació de més aïllats productors d'AHLs o l'existència d'una nova família de sintases de tipus AHL.

S. maltophilia codifica per un regulador de tipus LuxR *solo* anomenat SmoR (115). Els reguladors LuxR *solo* no tenen una sintasa cognada de tipus LuxI i es troben àmpliament en molts genomes bacterians, incloent les espècies de la família *Xanthomonadaceae* (116, 117). El genoma de la soca K279a codifica per a 15 LuxR *solo* putatius, dels quals SmoR és l'únic que presenta el domini N-terminal típic d'unió a AHLs i el domini C-terminal d'unió al DNA (115). Assajos d'unió d'AHLs *in vitro* han confirmat que SmoR uneix el senyal 3-oxo-C8-HSL, regulant la motilitat de tipus *swarming*. La soca parental E77, però no la mutant per SmoR, estimula la motilitat de tipus *swarming* en presència de sobrenedant de *P. aeruginosa*, que conté concentracions elevades d'AHLs, la 3-oxo-C8-HSL inclosa. Aquests resultats indiquen que SmoR detecta les AHLs produïdes per bacteris veïns en les comunitats on habita (115). El paper d'altres reguladors de tipus LuxR *solo* en *S. maltophilia* encara no ha estat investigat.

1.3. Metabolisme i homeòstasi lipídica en *S. maltophilia*

1.3.1. Homeòstasi de la membrana: estructura i composició

L'envolta bacteriana és la barrera cel·lular a l'ambient exterior i permet regular diferents factors externs com la temperatura, canvis en el pH o osmolaritat, i compostos tòxics i antimicrobians. Per tant, la regulació de la síntesi i la homeòstasi de la membrana són crítics per a un manteniment pel *fitness* i la supervivència cel·lular (118).

INTRODUCCIÓ

L'arquitectura de la paret de gramnegatiu es basa en una doble membrana, per una banda conté una membrana interna (MI) composta per fosfolípids (PL) que envolta el citoplasma. A l'exterior de la MI es troba l'espai periplasmàtic, un compartiment entre les dues membranes que conté una fina paret de peptidoglicà. D'altra banda, la membrana externa (ME) és una doble capa asimètrica, amb una part interna formada per glicerofosfolípids i una cara externa amb una composició principal de molècules del lipopolisacàrid (LPS) (119, 120) (Figura 6).

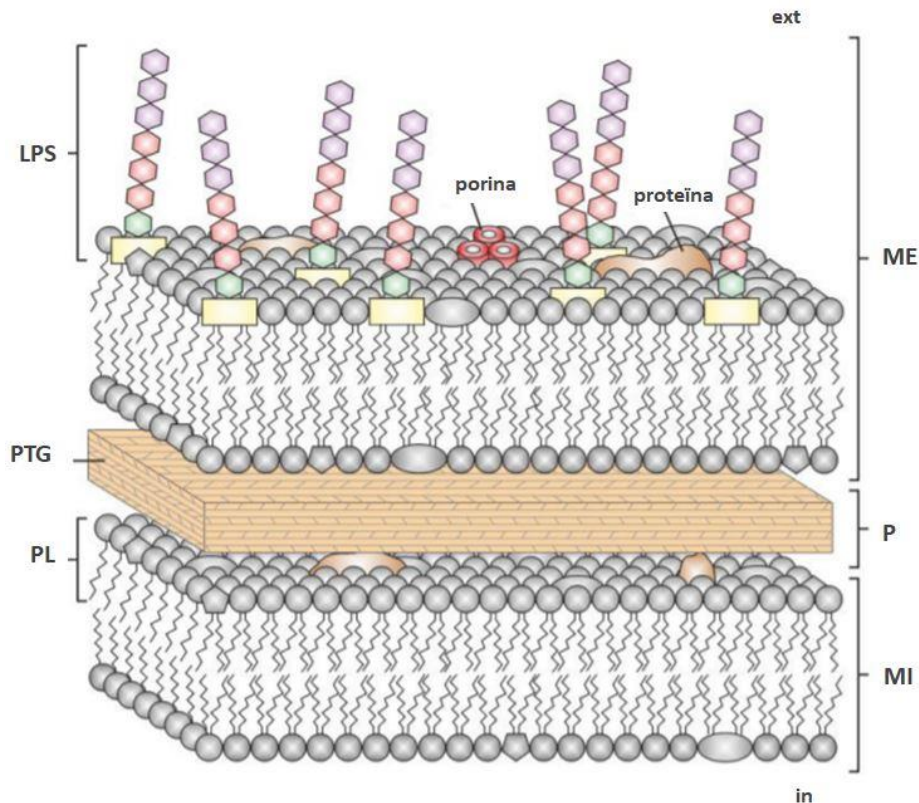


Figura 6. Estructura típica de la paret de gramnegatiu. Figura adaptada de (121). LPS: lipopolisacàrid, PTG: peptidoglicà, PL: fosfolípid, MI: membrana interna, P: periplasma, ME: membrana externa, ext: espai extracel·lular, in: espai intracel·lular.

L'estructura del LPS és diversa entre les diferents espècies bacterianes. Generalment es compon d'una fracció amb el lípid A amb residus fosforilats de glucosamina amb diferents cadenes N-acil o O-acil unides, una fracció amb el nucli oligosacàrid amb diferents sucres que poden estar fosforilats i la fracció més externa representada per l'antigen-O, que en *S. maltophilia* pot estar format per ramnosa, fucosa, xilosa i glucosa (122, 123). Per a mantenir la integritat estructural, les molècules de LPS amb les cadenes de fosfats carregades negativament capten cations divalents (com Ca^{2+} , Mg^{2+}) per a mantenir les fortes interaccions laterals. Donat que l'estudi del LPS no és objectiu d'aquest treball, s'adreça a consultar la revisió (124) per a més informació. En *S. maltophilia* hi ha dos operons

INTRODUCCIÓ

importants per a la producció de LPS, *rmlBACD* i *xanAB*, l'alteració dels quals afecta la formació de biofilm (125).

La composició de fosfolípids de la membrana varia entre espècies, però els majoritaris són la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilglicerol (PG) i la cardiolipina (CL). Algunes espècies poden produir altres lípids com esfingolípids, lípids de tipus esterol i derivats metilats de la PE, com la fosfatidilcolina (PC) (126). En *X. campestris* el PL majoritari és la PE, amb un 50% de la composició total de PLs de membrana, seguida de la CL i el PG. A més, en condicions determinades, també produeix monometil PE (MMPE) (127).

1.3.2. Biosíntesi dels fosfolípids de membrana

Les vies metabòliques i enzims responsables de la síntesi dels PLs majoritaris es troben molt conservats en els bacteris i s'han estudiat àmpliament en *E. coli*. En tots els organismes la síntesi de PLs comença amb una acilació en dos passos del *sn*-glicerol-3-fosfat (G3P), produint primer àcid lisofosfatídic (LPA) i després àcid fosfatídic (PA). El G3P es pot obtenir de diferents fonts: (i) fosforilació del glicerol per la glicerol quinasa (ii) captació de l'ambient per mitjà del transportador GlpT (iii) producte de la glicòlisi mitjançant la reducció de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) per GpsA i (iv) producte de la degradació de fosfolípids de membrana per mitjà del sistema UgpQ/GlpQ (128).

Les reaccions de conversió del G3P a PA estan mediades per enzims amb activitat aciltransferasa utilitzant tant acil-CoA com acil-ACP com a donador de la cadena acil. *E. coli* utilitza dos sistemes diferents d'aciltransferases per a aquests passos: el sistema PlsB/PlsC i el majoritari PlsX/PlsY/PlsC (128, 129). Les espècies de l'ordre Xanthomonadales són úniques ja que el sistema d'aciltransferases que utilitzen per a la síntesi del PA és exclusivament PlsB/PlsC. Aquest utilitza tant l'acil-ACP derivat de la via de síntesi d'àcids grassos FASII i l'acil-CoA derivat de FAs exògens per mitjà de FadD (130, 131). El PA és finalment convertit en citidin difosfat-diacilglicerol (CDP-DAG), que és el precursor central de tots els fosfolípids. Aquesta reacció està mediada per una CDP-DAG sintasa, que en el cas de *E. coli* és CdsA.

1.3.3. Transport i manteniment dels fosfolípids de membrana: sistema Mla

El LPS es transporta per mitjà del sistema Lpt, revisat en (132). Breument, la síntesi de l'antigen O i de l'oligosacàrid té lloc a la MI i el transport a la ME és irreversible. El complex LptB₂FGC, un

INTRODUCCIÓ

transportador de tipus ABC, s'encarrega del transport de la cara interna de la MI al periplasma, on es forma un pont. Primer, un dímer de LptB₂ hidrolitza l'ATP i permet que el transportador LptFG dirigeixi la molècula de LPS al periplasma, on es troben formant un pont amb LptC. Finalment, el translocó LptDE acaba transportant el LPS a la cara externa de la ME, on s'acaba estabilitzant per mitjà de les càrregues laterals amb altres molècules de LPS.

Els fosfolípids acabats de sintetitzar a la MI s'han de transportar a la ME per mitjà d'un transport anterògrad. Els mecanismes implicats en la formació de la ME encara no es comprenen totalment.

Per a mantenir l'estructura asimètrica LPS/PLs de la ME també és necessari un transport retrògrad per eliminar els PLs deslocalitzats a la cara externa (133). El manteniment d'aquesta asimetria és crític per a la integritat cel·lular, donat que defectes en el transport de LPS i PLs incrementen la sensibilitat de les cèl·lules a antibiòtics i detergents, entre d'altres. Per tant, tenir acumulació de PLs en detriment de LPS a la cara externa de la ME origina zones altament permeables denominades *phospholipid patches* (134).

Hi ha diferents mecanismes descrits per eliminar els PLs de la cara externa de la ME en gramnegatius. El primer està mediat per la proteïna de membrana externa (OMP) PagP, que s'encarrega de transferir una cadena de palmitoil de un PL a un lípid A hexa-acilat, detectant-se un augment de LPS hepta-acilat (135). Un segon mecanisme implica l'activitat de la fosfolipasa PldA, que és capaç d'extreure cadenes acils dels PLs. S'ha proposat que els FAs resultants es reciclen en el citoplasma i s'utilitzen com a senyals per a augmentar la síntesi i transport del LPS, actuant com a un sensor de l'asimetria de la ME (136, 137). Tot i així, aquests dos sistemes permeten eliminar PLs mal localitzats, però no el transport entre les membranes. No va ser fins al 2009 que es va identificar un mecanisme de transport actiu de PLs de la ME a la MI. Malinverni i Silhavy van descriure a *E. coli* el sistema principal de manteniment de l'asimetria de la ME: el sistema Mla (*Maintenance of Lipid Asymmetry*) (138).

Aquest sistema està format per sis proteïnes (MlaABCDEF) i una OMP caracteritzada com a OmpC, ben descrites i estudiades en *E. coli*. Els PLs que s'acumulen a la cara externa de la ME són els substrats per al transportador Mla. La lipoproteïna MlaA (també anomenada VacJ a *Shigella flexneri* i *Pseudomonas sp.*) s'associa amb OmpC per a transferir els PLs mal localitzats a la proteïna periplasmàtica d'unió a substrat MlaC, per mitjà d'una interacció transitòria (139, 140). MlaC té una alta afinitat pels PLs, com s'ha observat en proteïnes MlaC cristal·litzades amb PLs en la seva butxaca hidrofòbica (141–143). A continuació, MlaC transporta els PLs a través del periplasma fins al complex MlaFEDB de la membrana interna, que actua com a un transportador de tipus ABC (143, 144). Els components del sistema Mla estan conservats en tots els gramnegatius, excepte la proteïna MlaC

INTRODUCCIÓ

que ha divergit en cada espècie, teòricament per a transportar PLs específics de cada família bacteriana. Recentment, s'ha descobert en *Pseudomonas sp.* que aquest sistema ha evolucionat per a transportar PLs de diferents classes, incloent la CL (142).

1.3.4. Síntesi i degradació de lípids

El metabolisme lipídic bacterià inclou globalment la identificació de les vies metabòliques, els mecanismes enzimàtics i la regulació transcripcional de tots els components que hi participen.

D'acord amb la definició de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) un FA és un àcid carboxílic amb cues alifàtiques (cadena) de diferents longituds, variant de 4 a 28 carbonis. De forma general els FAs es troben formant part de fosfolípids o triglicèrids, però es poden trobar en forma de FA lliure si no estan associats a altres molècules.

La síntesi de FAs (FAS, *Fatty acid synthesis*) constitueix la via central de tot el metabolisme lipídic, ja que els FAs són components essencials de les membranes, són una important font pel metabolisme energètic en tots els organismes i tenen rellevància en vies de senyalització (Figura 7). Per tant, les vies de síntesi i degradació han d'estar fortament regulades d'acord amb la disponibilitat de FAs per a mantenir la homeòstasi lipídica cel·lular (145).

La regulació global d'aquestes vies està àmpliament caracteritzada per l'organisme model *E.coli*, un bacteri entèric de la classe γ -proteobacteria (146). El regulador transcripcional global FadR està implicat en les vies de degradació de FAs en *E. coli*, i tot i que les vies de β -oxidació es troben conservades en *Xanthomonas*, aquest gènere no codifica per un homòleg de FadR (147).

La via de degradació de FAs en *E. coli* està catalitzada per enzims codificats pel reguló *fad* (*fatty acid degradation*), responsable del transport i activació de FAs de cadena llarga (LCFAs, *Long chain fatty acids*), incloent la β -oxidació on es produeix la fragmentació d'aquests LCFAs en acetil-CoA (148). FadR actua com un repressor general dels gens implicats en la degradació de FAs i com a activador de gens que participen en processos de biosíntesi (149). FadL és responsable de la captació i transport dels FAs, mentre que FadD s'encarrega del mecanisme d'activació a la membrana interna, tenint activitat lligasa d'àcid gras-CoA. El primer pas de la β -oxidació implica la conversió d'acil-CoA en enoil-CoA mitjançant l'activitat de la acil-CoA deshidrogenasa FadE. Pels FAs insaturats, en canvi, la 2,4-dienoil-CoA reductasa FadH transforma el 2,4-dienoil-CoA en enoil-CoA (145, 148). A partir d'aquest pas, la hidratasa/deshidrogenasa FadB i la tiolasa FadA s'encarreguen d'escurçar la cadena inicial d'acil-CoA dos carbonis cada cicle, per a produir acetil-CoA.

INTRODUCCIÓ

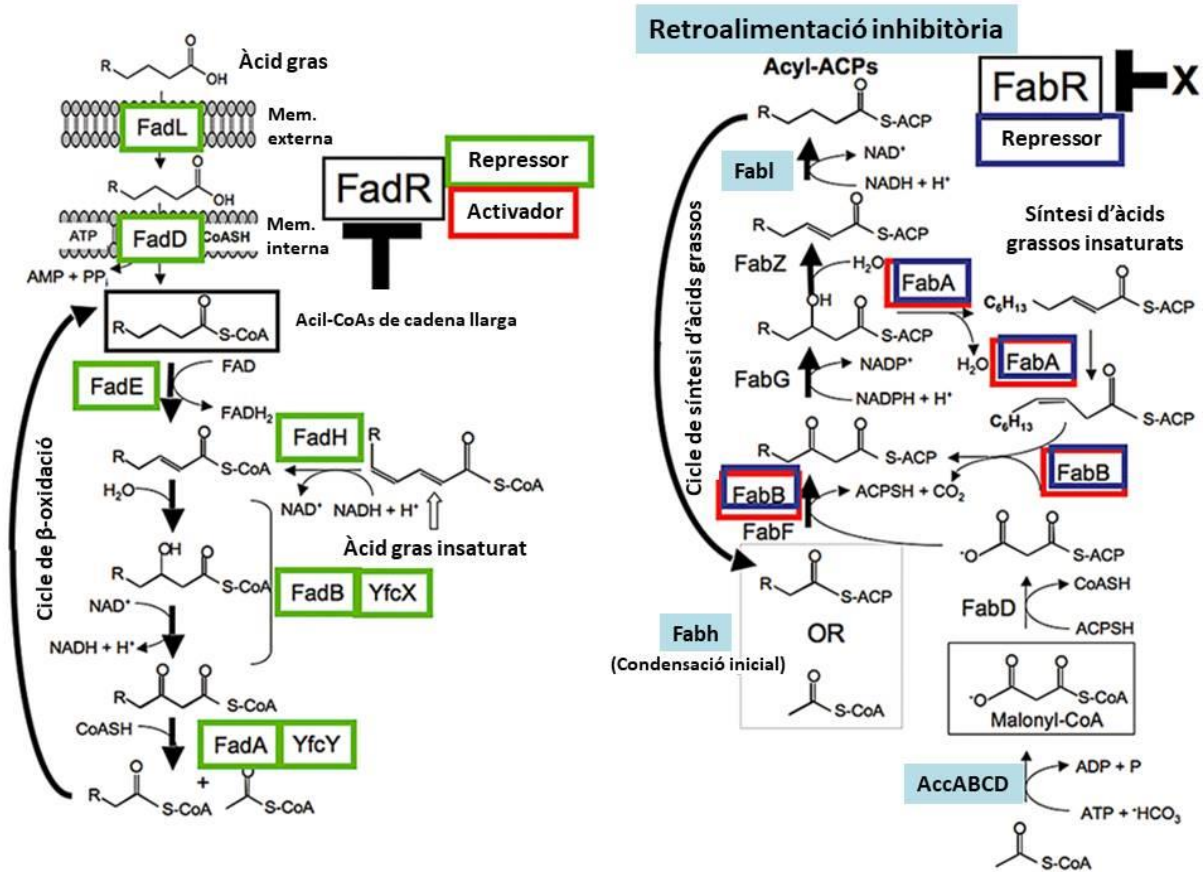


Figura 7. Metabolisme de FAs en *E. coli*. Figura adaptada de Fujita et al. (145). (Esquerra) Els FAs de cadena llarga (LCFAs) es transporten a través de la membrana mitjançant FadL, transportadora/activadora d'acils de la membrana externa i FadD, lligasa de FA-CoA de la membrana interna. La primera etapa de la β -oxidació implica la conversió de l'acil-CoA a enoil-CoA a través de la acil-CoA deshidrogenasa FadE. Després, FadB transforma l'enoil-CoA a 3-cetoacil-CoA per mitjà de dues reaccions d'hidratació i oxidació. El darrer pas està catalitzat per FadA, que trenca el 3-cetoacil-CoA, escurçant la cadena entrant d'acil-CoA en dos carbonis per a alliberar acetil-CoA. Per a la degradació de FAs insaturats, FadH transforma el 2,4-dienoil-CoA derivat dels àcids grassos insaturats en enoil-CoA. (Dreta) El primer pas de la via de síntesi de FAs (FASII) és la transformació de l'acetil-CoA en malonil-CoA, catalitzada pel complex acetil-CoA carboxilasa (AccABCD). La fracció malonil es transfereix a l'ACP per mitjà de FabD. Les reaccions inicials de condensació estan catalitzades per FabH. La següent reacció en el cicle d'elongació implica l'acció de FabG i FabZ. El pas final del cicle està catalitzat per la enoil-ACP reductasa FabI. Els resultants acil-ACPs es poden elongar per FabB i/o FabF. Per a la síntesi de FAs insaturats, FabA i FabB participen en les reaccions de condensació. La proteïna FadR reprimeix l'expressió dels gens encarregats de la via de degradació (quadres verds), mentre que activa l'expressió de gens de la via de síntesi (quadres vermells). Els LCFAs majors de 14 carbonis regulen negativament a FadR. FabR només reprimeix a *fabA* i *fabB* (quadre blau). Finalment, els acil-ACPs regulen la biosíntesi de FAs per retroalimentació inhibidora de AccABCD, FabH i FabI (quadres blau clar).

La via de síntesi general de FAs en bacteris (FASII) comença amb la formació de malonil-CoA a partir de l'acetil-CoA derivat de la β -oxidació, procés catalitzat per l'enzim acetil-CoA carboxilasa (150). El grup malonat del malonil-CoA s'ha de transferir a la proteïna portadora d'acils (ACP, *acyl carrier protein*) per a que pugui servir de substrat pels enzims de FASII, del que s'encarrega FabD (129). Les primeres reaccions de condensació estan catalitzades per FabH, que condensa l'acetil-CoA amb el malonil-ACP per a formar acetoacetil-ACP. El malonil-ACP sintetitzat per FabD també s'utilitza per fer créixer la cadena nova d'àcid gras. La següent reacció en el cicle d'elongació implica l'acció de FabG

INTRODUCCIÓ

per a generar 3-hidroxiacil-ACP. A partir d'aquí, subseqüents enzims del grup Fab actuen sobre les noves cadenes per elongar-les, acabant amb l'acció de FadI que genera acil-ACPs que poden continuar sent elongats (151).

2.OBJECTIUS

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

En base a tots els antecedents i coneixements previs sobre la biologia i la importància socio-sanitària de *S. maltophilia* es plantegen les següents hipòtesis. **Les molècules autoinductores relacionades amb el *quorum sensing* indueixen canvis transcriptòmic en *S. maltophilia* que regulen mecanismes cel·lulars relacionats amb la virulència i l'adaptació a l'ambient.** També, la relació del seu principal mecanisme de *quorum sensing* amb el metabolisme de lípids indica que **la regulació i homeòstasi lipídica juguen un paper important en la patogènesi i resistència a antibiòtics en aquest bacteri.**

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat aprofundir en els mecanismes cel·lulars regulats per senyals autoinductors de *quorum sensing* a *Stenotrophomonas maltophilia*, i també estudiar el seu paper en fenotips de virulència i resistència, juntament amb altres sistemes de regulació lipídica.

Els objectius específics han estat:

1. Analitzar els canvis en l'expressió gènica en *S. maltophilia* en situacions relacionades amb el *quorum sensing*:
 - a. Situacions de densitat cel·lular elevada.
 - b. Presència de molècules autoinductores de *quorum sensing*.
 - c. Absència del regulador d'AHLs SmoR.
2. Caracteritzar un nou regulador transcripcional a *S. maltophilia* modulats per molècules de naturalesa lipídica implicat en la resposta a *quorum sensing*.
3. Relacionar altres gens i operons de *S. maltophilia*, regulats per condicions associades al *quorum sensing*, amb el metabolisme energètic i d'àcids grassos.
4. Validar el sistema Mla de manteniment de fosfolípids a la membrana de *S. maltophilia* com a factor de virulència i resistència, enfocant-nos en la proteïna periplasmàtica d'unió a substrat MlaC.

OBJECTIUS

3.MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Soques bacterianes, condicions de creixement i reactius

3.1.1. *Stenotrophomonas maltophilia* i *Xanthomonas campestris*

La soca *S. maltophilia* K279a es va utilitzar com a soca de referència en aquest estudi (152). Aquesta soca va ser aïllada originalment dels cultius sanguinis d'un pacient d'oncologia bacterèmica a la Infermeria Reial de Bristol (153) i va ser una cessió del Dr. J. Maxwell Dow al nostre laboratori. El llistat complet de soques emprades en aquest treball es troba a la Taula Annex A.

La soca *Xcc* 8523 pL6engGUS s'ha obtingut dels autors de treballs previs amb aquesta soca (90). Aquesta soca *Xcc* pL6engGUS s'ha utilitzat com a soca biosensora per a la detecció de la producció de DSF en *S. maltophilia*. *Xcc* s'ha fet créixer a 28°C en medi NYG (0,5% peptona, 0,3% extracte de llevat i 2% glicerol) suplementat amb 10 µg/mL de tetraciclina.

3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Per als estudis de formació de biofilms mixtes s'ha utilitzat la soca *P. aeruginosa* PAO1, en el laboratori del Dr. Uwe Mamat (*Cellular Microbiology, Priority Research Area Infections, Research Center Borstel*, Borstel, Alemanya). Aquesta soca conté la inserció mini-Tn7T-Gm-Pc-tdTomato_opt per a poder observar-la al microscopi confocal sota una fluorescència vermella.

3.1.3. *Escherichia coli*

Les soques de *E. coli* d'aquest treball han estat utilitzades per a la construcció de mutants en *S. maltophilia* o per a l'expressió heteròloga i producció de proteïnes. Es descriuen les seves característiques en la Taula 1.

Taula 1. Soques de *E. coli* utilitzades en aquest treball.

Soca	Característiques/Genotip	Ús	Font/Referència
DH5 α	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺) <i>phoA ksupE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Clonatge	Col·lecció laboratori
SY327	F ⁻ <i>araD</i> Δ (<i>lac- proAB</i>) <i>argE</i> (Am) <i>recA56 rif^R nalA</i>	Clonatge	(154)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Producció proteïnes	Col·lecció laboratori

3.1.4. Condicions de creixement

Totes les soques utilitzades en aquest treball, excepte *Xcc*, s'han fet créixer de manera rutinària en medi LB (*Lysogeny broth*) i incubades generalment a 37°C si no s'indica el contrari, en agitació a 220 rpm en el cas dels medis líquids. Per a cada procediment es detallen les condicions de cultiu en la seva secció de mètodes corresponent.

3.1.5. Conservació

Totes les soques utilitzades en aquest treball han estat conservades mitjançant la tècnica de criopreservació.

S'han realitzat glicerinars barrejant 1125 μ L de cultiu de nit saturat amb 750 μ L de glicerol estèril al 50%, resultant en una concentració final de glicerol del 20% v/v. S'han congelat a -80°C de manera progressiva (30 min a temperatura ambient, dues hores a 4°C i dues hores a -20°C). Per a la recuperació, els cultius criopreservats s'han rascat amb una nansa estèril i sembrats en una placa de cultiu amb el medi corresponent.

3.1.6. Medis de cultiu

- **Medi LB (*Lysogeny broth*)**

Per al medi LB s'ha utilitzat el medi deshidratat de Condalab (10 g/L NaCl, 10 g/L triptona i 5 g/L extracte de llevat). S'ha rehidratat amb 1 L d'aigua destil·lada i s'ha esterilitzat a l'autoclau durant 15 min a 121°C. Un cop acabat el cicle d'autoclau s'ha atemperat i, si s'escau, s'ha afegit l'antibiòtic corresponent en funció de la soca utilitzada i l'assaig. En el cas

de medi sòlid, s'ha afegit 15 g/L d'agar previ a l'esterilització. A continuació, s'ha dispensat el medi en plaques de petri i un cop solidificades s'han emmagatzemat a 4°C.

- **Medi mínim BM2-Casaminoàcids (BM2-CAA)**

El medi mínim BM2 (*Basal medium 2*) s'ha preparat amb 62 mM de tampó fosfat potàssic ajustat a pH 7,2, suplementat amb 2 mM de MgSO₄, 10 µM de FeSO₄, 0,4% de D-Glucosa [pes/volum] i 0,5% de casaminoàcids [pes/volum] de Difco™. S'ha autoclavat 15 min a 121°C.

- **Medi mínim M9**

El medi mínim M9 s'ha preparat amb un estoc de sals M9 modificades (33,6 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g/L KH₂PO₄, 2,5 g/L NaCl, 0,5% CAA, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ i 0,2% D-glucosa). S'ha autoclavat 15 min a 121°C.

- **Medi NYG**

El medi NYG utilitzat per a la soca *Xcc pL6engGUS* s'ha preparat amb 0,5% peptona, 0,3% extracte de llevat i 2% glicerol. Després d'autoclavar s'ha afegit tetraciclina a concentració final 10 µg/mL un cop atemperat.

- **Medi Mueller-Hinton**

Per a la determinació de resistències a antibiòtics s'ha utilitzat el medi *Mueller-Hinton Broth* (MHB) de la casa comercial OXOID® amb referència CM₀₃₃₇. En 1 L d'aigua destil·lada s'han afegit 21g de medi deshidratat i un cop dissolt s'ha esterilitzat a l'autoclau. Per a medi sòlid s'han afegit 15 g/L d'agar. Per als estudis de susceptibilitat s'han seguit les recomanacions de la CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) i s'ha suplementat el medi MHB amb els cations Ca²⁺ i Mg²⁺ a 25 µg/mL i 12,5 µg/mL, respectivament.

- **Medi MacConkey**

Per a l'estudi de susceptibilitat a sals biliars s'ha utilitzat el medi MacConkey de la casa comercial OXOID® amb referència CM₀₀₀₅. En 1 L d'aigua destil·lada s'han afegit 40g de medi deshidratat i un cop dissolt s'ha esterilitzat a l'autoclau amb 15g d'agar durant 15 min a 121°C.

- **Medi BHI**

Per a l'estudi de la formació de biofilms s'ha utilitzat el medi ric Brain Heart Infusion de la casa comercial OXOID® amb referència CM₁₁₃₅. En 1 L d'aigua destil·lada s'han afegit 37g de medi deshidratat i un cop dissolt s'ha esterilitzat a l'autoclau durant 15 min a 121°C.

3.1.7. Solucions stock

- **Solucions estoc de cations**

Ca²⁺: S'han dissolt 3,68g de CaCl₂·2H₂O en 100 mL d'aigua H₂O_{MQ} per a obtenir una concentració de 10 mg/mL de Ca²⁺.

Mg²⁺: S'han dissolt 8,36g de MgCl₂·6H₂O en 100 mL d'aigua H₂O_{MQ} per a obtenir una concentració de 10 mg/mL de Mg²⁺.

Les dues solucions s'han esterilitzat mitjançant filtració i s'han emmagatzemat a 4°C fins al seu ús.

- **Resazurina**

La resazurina s'ha utilitzat per als estudis de susceptibilitat a antibiòtics. Aquest compost és un indicador redox que indica el canvi d'estat oxidat (color blau) a estat reductor (color rosa) en presència de creixement bacterià. La solució estoc s'ha preparat al 0,1% pesant 0,01g de la sal sòdica de resazurina (Sigma-Aldrich) i dissolent-la en 10 mL d'aigua H₂O_{MQ}. S'ha esterilitzant mitjançant filtració amb filtres de 0,22 µm de diàmetre i s'ha al·liquotat en tubs d'1,5 mL per conservar a -20°C fins al seu ús. La solució de treball s'ha obtingut fent una dilució 1:10 (0,01%) en H₂O_{MQ}.

- **Molècules de QS**

Les molècules de QS utilitzades en aquest estudi, tant pels estudis transcriptòmics com pels assajos d'unió Proteïna-DNA en presència de lligand s'han obtingut de Sigma-Aldrich i han estat les següents: DSF (àcid cis-11-metil-2-dodecenoic), C8-HSL (N-octanoil-HSL), 3-oxo-C8-HSL (N-3-oxo-octanoil-HSL) i C10-HSL (N-decanoil-HSL). Les solucions estoc s'han preparat a 20 mg/mL en DMSO (dimetil sulfòxid) i al·liquotades i emmagatzemades a -20°C fins al seu ús.

- **Àcids grassos i fosfolípids**

Els FAs utilitzats en aquest estudi per als assajos d'unió Proteïna-DNA en presència de lligand s'han obtingut de Sigma Aldrich en la seva forma conjugada de sal i han estat els següents: C4 (butirat sòdic), C8 (octanoat sòdic), C12 (àcid làuric sòdic, dodecanoat sòdic), iso-C_{15:0} (àcid iso-pentadecanoic o àcid 13-metil-tetradecanoic) i C16 (àcid palmític sòdic, àcid hexadecanoic). Les solucions estoc s'han preparat al 2% i els solvents utilitzats han estat: H₂O_{MQ} per a C4 i C8, H₂O_{MQ} amb 1% del detergent Brij-58 per a C12 i iso-C_{15:0}, i metanol 10% per al C16.

MATERIALS I MÈTODES

Per a la determinació de l'afinitat d'unió de la proteïna MlaC s'han utilitzat els PLs 14:0 PE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) i 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), obtinguts de la casa Avanti® Lipids a través de Sigma-Aldrich.

- **Antibiòtics**

Els antibiòtics utilitzats en aquest treball, tant per als protocols de clonatge com de determinació de resistències es detallen en la Taula 2.

Taula 2. Llistat d'antibiòtics utilitzats en aquest treball.

Abreviació	Antibiòtic	Concentració estoc (µg/mL)	Solvent
IPM	Imipenem	5120	Tampó Fosfat 0,01M pH 7,2
MEM	Meropenem	5120	H ₂ O
CAZ	Ceftazidima	5120	Carbonat sòdic anhidric
PIP	Piperacil·lina	5120	H ₂ O
TZP	Piperacil·lina- Tazobactam	5120 Piperacil·lina 400 Tazobactam	H ₂ O
TIC	Ticarcil·lina	5120	Tampó Fosfat 0,01M pH 6,0
TIM	Ticarcil·lina- Clavulànic	640	Tampó Fosfat 0,01M pH 6,0
TOB	Tobramicina	5120	H ₂ O
AMI	Amikacina	5120	H ₂ O
GEN	Gentamicina	5120	H ₂ O
KAN	Kanamicina	10240	H ₂ O
STR	Estreptomicina	1280	H ₂ O
CHL	Cloramfenicol	5120	Etanol 95%
TET	Tetraciclina	1280	Etanol 70%
MIN	Minociclina	640	H ₂ O
TGC	Tigeciclina	320	H ₂ O
CIP	Ciprofloxacina	1280	H ₂ O
LVX	Levofloxacina	640	H ₂ O + gotes de NaOH 0,1M
OFX	Ofloxacina	640	H ₂ O + gotes de NaOH 0,1M
NOR	Norfloxacina	5120	H ₂ O + gotes de NaOH 0,1M
SXT	Trimetoprim- Sulfametoxazol	1280 Trimetoprim 24320 Sulfametoxazol	TMP: 6 µL HCl en 10 mL SMX: H ₂ O calenta amb 100 µL NaOH 10M en 10 mL
CST	Colistina	5120	H ₂ O

- **EDTA**

S'ha utilitzat l'EDTA (àcid etilendiamintetraacètic) en la majoria d'assajos realitzats en la secció 3 de resultats per com a permeabilitzador de la membrana. S'ha preparat la solució estoc a 0,5M ajustant el pH a 8,0 amb NaOH.

- **NPN i CCCP**

Per als assajos de permeabilitat de membrana s'han utilitzat la sonda no polar 1-N-fenilnaftilamina (NPN) i l'agent desacoblant carbonilcianur-m-clorofenilhidrazona (CCCP), obtinguts de Sigma-Aldrich. L'estoc de NPN s'ha preparat a 0,5 mM en acetona diluïda en 5 mM de tampó HEPES (Thermo Fisher Scientific) a pH 7,2. El CCCP s'ha preparat a 50 mM en acetona.

3.2. Tècniques generals de Biologia molecular

A continuació es detallen les tècniques moleculars utilitzades al llarg d'aquest estudi. Tots els protocols s'han realitzat d'acord amb el llibre Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (155). Els enzims de restricció, la DNA polimerasa de fusió, la DNA polimerasa T4 i els kits d'extracció de DNA s'han comprat a Thermo Fisher Scientific i s'han utilitzat seguint les instruccions del fabricant. Altres tècniques específiques es detallen en les seccions següents.

3.2.1. Oligonucleòtids i vectors plasmídics

Els plasmidis utilitzats per a la generació de mutants es detallen a la Taula Annex B.

D'altra banda, els oligonucleòtids s'han dissenyat mitjançant el programa Oligo 6 (<http://www.oligo.net>). Tots els oligonucleòtids han estat sintetitzats i comprats a Sigma-Aldrich i es detallen a la Taula Annex C.

3.2.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Per amplificar els fragments desitjats per ser utilitzats en els passos de clonació posteriors, s'ha utilitzat com a plantilla el DNA genòmic de *S. maltophilia* K279a. Les reaccions PCR es van realitzar amb la polimerasa PhusionTM *High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), d'acord amb les instruccions del fabricant. Per a genomes amb un alt contingut de GC com el de *S. maltophilia*, s'ha utilitzat el tampó GC del kit. Tots els altres reactius i kits utilitzats en aquesta secció s'han obtingut de Thermo Fisher Scientific, llevat que s'indiqui el contrari.

Després d'executar el programa de la PCR en un termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler de Bio-Rad, la reacció completa es s'ha carregat en un gel d'agarosa del 0,8% per a procedir amb una electroforesi per a comprovar la mida i la qualitat correctes dels amplicons. La mida de la banda s'ha comparat amb l'escala estàndard *GeneRuler 1 Kb Plus*. El DNA que s'havia d'utilitzar en la clonació s'ha purificat amb el Kit *DNA GeneJET Gel Purification* i eluït en H₂O_{MQ}. Per a un emmagatzematge llarg, el DNA s'ha mantingut a -20°C.

3.2.3. Extracció plasmídica de DNA

Els plasmidis de DNA s'han extret i purificat utilitzant el kit *GeneJET Plasmid Miniprep* seguint les instruccions del fabricant. Després de ser eluït en H₂O_{MQ}, la quantitat i qualitat del DNA plasmídic s'han determinat en un espectrofotòmetre NanoDrop™. Només s'ha utilitzat DNA amb una concentració superior a 30 ng/μL i amb puresa acceptable (valors A_{260/280} de ~ 1,8 i A_{260/230} de ~ 2) en experiments posteriors.

Pel que fa al plasmidi pGPI-Scel-XCm s'ha requerit un kit diferent ja que es manté en la soca *E. coli* SY327, que porta el gen *endA* (endonucleasa I). Per a això, s'ha utilitzat el kit *GenElute Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich), que es recomana per a soques *endA+*.

3.2.4. Clonatge molecular

La generació dels mutants de deleció enumerats a la Taula Annex A ha implicat els següents passos: (i) amplificació del DNA per a generar fragments US (*upstream*) i DS (*downstream*) del gen diana a eliminar, (ii) digestió amb enzims de restricció apropiats, (iii) lligació en el vector de DNA corresponent; i (iv) transferència i cribratge de la construcció genètica. El primer pas de l'amplificació del DNA es detalla en la secció 3.2.2.

1. Digestió del DNA

Els fragments de DNA amplificats i purificats s'han digerit amb el parell d'enzims de restricció pertinents (ER), llistats a la Taula Annex C. Cada barreja de reacció ha inclòs el tampó universal *FastDigest*, el DNA motlle (~ 200 ng d'un producte de PCR i ~ 1 μg de DNA plasmídic) i una unitat de cada enzim. La barreja de reacció s'ha incubat a 37°C durant 1 hora i s'ha carregat directament en un gel d'agarosa del 0,8%. Després de l'electroforesi del gel,

les bandes s'han extret i purificat mitjançant el Kit *GeneJET Gel Extraction* i la qualitat i concentració s'han determinat en l'espectrofotòmetre NanoDrop™.

2. Lligació del DNA

Els fragments de DNA i els vectors digerits amb els mateixos ER s'han lligat amb la DNA lligasa T4. Com suggereix el fabricant, les relacions molars plasmidi:insert s'han mantingut en 1:3 o 1:7. Les reaccions han inclòs els productes de PCR digerits (inserts) i els plasmidis, el tampó per a T4 i la lligasa de DNA T4. Normalment, la reacció de lligació s'ha realitzat durant 16 hores a 4°C i s'ha inactivat l'enzim per calor a 70°C durant 5 minuts.

3. Transferència de DNA a *E. coli*

En aquest treball s'han utilitzat tres mètodes diferents per a la transferència de DNA: transformació química, conjugació i electroporació.

La transformació química s'ha utilitzat per a transferir el DNA plasmídic a les cèl·lules receptores *E. coli*. Aquestes cèl·lules s'han tractat prèviament amb CaCl₂ 0,1 M abans de la transformació. A continuació, s'ha utilitzat el mètode de xoc tèrmic exposant les cèl·lules i el DNA a 42°C durant 1 minut. Immediatament després, s'ha afegit medi LB fresc i s'han incubat les cèl·lules a 37°C durant 1,5 hores per a permetre l'expressió dels gens de resistència del plasmidi. Finalment, 100 µl s'han escampat en plaques d'agar LB amb la concentració d'antibiòtic adequat i s'han incubat durant la nit a 37°C. Per confirmar la correcta integració dels fragments amplificat en el DNA plasmídic, s'ha realitzat una PCR sobre les colònies crescudes en medi selectiu utilitzant els oligonucleòtids adequats. Finalment s'ha verificat que les seqüències lligades són les correctes mitjançant seqüenciació Sanger.

La conjugació bacteriana i l'electroporació de les cèl·lules de *S. maltophilia* es detallen a la secció següent.

3.3. Generació de mutants i complementació *in trans*

Per a la generació de mutants sense marcadors de resistència en *S. maltophilia* s'ha utilitzat el sistema pGPI-Scel/pDAI-Scel-SacB, originalment descrit per a soques multirresistents del gènere *Burkholderia* (154, 156). Les soques bacterianes i els plàsmids del sistema han estat cedides pel Dr. Miguel A. Valvano (Center for Infection and Immunity, Queen's University, Belfast, Regne Unit). Per a aplicar aquest sistema en *S. maltophilia* s'ha seguit la metodologia descrita prèviament (157).

S'ha utilitzat una conjugació triparental que inclou la soca donadora (*E. coli* SY327 amb el plasmidi pGPI-Scel-XCm que conté les zones flanquejants US i DS del gen a deleccionar), la soca *helper E. coli*

DH5 α /pRK2013 i la soca receptora *S. maltophilia* K279a salvatge. La soca *helper* aporta els gens *tra* i *mob* per a ajudar a la mobilització dels plàsmids d'interès. Aquest protocol de conjugació consta de tres passos: conjugació del plasmidi de deleció pGPI-Scel-XCmSmltxxx1, que conté les zones US i DS flanquejants al gen a deleccionar, seguit de el segon pas de resolució dels cointegrats per mitja del vector pDAI-Scel-SacB i finalment l'eliminació del plasmidi replicatiu en la soca receptora K279a.

3.3.1. Disseny: el sistema pGPI-Scel/pDAI-Scel-SacB

L'esquema del disseny general de deleció utilitzat en aquest treball es troba resumit en la Figura 8.

El primer pas és clonar aquestes seqüències US i DS del cromosoma de *S. maltophilia* K279a al vector pGPI-Scel-XCm (codi d'accés: KC409641;Figura 8B). Aquest plasmidi suïcida, que no es pot replicar en *S. maltophilia*, porta un gen de resistència al cloramfenicol (CAT; acetiltransferasa de cloramfenicol), el gen reporter *xilE* i un lloc únic de reconeixement per a la nucleasa I-Scel. Un cop obtinguda la construcció, es transfereix a la soca receptora K279a mitjançant conjugació triparental utilitzant *E. coli* DH5 α /pRK2013 com a soca *helper*. En aquest pas, el vector pGPI-Scel-XCm que conté regions US i DS s'integra en el genoma per recombinació homòloga (ja sigui US o DS, primer encreuament). Els cointegrats resultants s'han seleccionat en plaques d'agar LB que contenen una concentració adequada de cloramfenicol (60 μ g/ml). Les plaques també contenen 5 μ g/ml de norfloxacina per a contrarestar les soques d'*E. coli* utilitzades. Una segona confirmació de la correcta integració s'ha aconseguit ruixant les colònies transconjugants amb pirocatecol. Atès que el plasmidi pGPI-Scel-XCm porta el gen *xilE* (codificant una pirocatecol 2,3-dioxigenasa) les colònies amb el plasmidi integrat desenvolupen un color groc després de ser ruixats amb pirocatecol 0,45 M. A continuació, el plasmidi pDAI-Scel-SacB s'ha introduït mitjançant una segona conjugació triparental. Aquest plasmidi expressa l'endonucleasa I-Scel, que catalitza els trencaments de doble cadena en el lloc I-Scel introduït pel plasmidi pGPI-Scel-XCm. Això indueix la maquinària de reparació del DNA de l'hoste, estimulant un segon esdeveniment de recombinació. Atès que els trencaments de doble cadena són letals, només es recuperaran les cèl·lules que hagin tingut aquest segon encreuament. En aquesta última etapa, són possibles dos resultats diferents: si s'utilitza la mateixa regió de flanqueig per a ambdós esdeveniments creuats, el resultat serà un gen de tipus salvatge. Per contra, si cadascun dels flancs està involucrat en una reacció creuada, el resultat serà un mutant sense cap marcatge (gen de resistència). Per a l'última selecció, només s'han verificat les colònies que mostren resistència a la tetraciclina (expressada en el plasmidi pDAI-Scel-SacB) i que són sensibles al cloramfenicol (per pèrdua del plasmidi pGPI-Scel-XCm). Per confirmar finalment els clons, s'ha realitzat una PCR amb

MATERIALS I MÈTODES

oligonucleòtids externs a la regió suprimida. Per a resoldre les colònies crescudes amb el plasmidi pDAI-Scel-SacB s'ha contraseleccionat en plaques d'agar LB amb una concentració de 5% de sacarosa. Aquestes plaques s'han incubat a 37°C durant 24 hores i les colònies resultants s'han resseminat en dues plaques, una de LB sense antibiòtics i una altra amb tetraciclina a 60 µg/mL. Els clons finals són aquells sensibles a la tetraciclina, donada la pèrdua del plasmidi pGPI-Scel-SacB. En aquest punt els mutants ja poden conservar-se o utilitzar-se en assajos experimentals.

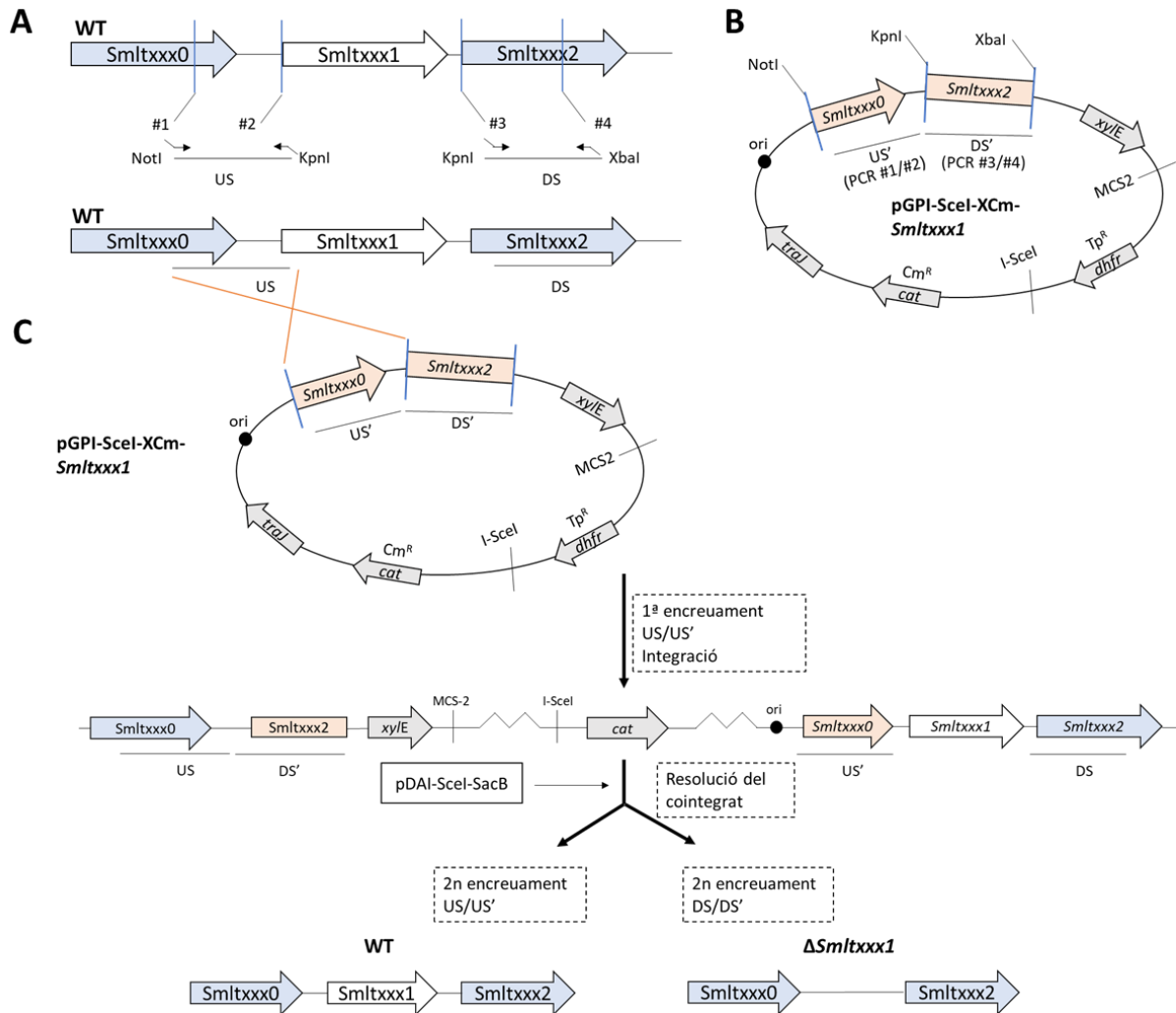


Figura 8. Esquema de delectió del sistema pGPI-Scel-XCm. (A) Disseny dels oligonucleòtids necessaris. US per amplificar la regió 5' de la diana a mutar i DS per a amplificar la regió 3' de la diana a mutar. S'indiquen dianes genèriques de restricció. (B) Esquema del plasmidi pGPI-Scel-XCm amb la integració de les regions US i DS amplificades i clonades. (C) Resum del procediment implicat en la generació del mutant. Primer el plasmidi pGPI-Scel-XCm s'integra en el cromosoma de la soca receptora (K279a) després d'un 1n esdeveniment d'encreuament. Per a la resolució d'aquest cointegrat és necessària la introducció del segon plasmidi pGPI-Scel-XCm que expressa l'endonucleasa Scel. Aquesta induïx el 2n esdeveniment de recombinació amb dos possibles resultats. L'obtenció del mutant sense cap marcador de resistència o bé la restauració de l'al·lel salvatge.

3.3.2. Complementació *in trans* dels mutants

En tots els mutants descrits en aquest treball, la complementació gènica s'ha obtingut clonant el gen eliminat en un plasmidi de la sèrie pBBR1-MCS, que són replicatius en *S. maltophilia*. En alguns casos, on s'ha requerit d'una regulació ajustada de l'expressió gènica, també s'han utilitzats vectors de la sèrie pBBR1-MCS modificats que contenen el promotor d'arabidosa pBAD, generant el vector pBBR1-pBAD-MCS-1 obtingut en el nostre laboratori (142).

Els vectors de complementació s'han obtingut clonant el gen delecionat en el vector pBBR1 corresponent en *E. coli* DH5 α per a la seva replicació. Posteriorment el plasmidi de complementació s'ha transferit a la soca de *S. maltophilia* mutada pertinent mitjançant electroporació. Per a això, s'han preparat cèl·lules electrocompetents de *S. maltophilia* utilitzant rentats successius amb 300 mM de sacarosa (158). Les condicions d'electroporació han estat les següents: 2,5 kV de potencial elèctric, 200 Ω de resistència i 25 μ F de capacítancia, en un electroporador GenePulser XCellTM de Bio-Rad. Després del pols elèctric es recuperen ràpidament les cèl·lules amb 1 mL de medi LB i s'han incubat 2 hores a 37°C amb agitació. Passat aquest temps s'han sembrat en plaques LB amb l'antibiòtic per a la selecció i després de 24 hores d'incubació s'han seleccionat les colònies resistents, que han introduït el plasmidi replicatiu.

3.3.3. Marcatge de cèl·lules amb GFP i Tomato

Les cèl·lules amb marcatge fluorescent s'han obtingut al laboratori del Dr. Uwe Mamat seguint un protocol posat a punt pel seu equip. Resumidament, s'han utilitzat els fluoròfors sfGFP optimitzat i tdTomato per a *S. maltophilia* i *P. aeruginosa*, respectivament. El mètode de transferència ha estat la conjugació tetraparental, utilitzant les següents soques: Soques donadores *E. coli* SM10 λ pir/pUX-BF13 i *E. coli* DH5 α /pUC18T-mini-Tn7T-Gm-Pc-sfGFP_op per *S. maltophilia* i *E. coli* DH5 α /pUC18T-mini-Tn7T-Gm-Pc-tdTomato_opt per a *P. aeruginosa*. La soca *helper* ha estat la *E. coli* DH5 α /pRK2013 i la soca receptora aquella que s'ha volgut marcar. Per a aquest treball el seu equip ha marcat les soques utilitzades del sistema Mla i la soca salvatge de *P. aeruginosa* PAO1 (secció 3 de resultats).

3.4. Seqüenciació de RNA (RNA-Seq) i anàlisi de dades

3.4.1. Seqüenciació de RNA

Per als assajos de transcriptòmica per mitjà de la tecnologia RNA-seq s'han fet créixer cultius de nit de la soca de *S. maltophilia* corresponent a 37°C en LB i agitació. Per a cada condició s'han inoculat 3 cultius amb el precultiu de nit a una DO_{600} de 0,05. Pels assajos amb molècules exògenes de QS s'han utilitzat una combinació d'AHLS (3-oxo-C8-HSL, C8-HSL i C10-HSL) a una concentració final de 10 μ M cada una (conjunt AHL) i DSF també a 10 μ M (conjunt DSF) en l'inici de la fase exponencial ($DO_{600}=0,2$). Els conjunts d'AHLS, DSF, LOG i els assajos per SmoR i Smlt2053 s'han recollit a la fase exponencial tardana ($DO_{600}=1,5$), mentre que el conjunt de la fase estacionària s'ha recollit a una DO_{600} saturada de 5. Les condicions de cada RNA-Seq estan detallades a la secció de resultats corresponent. Com a control pels conjunts de dades AHL i DSF s'ha utilitzat la soca K279a incubada amb el mateix volum de DMSO utilitzat en cada condició.

El RNA total s'ha purificat amb el kit *RNeasy Mini* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. La quantitat i qualitat de cada mostra de RNA s'ha valorat amb el 2100 Bioanalyzer (Agilent). Només s'han seleccionat les mostres que tenien valors de RIN (*RNA Integrity Number*) superiors a 8 per a la construcció de les llibreries. Aquest RNA total purificat s'ha enviat al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmic (CNAG-CRG, Barcelona) on s'han realitzat tots els procediments posteriors. Per a la construcció de llibreries s'ha seguit el protocol TruSeq™ Stranded Total RNA (Illumina Inc.). El RNA ribosomal (rRNA) s'ha eliminat a partir de 2 μ g de RNA total amb el kit Ribo-Zero d'Illumina. S'han seqüenciat fragments de 2x75 pb en un instrument Illumina Hi-Seq 2000 v3, seguint els procediments del CNAG.

L'anàlisi de les dades ha començat amb l'ús de FastQC per a validar la qualitat dels *reads* i aquests s'han mapejat al genoma de *S. maltophilia* K279a utilitzant l'eina STAR (159). Les abundàncies de cada gen s'han normalitzat calculant el FPKM (*Fragment Per Kilobase Million*). L'anàlisi d'expressió diferencial s'ha realitzat amb el paquet del software R DESeq2 utilitzant el p-valor ajustat ($p\text{-adj}$) < 0,05 com a llindar per a la significança estadística, amb una correcció Benjamini-Hochberg per tests múltiples. Aquests resultats han estat entregats al nostre laboratori després d'aquest anàlisi.

3.4.2. Anàlisi d'enriquiment de les dades

Pels anàlisis posteriors, s'han seleccionat els gens amb un valor d'expressió diferencial (*fold-change*) $\geq 1,5$ com a gens amb expressió diferencial (DEG, *differentially expressed gene*) comparant un conjunt de dades amb el seu control. El proteoma de *S. maltophilia* K279a s'ha anotat funcionalment utilitzant l'eina EggNOG-mapper (<http://eggno-mapper.embl.de/>) per a assignar cada proteïna a una categoria de la base de dades COG (*Cluster of Orthologous Groups*) (160). Les categories COG del genoma complet de *S. maltophilia* K279a s'han obtingut de la base de dades IMG (*Integrated Microbial Genomes*, <https://img.jgi.doe.gov/>). Per a l'anàlisi d'enriquiment s'han utilitzat les bases de dades Gene Ontology (GO) i Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). L'estadístic per les anàlisis d'enriquiment ha estat un test hipergeomètric amb la correcció Benjamini-Hochberg del p-valor. S'ha permès la fusió de termes GO per evitar redundàncies. Per les anàlisis GO i KEGG s'ha utilitzat el paquet de R TopGO (v2.38.1) i el software KOBAS-i, respectivament (161, 162). Les representacions de les dades s'han realitzat amb els paquets ggplot2, scales, reshape2, forcats, dplyr, enhancedvolcano i cowplot de R (v4.1.2). La identificació de motius de la llista de DEGs s'ha realitzat amb l'algoritme de la *suite* MEME (163). S'ha obtingut la regió de cada gen de -250 bp a +50 bp de l'ATG inicial i s'ha sotmès a anàlisi a la *suite* MEME. Els motius enriquits de cada conjunt s'han comparat amb els motius d'unió de factors de transcripció coneguts mitjançant l'eina TomTom, mentre que el genoma de K279a s'ha utilitzat com a motlle per a cercar aquests motius a la base de dades PRODORIC (<http://www.prodoric.de>).

3.4.3. Anàlisi per PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR)

Per a determinar els nivells d'expressió de diferents DEGs i confirmar la validesa dels resultats previs de RNA-Seq s'han replicat les condicions de cada experiment previ per triplicat. Un μg de RNA s'ha utilitzat per a sintetitzar el DNA complementari (cDNA) amb el Maxima Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific). Les qRT-PCR s'han realitzat en un termociclador CFX96 (Bio-Rad). S'han amplificat productes d'aproximadament 150 pb i s'ha utilitzat el gen constitutiu *rpoD* (*housekeeping*) com a control. La reacció també ha inclòs una barreja amb SYBR *green* i els oligonucleòtids corresponents. Les comparatives d'expressió diferencial s'han fet seguint el mètode $\Delta\Delta C_T$ (software CFX Manager) normalitzant el valor de C_T de cada gen amb el del gen *housekeeping rpoD*.

3.5. Assajos fenotípics

3.5.1. Biofilm en plaques de 96 pous

Els assajos de formació de biofilm en estàtic s'han realitzat en plaques de microtitulació de 96 pous, de fons en "U" no tractades de poliestirè (BrandTech 781662). S'ha seguit el mètode prèviament descrit per Huedo *et al.* (87), utilitzant el cristall violeta (CV) per a revelar la presència de biofilm. La quantificació del biofilm i del creixement (per absorbància) s'ha realitzat en un instrument Victor V3 1420 multilabel Reader (PerkinElmer).

El dia abans de l'assaig s'ha fet créixer un cultiu de les soques a testar en LB a 37°C en cultius de nit i agitació. El dia de l'assaig s'ha preparat un inòcul ajustant a una $DO_{600}=0,05$ i s'han dipositat 200 μ L en cada un dels pouets de la placa (un mínim de sis rèpliques en tres experiments independents) i s'ha incubat 24 hores a 30°C o 37°C i en diferents medis (BM2, M9 i LB). Transcorregut el període d'incubació s'ha realitzat una primera mesura a DO_{600} per a determinar el creixement (biomassa cel·lular) de cada un dels pous. A continuació, s'ha retirat el medi i les cèl·lules no adherides mitjançant 3 rentats consecutius amb aigua destil·lada. Seguidament s'ha incubat la placa a 60°C durant una hora per a fixar i assecar el biofilm format al voltant dels pous. Per a tenyir el biofilm s'han utilitzat 200 μ L de CV 0,1% [pes/volum] per pou i s'ha deixat incubar durant 15 min a temperatura ambient. L'excés de CV s'ha retirat amb tres rentats amb aigua destil·lada i s'ha deixat assecar a 37°C. Per a poder determinar el biofilm total s'ha dissolt el CV fixat als pous amb àcid acètic al 30% i s'ha quantificat l'absorbància a 550 nm. Per a poder determinar el biofilm relatiu s'ha calculat el ratio de biofilm per unitat de creixement (biofilm total DO_{550} / biomassa cel·lular DO_{600}).

3.5.2. Biofilm en plaques tractades i microscòpia confocal (CLSM)

Els assajos de formació de biofilm amb cèl·lules marcades amb sfGFP o tdTomato s'ha realitzat en plaques μ -Slide 8 well (Ibidi 80826) tractades amb una capa polimèrica per a millorar l'observació per microscòpia confocal.

La preparació de les mostres ha inclòs un precultiu de nit de les soques a testar en medi BHI amb agitació a 37°C amb els antibiòtics corresponents per a cada soca. El següent dia s'ha ajustat la DO_{600} a 0,05 per a l'inòcul inicial en 0,5X BHI a 30°C i s'han sembrat 400 μ L (per duplicat) a les cambres de 8 pous per incubar-se a 30°C en ambient humit. Cada 12 hores s'ha aspirat el medi de cada cambra i se

n'ha afegit medi fresc, fins a una incubació total de 72 hores. Abans de l'observació al microscopi s'ha aspirat tot el medi excedent i s'ha visualitzat el biofilm.

Per a la preparació de biofilms mixtes en *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* s'ha seguit el mateix procediment, però inoculant 200 µL de cada soca a la cambra µ-Slide.

La visualització s'ha realitzat utilitzant un microscopi confocal (CLSM, *Confocal laser scanning microscope*) TCS SP5 (Leica). La senyal fluorescent de un mínim de 3 camps per cambra s'ha recollit (50 z-stacks) per al seu processament. Per a la reconstrucció en tres dimensions les z-stacks representatives s'han recollit i s'ha utilitzat el programa Imaris software (Oxford Instruments) per a la conversió en models 3D. Per a calcular el volum total dels biofilms observats s'ha utilitzat el plugin COMSTAT del software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). La visualització i conversió de les imatges s'ha realitzat per part del Dr. Uwe Mamat a les instal·lacions del departament de Citometria de Florescència del Research Center Borstel (Borstel, Alemanya).

3.5.3. Microscòpia electrònica

3.5.3.1. Microscòpia electrònica de rastreig

La visualització de les cèl·lules de *S. maltophilia* s'ha realitzat en un microscopi electrònic de rastreig (SEM, *Scanning Electron Microscope*) LEO SEM 1525 (Zeiss, Alemanya) a 5 kV a l'Institut Zoològic d'Hamburg (Hamburg, Alemanya). S'han preparat cultius de nit de cada una de les soques en 5 mL de medi LB amb una concentració subinhibitòria de 0,5 mM d'EDTA. La suspensió s'ha centrifugat a 13000 rpm durant 2 minuts i els *pellets* s'han resuspès en 500 µL de PBS estèril. Posteriorment s'han fixat en paraformaldehid 1% i deshidratat gradualment en concentracions creixents d'etanol. El pas de deshidratació s'ha completat assecant els *pellets* al punt crític amb un instrument Balzers CPD 030 Critical Point Dryer. Previ a la visualització s'han recobert les mostres amb partícules d'or utilitzant un SCD 050 Sputter Coater (Bal-Tec, Estats Units).

3.5.3.2. Microscòpia electrònica de transmissió

L'observació de les estructures internes de les diferents soques de *S. maltophilia* s'ha realitzat utilitzant en un microscopi electrònic de transmissió (TEM, *Transmission Electron Microscope*) Biotwin CM120 (Philips, Països Baixos) operant a 120 kV a les instal·lacions del Biocenter Klein Flottbek de la Universitat d'Hamburg (Alemanya). Els cultius de nit s'han preparat en les mateixes

condicions que per l'observació al SEM. Les cèl·lules s'han fixat amb glutaraldehid 2,5% durant la nit i una post-fixació amb tetraòxid d'osmi al 1% durant 2 hores. Previ a l'observació les cèl·lules s'han deshidratat en gradients d'etanol. S'han obtingut seccions ultrafines en un ultramicròtom UC7 (Leica Microsystems) i s'han dipositat en una reixeta recoberta de níquel i contra-tenyides amb acetat d'uranil i citrat de plom. Les imatges obtingudes amb la càmera Gatan MSC 794 s'han recuperat amb el software Digital Micrograph incorporat.

3.5.4. Susceptibilitat a antibiòtics i a altres compostos

La concentració mínima inhibidora (CMI) dels antibiòtics descrits en la secció 3.1.7 s'ha realitzat pel mètode de microdilució en placa (BMD, *Broth Microdilution Method*). El mètode BMD s'ha realitzat en medi Mueller-Hinton amb la concentració ajustada de cations Ca^{2+} i Mg^{2+} (CAMHB, *Cation adjusted Mueller Hinton broth*), seguint les recomanacions (164). Les soques bacterianes s'han cultivat en medi CAMHB utilitzant es recomanacions del CLSI i els antibiòtics s'han afegit en dilucions seriades 2X. La suspensió bacteriana s'ha diluït a 5×10^5 UFC/mL i s'ha afegit en cada un dels pous corresponents, que contenen les dilucions d'antibiòtics. Les plaques s'han incubat durant 20h a 37°C abans de ser revelades per inspecció visual (turbidesa del cultiu) o pel mètode de la resazurina (165). La CMI s'ha definit com la concentració mínima d'antibiòtic que ha evitat el creixement bacterià. Les CMIs s'han confirmat per dues rèpliques en tres experiments independents.

Per a la determinació de la sensibilitat a sals biliars s'ha seguit el protocol descrit prèviament (166). S'han diluït i sembrat les dilucions de cultius de nit en plaques d'agar MacConkey, per incubar-se 24 hores a 37°C.

3.5.5. Infecció en larves de *G. mellonella*

Per als assajos de virulència s'ha utilitzat el model animal de larves de *G. mellonella* (167). Les larves s'han obtingut criant-les al nostre laboratori en col·laboració amb el Professor Fernando García del Pino del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, de la Unitat de Zoologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Per a preparar l'inòcul bacterià, les soques de *S. maltophilia* s'han fet créixer a 37°C en medi BHI en agitació. Posteriorment les cèl·lules s'han centrifugat i rentat amb PBS estèril i la concentració s'ha ajustat per a contenir 5×10^5 UFC en una única dosi de 5 µL, comprovant-se la concentració per plaqueig en plaques de BHI. Aquest inòcul s'ha determinat amb experiments pilots previs, determinant-se com a dosi òptima per a matar el 70% de les larves en 72

hores. Per a cada grup s'han recollit 30 larves sense mostres de lesions o pigmentació. S'ha inoculat cada grup mitjançant una xeringa de 50 µL (Hamilton Microliter) i s'ha incubat a 30°C a la foscor en plaques de Petri. Cada 24 hores s'ha determinat la mortalitat, corresponent a la falta de resposta al tacte i la melanització total.

Per a la representació dels resultats s'ha utilitzat corbes de Kaplan-Meier amb el software GraphPad Prism5 (GraphPad software, San Diego, CA) amb un log-rank test per a determinar la significança estadística.

3.5.6 Assaig NPN de permeabilitat de membrana

L'assaig de captació de NPN (N-fenilnaftilamina) s'ha realitzat segons s'ha descrit anteriorment, amb modificacions (168). Els cultius de nit en LB s'han subcultivat per a obtenir una DO_{600} de 0,6, corresponent a la fase exponencial mitjana. Les cèl·lules s'han recuperat centrifugant a 13000 rpm 3 minuts i resuspenent els *pellets* en buffer HEPES pH 7,2 suplementat amb CCCP. La preparació del CCCP i NPN es detalla a la secció 3.1.6. La suspensió cel·lular s'ha atemperat a 23°C durant 1 hora abans de l'assaig. La barreja de reacció ha inclòs 100 µL de suspensió bacteriana, 50 µL de NPN 40 µM (en HEPES-CCCP) i 50 µL d'EDTA 2mM (en HEPES-CCCP) i s'ha dipositat en una placa de fons pla de 96 pous immediatament abans de mesurar la fluorescència (excitació 340 nm; emissió 415 nm) en un instrument Victor V3 1420 multilabel Reader (PerkinElmer) Els valors obtinguts fins a 5 minuts s'han recuperat per a calcular la cinètica de captació de la sonda NPN. Els resultats s'expressen en unitats relatives de fluorescència. Els experiments controls s'han inclòs amb pous sense cèl·lules i pous sense EDTA.

3.5.7. Bioassaig de DSF

La determinació de la producció de DSF s'ha realitzat utilitzant la soca *Xcc 8523 pL6engGUS* (soca biosensora de DSF) com s'ha descrit prèviament (86). S'ha cultivat la soca biosensora en 10 mL de medi NYG suplementat amb 10 µg/mL de tetraciclina fins a una $DO_{600}=0,7$. Les cèl·lules s'han reconstituït en 1 mL de medi NYG fresc i s'han afegit a 99 mL de medi NYG atemperat amb 1% d'agar Noble (Difco) i suplementat amb 80 µg/mL de X-Gluc (àcid 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurònic) per a preparar les plaques del bioassaig. Les soques candidates s'han inoculat mitjançant la transferència d'una colònia fresca a la placa de bioassaig i s'ha incubat durant 24h a 28°C. La presència d'un halo blau al voltant de la colònia indica producció de DSF.

3.6. Producció de proteïnes

Per obtenir les proteïnes recombinants purificades Smlt2053 i MlaC (*smlt4673*) en el citoplasma d'*E. coli* BL21(DE3) s'ha clonat la seqüència sencera en un vector pET28b amb la seqüència His-tag a l'extrem N-terminal (oligonucleòtids llistats en la Taula Annex C). L'expressió s'ha realitzat en 2L de medi LB induït amb IPTG 1 mM durant 16 hores. Les cèl·lules es van trencar per tres rondes de sonicació (5 minuts, 0,5 seg ON/OFF potencia 2x10% i 15%) en tampó de lisi (Triton X-100 0,1%, Lisozima 4 µg/mL, DNAsa 8 µg/mL i MgCl₂ 2 mM). La proteïna soluble s'ha aconseguit centrifugant la mostra durant 45 minuts a 15000 g. La fracció soluble amb la proteïna recombinant s'ha purificat en un instrument AKTApure (GE Healthcare Life Sciences) utilitzant una columna HisTrap HP 5 mL funcionalitzada amb níquel amb els següents tampons: buffer d'unió: Imidazol 5 mM, NaCl 300 mM, Tris-HCl pH 7,9 20 mM. Buffer de rentat: Imidazol 40 mM, NaCl 300 mM, Tris-HCl pH 7,9 20 mM. Buffer d'elució: Imidazol 500 mM, NaCl 300 mM, Tris-HCl pH 7,9 20 mM. L'expressió de la proteïna s'ha realitzat al nostre laboratori i la part de purificació s'ha realitzat a la Plataforma de Purificació de Proteïnes (PPP) a les instal·lacions del grup Nanbiosis de l'IBB-MRB (UAB). Les proteïnes s'han confirmat per *peptide mass fingerprinting* al laboratori de Proteòmica de CSIC-UAB.

3.7. Assajos d'unió Proteïna-DNA

Pels assajos d'unió proteïna-DNA de la proteïna Smlt2053 s'ha seguit el mètode EMSA (*Electromobility shift assay*) descrit prèviament (169), amb modificacions. Els fragments de DNA que contenen les regions promotores dels gens diana s'han amplificat mitjançant PCR obtenint amplicons de 150-300 pb. Les reaccions d'unió s'han realitzat en tampó Tris-Glicina 10 mM – 40 mM, respectivament, KCl 20 mM, Glicerol 7,5%, BSA (Albúmina sèrica de boví) 0,01 mg/mL, 1 mM DTT i han inclòs poli (dI·dC) 20 ng/µL per evitar unions inespecífiques. Cada reacció, si no s'indica el contrari, conté 50 ng de la sonda de DNA amb la regió promotora diana i una quantitat de proteïna variable en funció de l'assaig. Pels assajos d'unió a lligand, s'han afegit els diferents FAs en concentracions variables. El mateix solvent utilitzat per a ressuspèndre cada FA s'ha utilitzat com a control. En els cassos d'unió a lligand, la reacció proteïna-DNA s'ha incubat durant 30 minuts abans d'afegir el FA a la reacció.

Les reaccions s'han incubat 30 minuts a 4°C i s'han carregat en un gel amb 6% de poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1) en tampó 0,5X TBE pH 8,3 amb glicerol 2,5%. L'electroforesi s'ha realitzat a 4°C en una cambra freda durant un mínim d'una hora a voltatge constant. Després de

l'electroforesi, s'han rentat els gels amb aigua desionitzada i s'han tenyit amb un tampó 0,5X TBE amb 1X del colorant RedSafe (Sigma-Aldrich) durant 15 minuts. Després de dos rentats amb aigua per eliminar l'excés de colorant els gels s'han visualitzat en un instrument VersaDoc Imaging System (Bio-Rad).

3.8. Àcids grassos totals en *S. maltophilia* per GC-MS

Els assajos de FAs totals en les soques de *S. maltophilia* del sistema Mla s'han fet de la següent manera: s'han preparat cultius de nit de les soques en medi LB, ajustant-se al dia següent a $DO_{600}=0,05$ en 100 mL de cultiu. S'han incubat a 37°C fins a tres punts diferents (DO_{600} de 0,8 , 1,5 i 5) i s'han recollit les cèl·lules centrifugant a 6000 rpm durant 20 minuts. S'han pesat cada una de les mostres i posteriorment s'han resuspès en 10 mL de H_2O_{MQ} . La suspensió s'ha inactivat per temperatura (100°C, 30 minuts) i després de congelar-les en nitrogen líquid s'han liofilitzat durant la nit. Per a preparar les mostres, aquestes s'han enviat al Servei de Cromatografia del Departament de Bioquímica del Research Center Borstel i s'ha utilitzat el diazometà com a solvent per a la cromatografia. S'han dissolt el àcids grassos convertits en metil-èsters en $CHCl_3$ i s'han injectat (1/100 μ L) per l'anàlisi GC/MS. Les molècules s'han identificat per GC (Agilent Technologies 6890) amb una columna Agilent 19091s-433 acoblada a un detector MS (Hewlett-Packard 5973).

3.9. Assajos d'unió de compostos-proteïna (MST i nano-DSF)

Els assajos d'unió de la proteïna MlaC (Smlt4673) a lligand (PE 14:0 i PE 16:0) s'han externalitzat a la companyia Proteros (Munich, Alemanya) per a realitzar assajos MST i nanoDSF, que permeten determinar l'estabilitat de les proteïnes mitjançant titulacions químiques desnaturalitzants (170).

Per a realitzar aquests assajos la proteïna MlaC ha estat delipidada pel laboratori de Proteòmica CSIC/UAB. Breument, MlaC s'ha diluït 1:1 amb TFA (àcid trifluoroacètic) 1% utilitzant un sistema HPLC i una columna C18 en TFA 0,1%. MlaC s'ha eluït en un gradient d'acetonitril amb TFA 0,1% i la delipidació s'ha confirmat per MALDI en una placa amb 1 mg/ml d'aminoacridina.

L'assaig MST (*MicroScale Thermophoresis*) permet determinar l'afinitat d'una molècula per a un lligand basant-se en el moviment de la proteïna marcada fluorescentment a través d'un gradient microscòpic de temperatura. Cada compost s'ha incubat amb la proteïna marcada i la mostra s'ha transferit a un instrument Monolith NT115pico® (NanoTemper Technologies) pel seu anàlisi.

MATERIALS I MÈTODES

Breument, s'ha utilitzat la proteïna a 1 μM i el kit LabelingKit RED-tris-NTA (NanoTemper) pel seu marcatge en un tampó Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 100 mM, Tween 0,05% i s'ha incubat durant 30 minuts. Després s'ha afegit cada lligand per a la determinació de la unió.

També s'ha realitzat l'assaig utilitzant la tecnologia nanoDSF (*Nano differential scanning fluorometry*) que permet mesurar l'estabilitat del complex proteïna-lligand sense cap tipus de marcatge, ja que utilitza canvis en la fluorescència dels residus de triptòfan (330-350 nm) per a determinar la temperatura de fusió de la proteïna. Això és així ja que els residus hidrofòbics de triptòfan queden exposats durant la desnaturalització i provoca canvis en la intensitat i la longitud d'ona que són detectats per l'instrument. Es monitoritza la temperatura de fusió de la proteïna al llarg d'un gradient de temperatura. La concentració de la proteïna en la reacció ha estat de 5 μM i del lligand de 100 μM . El tampó de reacció ha estat MOPS 50 mM pH 7, NaCl 100 mM i Tween 0,05%. S'ha realitzat l'assaig per triplicat en un instrument Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies).

4.RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Canvis en l'expressió gènica global a *S. maltophilia* en condicions relacionades amb QS

Un dels objectius principals d'aquesta Tesi ha estat identificar els canvis en l'expressió gènica derivats de l'acció de molècules de QS, per a aprofundir en els mecanismes cel·lulars regulats per aquests sistemes a *S. maltophilia*.

4.1.1. Canvis en l'expressió gènica dependents de la densitat poblacional

El primer pas ha estat estudiar les diferències d'expressió gènica que es donen entre les dues fases principals de creixement de *S. maltophilia*, és a dir, entre la fase del creixement bacterià exponencial mitja-tardana (5 hores), moment d'activació dels sistemes de QS, i la fase estacionària després de 24 hores de creixement, moment en el qual s'arriba al màxim de densitat cel·lular (171–173).

Per a determinar els canvis a nivell transcriptòmic entre aquestes dues fases s'ha realitzat un anàlisi *in silico* a partir dels resultats obtinguts per RNA-seq en cultius en medi LB, tal i com es detalla a la secció de mètodes. En resum, l'anàlisi d'expressió diferencial s'ha basat en comparar mostres recollides per triplicat en fase estacionària (STAT, a una $DO_{600} = 5$) i fase exponencial mitja-tardana (LOG, $DO_{600} = 1.5$) de cultius de la soca de referència K279a.

Sota aquestes condicions s'han trobat un total de 2624 gens amb expressió diferencial (DEGs), que representa un 64% del genoma de *S. maltophilia* K279a, segons la base de dades *Genome* de l'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). D'aquests, 1285 gens s'han trobat sobreexpressats en la fase estacionària, mentre que els 1339 restants s'han trobat infraexpressats, amb una distribució que es detalla a la Figura 9. El resum dels 50 DEGs més sobreexpressats i infraexpressats (d'acord amb el valor de *fold-change*) es resumeixen en la Taula Annex D i Taula Annex E, respectivament.

És destacable l'expressió de l'operó *smlt2714-smlt2712*, el més sobreexpressat en la fase estacionària sota les condicions d'aquest estudi (*fold-change* de 12, 60 i 26, respectivament). Aquest operó està implicat en la detecció i captació de ferro, segons la seva anotació, ja que *smlt2714*

RESULTATS I DISCUSSIÓ

codifica per a un receptor de tipus TonB, amb localització a la ME i amb similitud a sideròfors. El seu ortòleg a *P. syringae*, PSTPO_1284, forma part del reguloma del regulador global de ferro Fur (174)

L'operó *smlt2852-smlt2851* ha estat el segon operó més sobreexpressat (*fold-change* de 41 i 36, respectivament). L'anotació d'aquest operó indica que és un transportador d'espermidina MdtJ-MdtI (Mdt: MultiDrug Transporter). En *E. coli* s'ha reportat que participa en la resistència a detergents com SDS i a les sals biliars, en la resistència a la tetraciclina i en la formació de biofilms (175, 176)

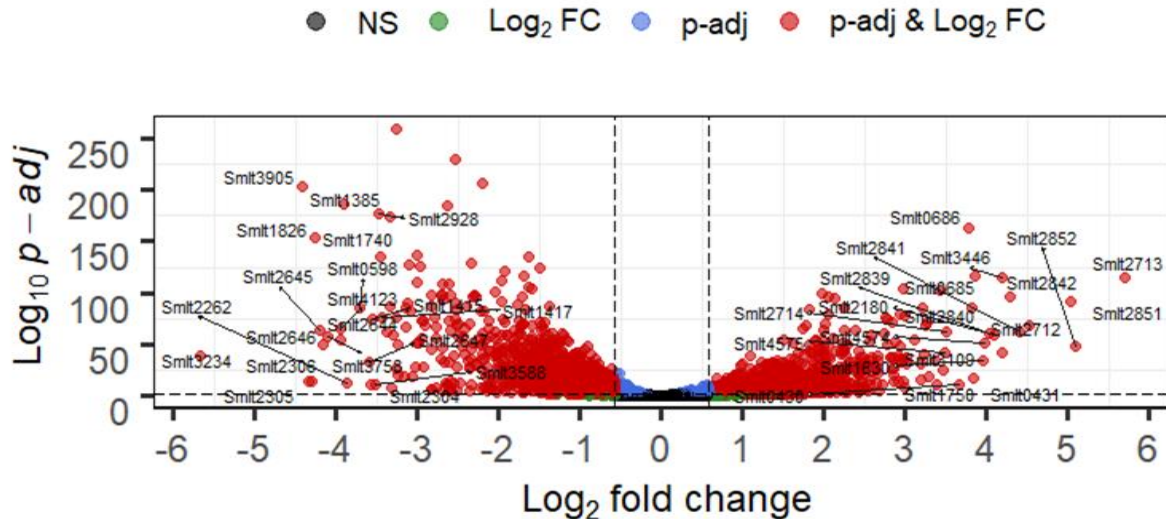


Figura 9. Resum dels resultats del RNA-Seq. Representació mitjançant un volcano plot de l'anàlisi d'expressió diferencial dels gens en la comparativa STAT vs. LOG. Els criteris d'inclusió són un valor absolut de *fold-change* $\geq 1,5$ i un *p-adj* $< 0,05$. Es mostren els locus pels 20 DEGs més sobreexpressats i infraexpressats. NS (negre) indica els gens sense significació estadística per cap dels dos criteris d'inclusió. Log₂ FC (verd) representa els gens que només són significatius pel criteri de FC, mentre que p-adj (blau) indica els gens només significatius pel criteri de p-valor ajustat. P-adj i Log₂ FC (vermell) indica els DEGs que són significatius per tots dos criteris, i per tant inclosos en anàlisis posteriors.

D'altra banda, l'operó *smlt2306-smlt2304* és el més infraexpressat en fase estacionària (*fold-change* de -44, -44 i -21, respectivament). Aquest operó codifica per tres homòlegs de FliC (177) , una proteïna filamentosa estructural del flagel i un determinant de virulència en moltes espècies bacterianes (178).

Aquests tres operons suggereixen que la regulació gènica en fase estacionària implica múltiples canvis que afecten a una gran diversitat de vies cel·lulars, posant de manifest l'adaptació de la població bacteriana a un ambient d'elevada densitat cel·lular, on la competència per la captació de nutrients arriba al seu màxim. Aquests tres exemples (captació de ferro, secreció de molècules que ajuden a la resistència a compostos externs i expressió de gens de motilitat) resumeixen alguns dels canvis que han de patir les cèl·lules per assolir aquesta adaptació.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a determinar quins processos cel·lulars es troben representats de manera diferencial en cada una de les dues fases del creixement estudiades s'ha anotat cada un dels DEGs segons les classificacions COG, KEGG i GO, que permeten una classificació i anotació filogenètica més detallada que l' anotació automàtica present en altres bases de dades.

La categoria COG amb més representació és COG-S (*Function unknown*), en la que s'han associat aproximadament un 20% dels DEGs, mentre que només un 7% del total del genoma està representat per aquesta categoria, d'acord amb la base de dades IMG (*Integrated Microbial Genomes*). Per tant, en el nostre conjunt de dades, una fracció important dels DEGs no presenten homologia amb proteïnes conegudes. Aquesta categoria, juntament amb la categoria COG-R (*General function prediction only*) s'ha eliminat de la representació gràfica ja que no aporta informació sobre la funcionalitat de la proteïna i eliminant-la s'obté una millor visualització de les categories restants (Figura 10).

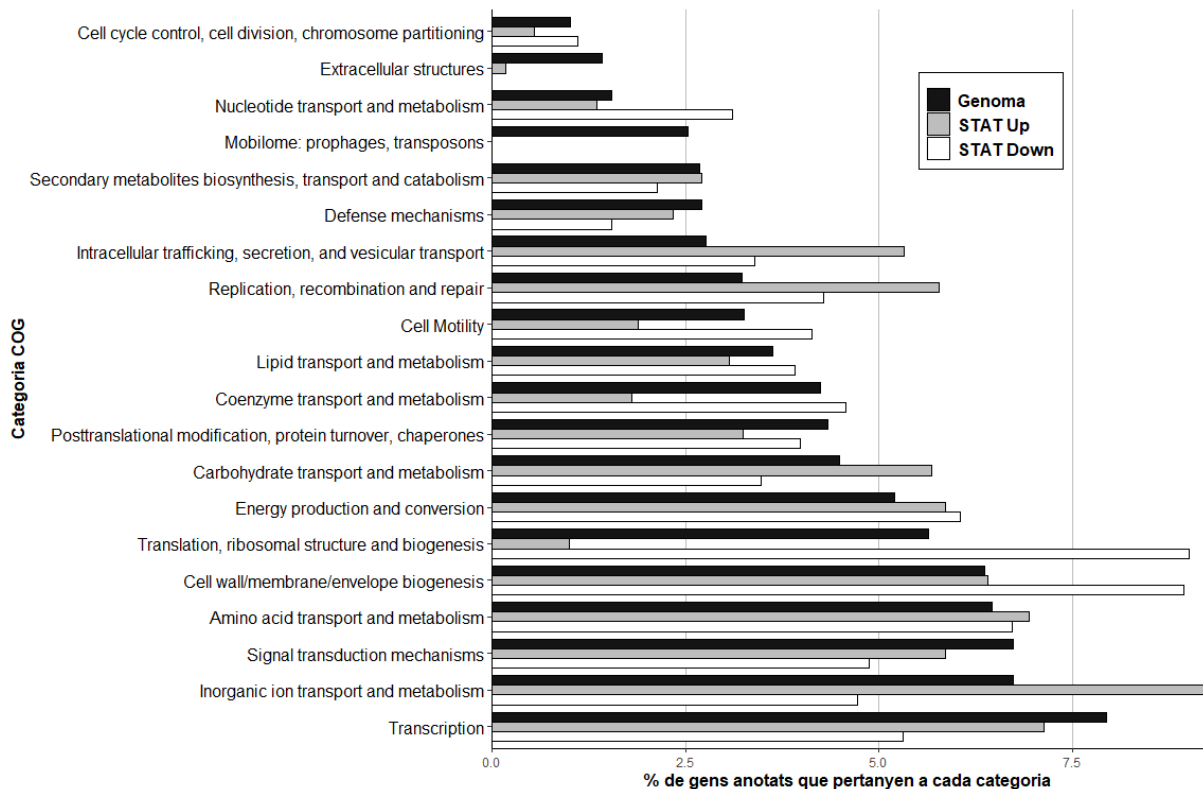


Figura 10. Classificació funcional de les categories COG dels DEGs en la comparativa STAT vs. LOG. Les categories COG es representen en l'eix Y, i el percentatge de gens que es poden associar a una categoria es representen en l'eix X. El percentatge de gens associats a cada categoria de tot el genoma de K279a s'indica en negre (d'acord a la base de dades IMG). En gris s'indiquen els valors pel conjunt de DEGs sobreexpressats en fase estacionària (STAT Up) i en blanc els valors pel conjunt de DEGs infraexpressats en la mateixa fase (STAT Down).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquesta secció proporciona una descripció general dels canvis a nivell transcriptòmic de les dues fases principals del creixement bacterià. Cal destacar que aquestes diferències reflecteixen les condicions particulars d'aquest disseny experimental, un medi ric (LB) i unes densitats cel·lulars determinades ($DO_{600} = 1.5$ i $DO_{600} = 5$), però estableixen una base a partir de la qual es poden treballar i analitzar els canvis en l'expressió global en condicions relacionades directament amb el QS en *S. maltophilia*.

Segons l'anotació COG dels DEGs, les categories més enriquides en la fase estacionària (STAT Up) han estat: COG-P (*Inorganic ion transport and metabolism*), COG-U (*Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport*) i COG-L (*Replication, recombination and repair*). Aquestes categories reflecteixen l'esforç dels cultius en estat de saturació per assegurar la disponibilitat de nutrients, així com la menor necessitat de proteïnes relacionades amb la divisió cel·lular (COG-D, *Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning*) i la síntesi proteica (COG-J, *Translation, ribosomal structure and biogenesis*).

D'altra banda, la categoria més enriquida en fase exponencial (STAT Down), a banda de COG-J que és responsable de síntesi activa de proteïnes, ha estat COG-M (*Cell wall/membrane/envelope biogenesis*). Aquesta distribució reflexa l'augment de la síntesi de material cel·lular en la fase exponencial i també un augment en vies de síntesi proteica i processos de divisió cel·lular (COG-F, *Nucleotide transport and metabolism*).

Per aprofundir en processos cel·lular més específics, s'ha realitzat un anàlisi d'enriquiment de termes de la base de dades *Gene Ontology* (GO) en els mateixos conjunts de dades. Aquest anàlisi ha implicat l'anotació funcional de tots els DEGs amb el paquet de R TopGO, tal i com es descriu en la secció de Mètodes (3.4.2).

Aquest segon anàlisi d'enriquiment reflexa un desbalanç favorable al metabolisme energètic durant la fase estacionària (Figura 11), ja que termes com *oxidation-reduction process*, *carbohydrate metabolic process* i *peptide biosynthetic process* es troben sobrerrepresentats.

Com s'ha observat amb aquest resultat, en *E. coli* els majors canvis a nivell transcripcional en condicions d'elevada densitat cel·lular també s'associen a processos cel·lulars diversos, tals com el metabolisme del nitrogen, expressió de sideròfors, resposta a estrès, expressió de gens de virulència, entre d'altres (179, 180). El mateix patró en relació a canvis metabòlics, tant en la biosíntesi d'aminoàcids com en el metabolisme lipídic es pot observar en espècies del gènere *Xanthomonas* durant la fase estacionària (181, 182)

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts en aquest experiment inicial i alguns dels DEGs que coincideixen en tots els dissenys experimentals es mencionen i discuteixen en les següents seccions.

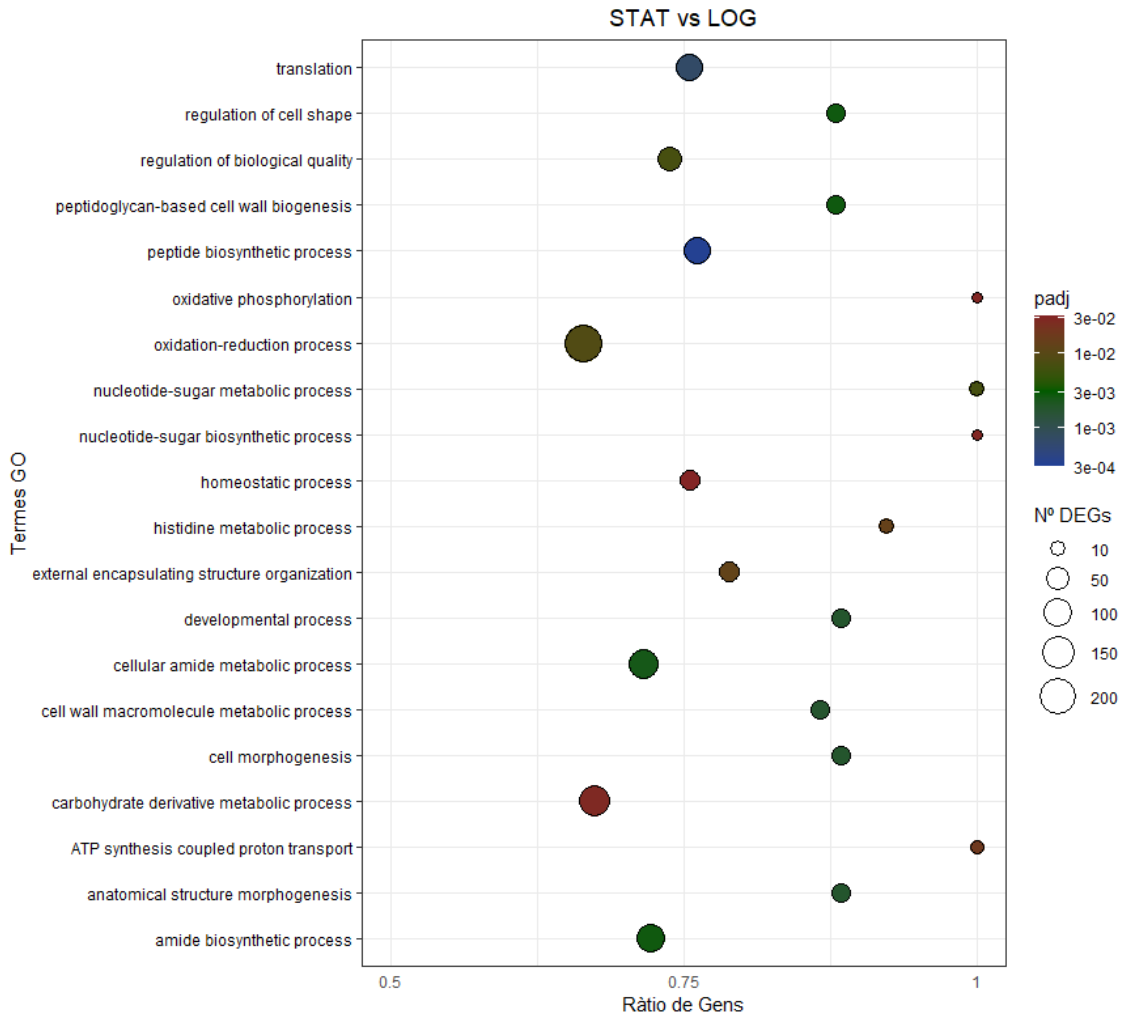


Figura 11. Enriquetament funcional de termes GO dels DEGs en fase estacionària, comparats amb els de la fase exponencial. L'eix Y indica el terme GO corresponent, mentre que l'eix X indica el ràtio de gens (nombre de termes del nostre conjunt de dades anotats en una determinada categoria respecte del total d'anotacions del genoma per a la mateixa categoria d'aquesta soca segons la base de dades QuickGO). El nombre de gens del conjunt de dades STAT que s'associen a cada categoria es representa per la mida de les bombolles, mentre que el color indica la significança de cada terme (p -valor amb una correcció hipergeomètrica de Fisher).

4.1.2. Efecte de les molècules de QS DSF i AHLs en el transcriptoma de *S. maltophilia*

Un cop obtinguts els resultats de la comparativa STAT vs. LOG i per aprofundir en el coneixement sobre la resposta a nivell transcriptòmic de *S. maltophilia* a situacions d'estrès relacionades amb el creixement, tal i com s'ha plantejat en la secció anterior, s'ha estudiat la resposta a concentracions fisiològiques de molècules Als del QS. S'han suplementat, per triplicat, cultius en fase exponencial temprana amb DSF i un a combinació d'AHLs. Els temps de recollida de mostres han estat els mateixos que pel conjunt de dades STAT de la comparativa anterior ($DO_{600}=1.5$, Figura 12A), i s'han

RESULTATS I DISCUSSIÓ

comparat amb un cultiu control suplementat amb DMSO, solvent utilitzat per a preparar les molècules Als estudiades.

L'anàlisi d'expressió diferencial ha revelat un total de 555 i 58 DEGs ($p\text{-adj} < 0,05$ i $|fold\text{-change}| \geq 1,5$) en els tractaments amb AHLs i DSF, respectivament, comparats amb el control amb DMSO (Taula 3 i Figura 12B). El llistat complet de DEGs per AHLs i DSF es troben en la Taula Annex F i la Taula Annex G, respectivament.

Taula 3. Resum de l'expressió diferencial de gens en condicions que activen els sistemes de QS.

Condicció	Total DEGs*/ Total DEGs**	Total Sobreexpressats*	Sobreexpressats > 1.5-fold**	Total Infraexpressats*	Infraexpressats > 1.5-fold**
DSF	82/58	74 (90.2%)	56 (68.3%)	8 (9.8%)	2 (2.4%)
AHLs	1421/555	594 (41.8%)	271 (19%)	827 (58.2%)	284 (20%)
STAT vs LOG	3257 / 2624	1502 (46.1%)	1285 (39.4%)	1755 (53.9%)	1339 (41.1%)

* Total DEGs ($p\text{-adj} < 0,05$)

** Total DEGs segons criteri d'inclusió ($p\text{-adj} < 0,05$ i $|fold\text{-change}| > 1,5$)

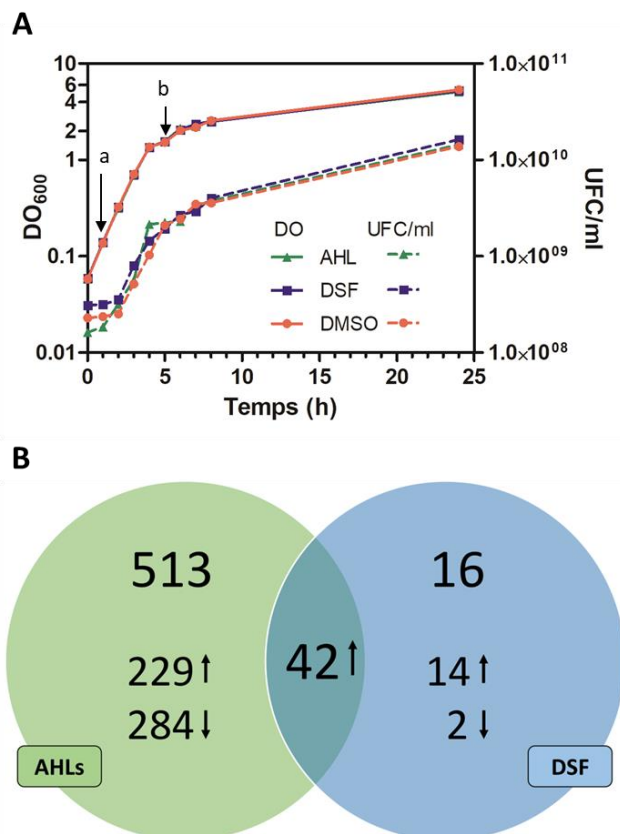


Figura 12. Disseny experimental i DEGs en els dos tractaments. (A) Corbes de creixement de *S. maltophilia* K279a en cada condició. Cultius suplementats amb DSF, AHLs o DMSO (control). Les lletres minúscules indiquen els temps de suplementació amb les senyals de QS, a l'inici de la fase exponencial (a) i de recollida de les mostres al final de la mateixa fase (b). (B) Diagrama de Venn de l'anàlisi d'expressió diferencial per als tractaments AHLs (verd) i DSF (blau) i el solapament entre tots dos conjunts de DEGs.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La inducció dels cultius amb AHLs ha resultat en 271 gens sobreexpressats i 284 infraexpressats, mentre que el DSF ha induït l'expressió de 56 gens i tan sols 2 gens s'han observat infraexpressats. Aquest resultat ha estat sorprenent, donat que el DSF és el sistema de QS principal de *S. maltophilia* i el nombre de DEGs en el tractament amb DSF és significativament baix, si ho comparem amb el tractament amb AHLs. Tot i així, es pot explicar el resultat degut a que el tractament amb AHLs d'aquest treball ha implicat una combinació de 3 molècules diferents, que podrien haver desencadenat respostes cel·lulars múltiples, i no només les estrictament relacionades amb la resposta i regulació del QS.

Els gens més sobreexpressats en tots dos tractaments coincideixen en gran mesura, un resultat interessant i que ha portat a analitzar-los amb més detall (Taula 4). Alguns d'aquests gens també s'han trobat prèviament desregulats en cultiu en fase STAT durant el disseny experimental de la secció anterior.

Taula 4. Top 10 DEGs induïts tant per AHLs com per DSF, comparats amb els perfils d'expressió (*fold-change*) en la fase STAT del creixement.

Locus ID	Expressió (<i>fold-change</i>) ^{a,b}			Descripció
	DSF	AHLs	STAT	
<i>Smlt0077</i>	7,77	7,17	3,55	Phenylalanine-4-monooxygenase
<i>Smlt2053-Smlt2051</i>	6,52	7,33	5,23	TetR regulador - Putative β -oxidation operon
<i>Smlt4591</i>	5,33	4,03	3,26	Universal stress protein
<i>Smlt2944</i>	4,88	4,29	ns ^c	Putative porin
<i>Smlt1690</i>	4,73	3,93	4,45	Coproporphyrinogen III oxidase <i>hemN</i>
<i>Smlt1574</i>	4,12	2,84	2,41	Bacteriohemerythrin
<i>Smlt2775</i>	3,79	2,81	2,9	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter
<i>Smlt0264-Smlt0268</i>	3,54	2,72	2,04	Putative β -oxidation operon
<i>Smlt1757-Smlt1758</i>	3,24	3,51	ns	C-type cytochrome - Cytochrome C
<i>Smlt3600-Smlt3601</i>	2,98	3,13	1,52	Peroxiredoxin - Bacterioferritin

^a *Fold-change* en comparació amb el control (DMSO per DSF i AHLs; LOG per a STAT).

^b En cas d'un operó, s'indica el *fold-change* del primer gen.

^c ns: no significant (no compleix el criteri d'inclusió estadístic del p-adj).

El gen amb major canvi d'expressió en el tractament amb DSF (i segon en AHLs) és *smlt0077* (*phhA*), que codifica per a una fenilalanina-4-monooxigenasa, implicada en el primer pas de la via que sintetitza L-tirosina a partir de la L-fenilalanina, amb Fe²⁺ com a cofactor. En el bacteri fitopatogen de la mateixa família *Xanthomonas citri* s'ha observat que aquest gen està regulat per DSF durant la infecció a arbres del gènere *Citrus* (183). També, el gen *phhA* s'ha observat infraexpressat en mutants de sintases d'AHLs en l'espècie fitopatògena *Burkholderia glumae*, que té sistemes de QS descrits tant de BDSF (homòleg de DSF) i AHLs (184).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

El segon gen amb major canvi d'expressió en tots dos tractaments és *smlt2053*, que codifica per un regulador de tipus TetR i que forma operó amb dos gens relacionats amb el catabolisme de lípids: *smlt2052* codifica per una enoil-CoA hidratasa i *smlt2051* per una acetil-CoA C-acetiltransferasa. En *X. campestris*, *smlt2052* està anotat com a *fadB* (Xac2013) i *smlt2051* com a *fadA* (Xac2012) i també formen operó amb un regulador de tipus TetR (Xac2014) (147). FadA i FadB són enzims responsables del catabolisme de FAs, i en *P. aeruginosa* estan regulats per l'ortòleg de Smlt2053 i Xac2014, PsrA (185), el que suggereix una via de degradació dels senyals DSF i AHL en *S. maltophilia*, donat el caràcter lipídic dels dos tipus de molècules Als. Aquest gen també s'ha trobat sobreexpressat en cultius en fase estacionària.

També en la llista dels 10 gens amb major valor de *fold-change* apareix l'operó *smlt0264-smlt0268*, implicat també en processos catabòlics de lípids i aminoàcids (discutit en seccions posteriors).

Finalment, hi ha un tercer grup de gens que es troben directament relacionats amb el metabolisme i la utilització del ferro. Els fenòmens de QS i homeòstasi del ferro es troben descrits en la literatura i aquests resultats concorden amb treballs realitzats en *P. aeruginosa* (186).

Per contra, els dos únics gens amb infraexpressió amb DSF són *smlt0605* i *smlt2502*. *Smlt0605*, anotat com a *rhIE1*, codifica per una helicasa de RNA que s'ha relacionat amb l'adaptació a baixes temperatures en *P. aeruginosa* (187). En canvi, en el grampositiu *S. aureus* la helicasa CshA, de la mateixa família que RhIE1, s'ha relacionat amb el sistema *agr* de QS (188). D'altra banda, *smlt2502* codifica per una proteïna sense funció ni identitats conegudes, tot i que presenta un domini XdhC-CoxI. Aquest domini xantin deshidrogenasa forma part del metabolisme d'aminoàcids, però no sembla tenir relació amb el DSF en altres espècies productores.

Per a facilitar la interpretació dels processos regulats diferencialment en presència d'aquests senyals de QS, s'ha seguit la mateixa estratègia que en la secció anterior. La classificació de termes COG permet determinar que els principals canvis es produeixen a nivell de metabolisme energètic, donat que en els dos tractaments (AHLs i DSF) la categoria COG-C (*Energy production and conversion*) es troba enriquida (Figura 13). També s'han observat enriquides les categories relacionades amb el metabolisme d'aminoàcids i lípids (COG-E i COG-I, respectivament). Aquests resultats suggereixen que els senyals de QS estudiats poden ser metabolitzats per *S. maltophilia*, utilitzades com a font energètica en les comunitats complexes dels seus nínxols.

S'ha observat que les AHLs en particular també afecten a la motilitat cel·lular (COG-N, *Cell motility*), a la síntesi de proteïnes (COG-J, *Translation, ribosomal structure and biogenesis*) i a la transcripció (COG-K, *Transcription*).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquests resultats en conjunt indiquen canvis generals a nivell cel·lular, prioritzant sobre el metabolisme energètic i transport de ions (que actuen com a cofactors necessaris per a molts enzims). Paral·lelament, els mecanismes de regulació de tots aquests processos també s'han observat amb canvis significatius, amb presència de molts reguladors transcripcionals en els conjunts de dades analitzades.

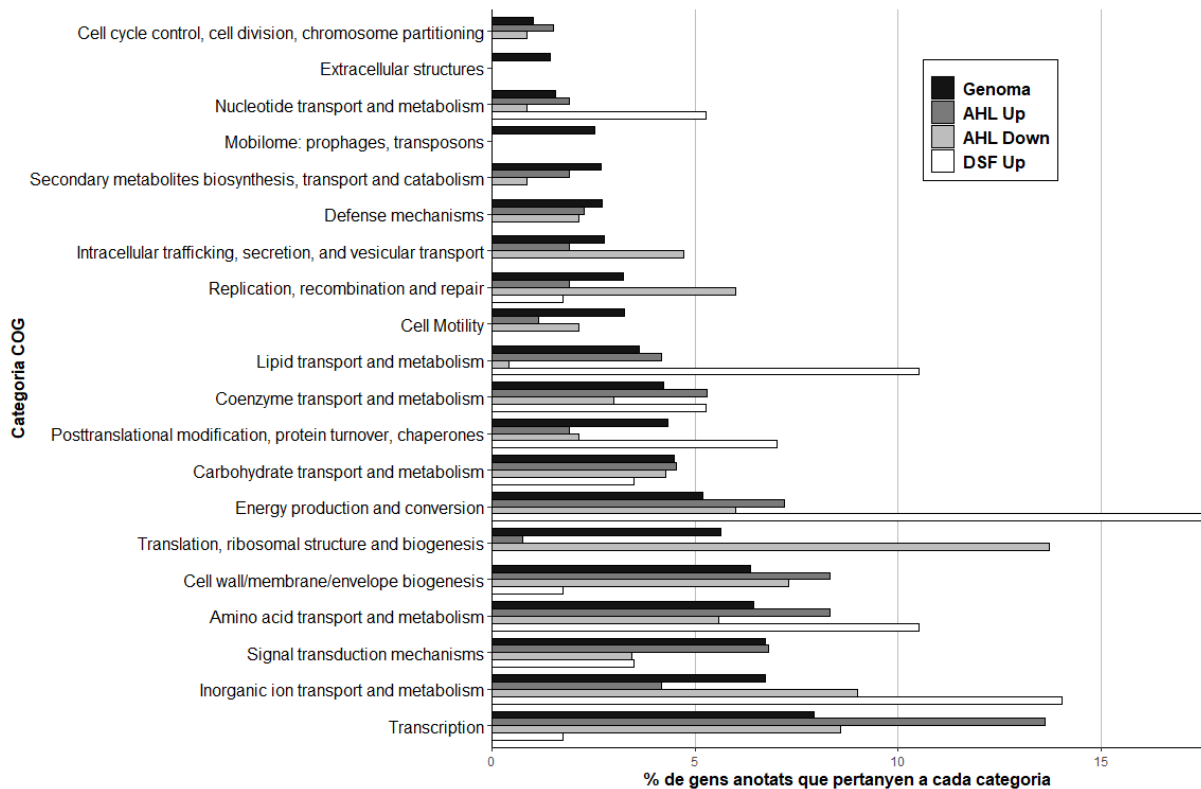


Figura 13. Classificació funcional de les categories COG dels DEGs en els tractaments AHLs i DSF. Les categories COG es representen en l'eix Y, i el percentatge de gens que es poden associar a una categoria es representen en l'eix X. El percentatge de gens associats a cada categoria de tot el genoma de K279a s'indica en negre (d'acord a la base de dades IMG). El conjunt AHL es divideix en la fracció de DEGs sobreexpressats (AHL Up, en gris fosc) i DEGs infraexpressats (AHL Down, gris clar) mentre que del conjunt DSF només es mostren els sobreexpressats (DSF Up, en blanc), en comparació amb el control de DMSO.

4.1.3. Integració entre la resposta a AHLs i DSF

L'anàlisi dels DEGs en els tractaments amb AHLs i DSF ha posat de manifest la presència dels mateixos DEGs en una fracció elevada del total per a cada condició. S'ha induït l'expressió de 42 DEGs per part de totes dues senyals, representant un 75% del DEGs sobreexpressats en presència de DSF i un 15% del total per AHLs (Figura 12B i Taula Annex H). Aquest subconjunt de dades (AHL i DSF) s'ha sotmès també a un anàlisi d'enriquiment de termes GO i s'ha observat que molts dels termes trobats per a cada conjunt individual també han aparegut enriquits en aquest subconjunt (Figura 14).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

De nou, s'han observat termes relacionats amb processos d'oxidació-reducció de compostos orgànics en aquest subconjunt comú de DEGs, pel que reforça la relació d'aquestes senyals de QS amb el metabolisme a *S. maltophilia*.

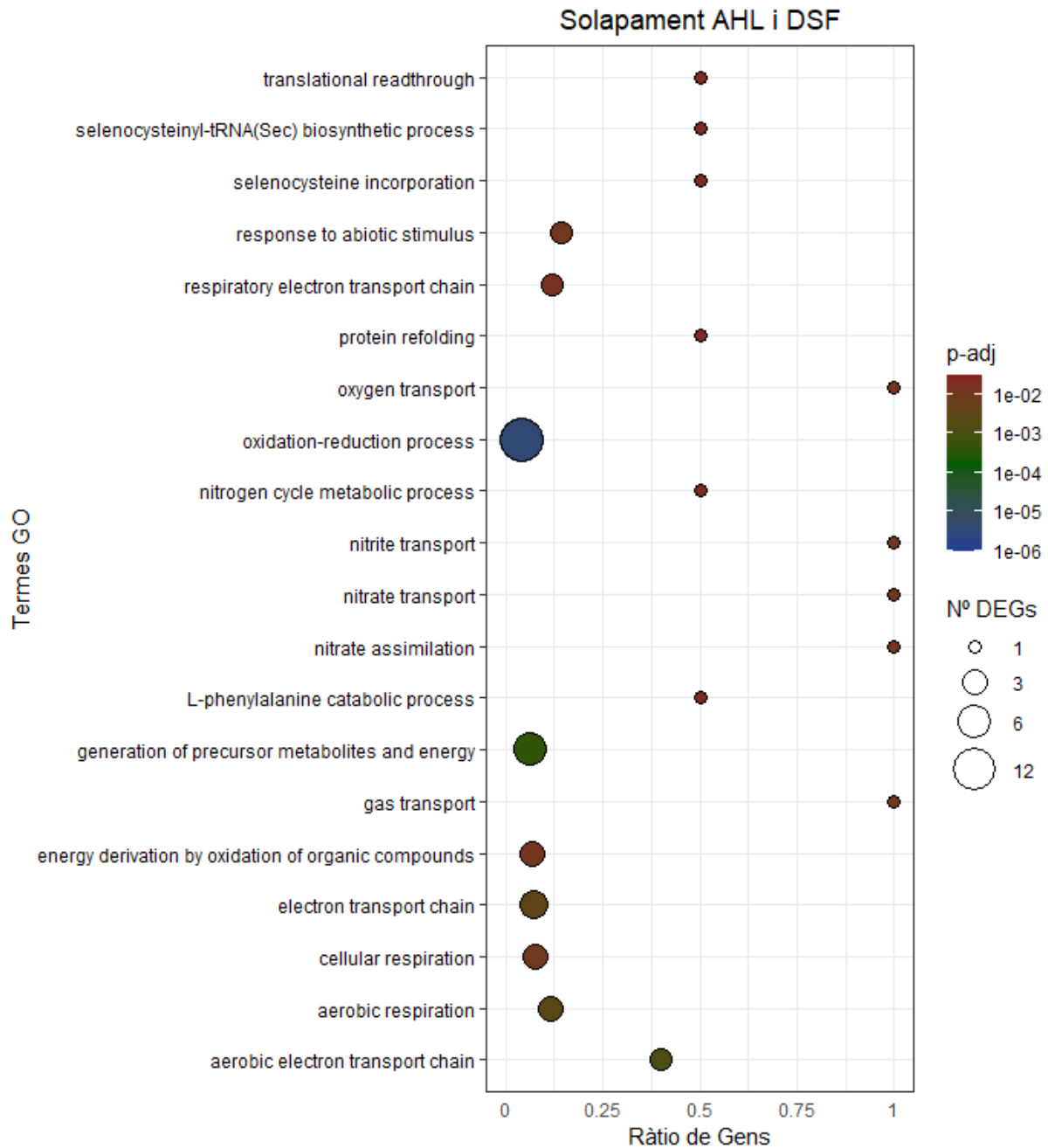


Figura 14. Enriquiment funcional de termes GO dels DEGs en comú en els tractaments amb AHLs i DSF. L'eix Y indica el terme GO corresponent, mentre que l'eix X indica el ràtio de gens (nombre de termes del nostre conjunt de dades anotats en una determinada categoria respecte del total d'anotacions del genoma per a la mateixa categoria d'aquesta soca segons la base de dades QuickGO). El nombre de gens del subconjunt comú d'AHLs i DSF que s'associen a cada categoria es representa per la mida de les bombolles, mentre que el color indica la significança de cada terme (p-valor amb una correcció hipergeomètrica de Fisher).

4.1.4. Relació del QS amb el regulador Anr

De tots el conjunt de DEGs observats, ha destacat la presència de molts gens relacionats amb la utilització del ferro i del nitrogen. A més, donat el solapament observat entre els DEGs derivats dels tractaments amb AHLs i DSF, s’ha considerat la possibilitat que alguns d’aquests gens siguin regulats per un o varis reguladors transcripcionals. Per tant, s’ha utilitzat un algoritme de la *suite* MEME com una aproximació per a identificar elements regulatoris compartits entre les regions promotores d’aquests gens. Tot i que es creia que els factors de transcripció s’unien només a l’extrem 5’ dels gens diana, actualment s’ha posat de manifest que aquesta regulació es pot donar en altres regions (189). Tot i així, en aquest treball només s’ha considerat la regió que inclou -250 pb a +50 pb del codó ATG inicial dels 50 top DEGs en cada condició. Segons aquesta aproximació l’algoritme MEME ha identificat un motiu palindròmic comú a molts d’aquests gens (Figura 15). Aquest motiu s’ha cercat a la base de dades TomTom per a trobar motius coneguts amb aquest patró. El motiu resultant, TTGAT(N₄)ATCAA, està associat al regulador Anr/Fnr (**A**naerobic **R**egulator / **F**umarate and **N**itrate **R**eduction) comú en Gammaproteobacteria, un regulador ben caracteritzat que està implicat en la regulació de factors de virulència i la resposta cel·lular a la baixa disponibilitat d’oxigen (190).

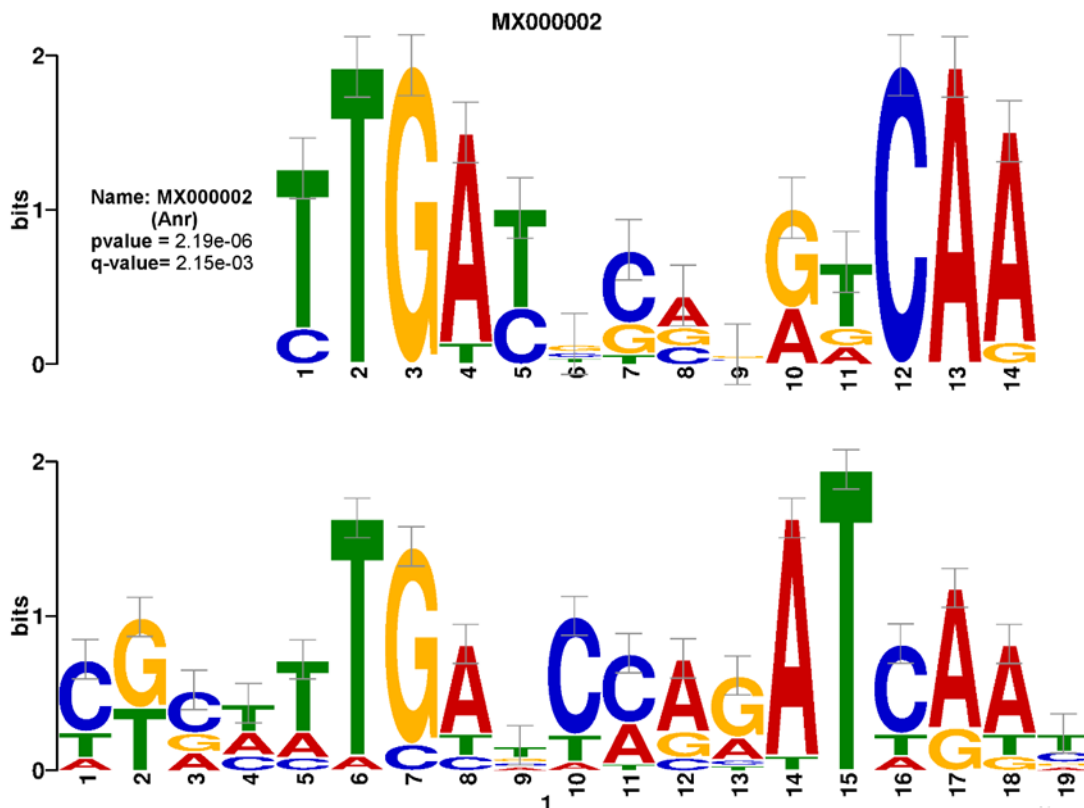


Figura 15. Anàlisi de motius d’unió a DNA mitjançant la *suite* MEME. Dels top 50 DEGs de cada condició s’ha extret la regió que inclou de -250 pb a +50 pb de l’ATG inicial i s’ha sotmès a anàlisi (motiu inferior). Després s’ha comparat amb la base de dades TomTom que inclou motius coneguts i el resultat s’indica en el motiu superior.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En les espècies del gènere *Pseudomonas*, Anr és conegut per regular vies relacionades amb la producció d'energia i una diversitat de funcions metabòliques, tals com la biosíntesi de citocroms, resistència a l'estrès oxidatiu, formació de biofilm i QS, entre d'altres (191–193). *S. maltophilia* K279a codifica per a dos homòlegs d'Anr: Fnr1 (*smlt2159*) i Fnr2 (*smlt2767*), el que suggereix la capacitat d'aquesta soca de créixer en condicions de baixa disponibilitat d'oxigen (152). Fnr1 és homòleg del regulador FixK de representants de la classe Alphaproteobacteria, on té un paper important en la fixació del nitrogen (194).

Del llistat de DEGs que presenten un motiu d'unió d'Anr (Taula 5), destaquen gens relacionats amb el metabolisme del ferro i el nitrogen, tal i com es descriu per a altres espècies. La bacteriohemeritrina Smlt1574 és ortòloga de PA1673 (gen *mhr*, *microoxic hemerythrin*) de la soca *P. aeruginosa* PAO1, amb una identitat a nivell de seqüència del 64%. En un treball en soques deficientes del regulador d'Ahls en la soca PAO1, LasR, s'observa un augment de l'activitat Anr i dels gens que regula, com és el cas de la hemeritrina Mhr (195). Smlt1690 (*hemN*) és un altre gen que s'ha descrit en *Pseudomonas* com a part del reguloma d'Anr, sobreexpressat en ambients pobres en oxigen (193).

Taula 5. DEGs amb el motiu d'unió a Anr. S'inclou la descripció del gen, el motiu, la localització respecte l'ATG inicial i el *fold-change* en cada un dels dos tractaments, en comparació amb el control amb DMSO.

Locus ID	Descripció	Motiu	Posició des de l'ATG inicial	<i>Fold-change</i>	
				AHL	DSF
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	TTGATccagATCAA	-75	2,55	3,84
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	TTGATccagATCAA	-110	2,28	ns
Smlt1690	HemN (coproporphyrinogen III oxidase)	TTGATccagATCAA	-65	3,32	4,53
Smlt1758	AdhB, Cytochrome C	TTGATccggATCAA	-48	3,25	2,57
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	TTGATctggATCAA	-104	1,67	2,27
Smlt3805	OmpW family protein	TTGATccggATCAA	-74	2,11	2,69
Smlt0055	Pseudogene (AdhP, Alcohol dehydrogenase)	TTGATcgtgATCAA	-71	2,46	3,03
Smlt2431	Hypothetical	TTGATcctgATCAA	-123	ns	ns
Smlt4052	MltB, lytic murein transglycolase B	TTGATcttgATCAA	-348	-1,15	ns
Smlt4591	Universal stress protein	TTGATtctgCTCAA	-82	3,32	4,86
Smlt3600	Peroxiredoxin	CTGATcctgGCCAA	-156	2,97	2,91
Smlt2137	Universal stress protein	TTGATccgaATCAC	-100	2,46	2,00
Smlt0076	Hypothetical (Immunity protein 26)	TTGATcaaaATTGA	-118	2,00	2,68
Smlt3732	ATP-dependent chaperone ClpB	CTGATcgggATCAA	-162	1,68	2,03
Smlt2180	Glycoside hydrolase family 92 protein	TCGATctaaATTCA	-136	2,57	2,66
Smlt0615	YdcH family protein	GTAActccgATCGA	+121	ns	2,97

Aquests resultats indiquen una inducció de la resposta a microòxia en presència de senyals de QS exògenes a *S. maltophilia*.

4.1.5. Reguloma de SmoR

En estudis previs en *S. maltophilia* es va caracteritzar el regulador de tipus LuxR *solo* SmoR (*smlt1839*), demostrant la seva capacitat de detectar i unir-se a AHLs *in vitro*, concretament la 3-oxo-C8-HSL (115).

Per a aprofundir en el paper del regulador SmoR en aquesta espècie, s'ha utilitzat un mutant d'aquest gen en la soca K279a (*K279aΔsmoR*) i s'ha realitzat un anàlisi transcriptòmic comparant-lo amb la soca K279a salvatge.

Estudis similars en d'altres espècies amb reguladors de tipus LuxR han mostrat que aquests reguladors controlen un nombre limitat de gens, amb resultats variables (196, 197).

En les condicions estudiades, s'ha observat que SmoR està implicat en la regulació de 465 gens. En el mutant *K279aΔsmoR* s'han detectat 126 gens infraexpressats, mentre que els 339 gens restants s'han identificat com a sobreexpressats. El llistat complet dels DEGs es troba en la Taula Annex I.

Com a gen més infraexpressat en el mutant *K279aΔsmoR* s'ha identificat la bacteriohemeritrina *Smlt1574*, ja descrita en seccions anteriors. De manera interessant, el regulador transcripcional *Smlt2053* també s'ha detectat infraexpressat en *K279aΔsmoR*.

Per entendre en quins processos globals pot estar implicat el regulador SmoR s'ha associat cada DEG a una categoria COG (Figura 16). Les categories COG més representades entre els DEGs de *K279aΔsmoR*, en comparació amb la representació del genoma de K279a, són les següents: COG-P (*Inorganic ion transport and metabolism*), COG-T (*Signal transduction mechanisms*), COG-M (*Cell wall/membrane/envelope biogenesis*) i COG-G (*Carbohydrate transport and metabolism*). Per contra, les categories més representades en absència de SmoR en comparació amb el genoma són: COG-K (*Transcription*), COG-C (*Energy production and conversion*).

Per completar l'anàlisi funcional també s'han estudiat les classificacions GO i KEGG, mitjançant les eines TopGO (Taula Annex J) i KOBAS-i (Taula Annex K), respectivament. S'observa un enriquiment significatiu de vies del metabolisme de carbohidrats, lípids i aminoàcids, amb una presència important de gens relacionats amb la captació i transport de ferro, associats especialment al metabolisme del nitrogen. També apareixen termes relacionats amb la resistència a antimicrobians,

RESULTATS I DISCUSSIÓ

com el terme GO:0016999 (*Antibiotic metabolic process*) i el terme KEGG smI01503 (*Cationic antimicrobial peptide resistance*), indicant novament que l'efecte de senyals exògenes de QS i el regulador d'AHLS SmoR implica la regulació de diferents processos cel·lulars.

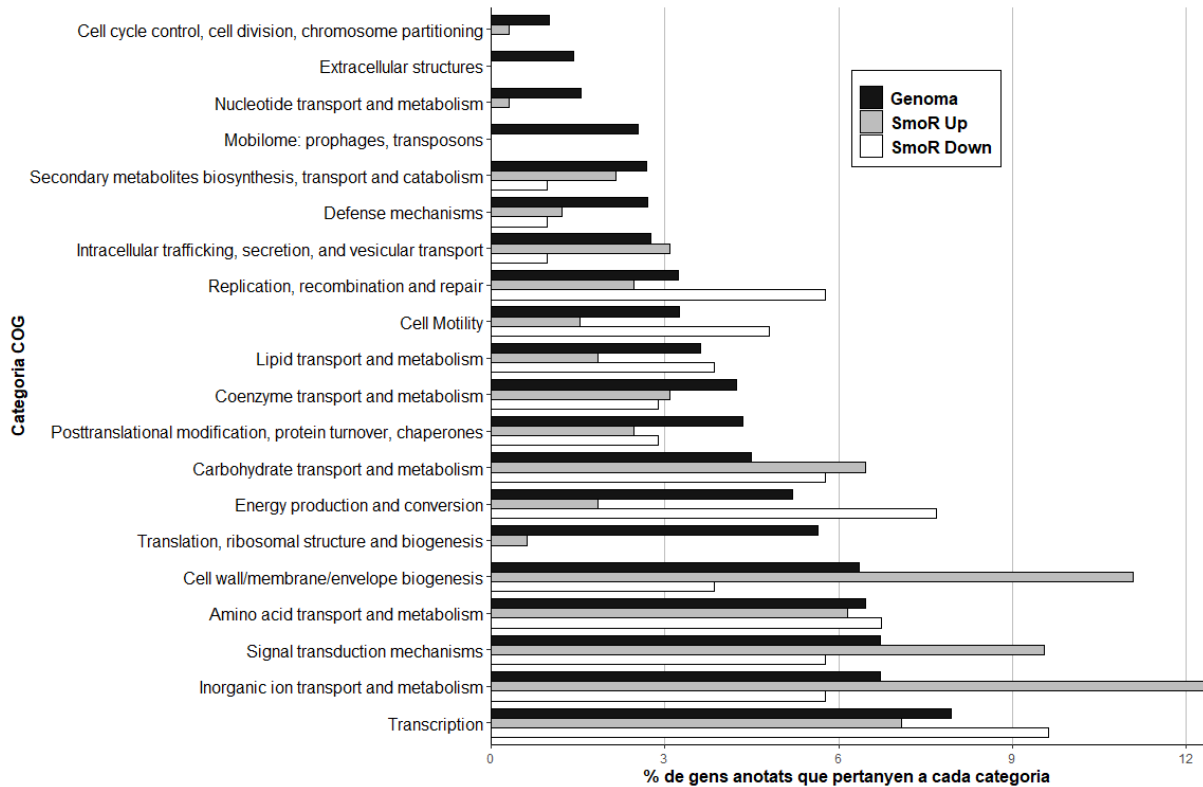


Figura 16. Classificació funcional de les categories COG dels DEGs en la comparativa K279aΔsmoR vs. K279a WT. Les categories COG es representen en l'eix Y, i el percentatge de gens que es poden associar a una categoria es representen en l'eix X. El percentatge de gens associats a cada categoria de tot el genoma de K279a s'indica en negre (d'acord a la base de dades IMG). En gris s'indiquen els valors pel conjunt de DEGs sobreexpressat en el mutant K279aΔsmoR (SmoR Up) i en blanc els valor pel conjunt de DEGs infraexpressats (SmoR Down).

Revisant el llistat de DEGs, s'ha detectat que molts dels gens sobreexpressat en els anàlisis anteriors (STAT vs LOG, AHL i DSF) apareixen en aquest anàlisi com a infraexpressats. Els 86 DEGs compartits entre els conjunts AHL i SmoR representen un 16% i un 19% del total de DEGs de cada conjunt, respectivament.

Tal i com s'ha fet per a detectar el solapament de DEGs pels tractaments d'AHLS i DSF, s'ha incorporat a la comparativa el conjunt de dades d'aquest anàlisi SmoR (Taula Annex L i Figura 17). L'anàlisi d'enriquiment mitjançant la classificació de termes KEGG ratifica la implicació de SmoR en la regulació del metabolisme de lípids i aminoàcids (Taula 6).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

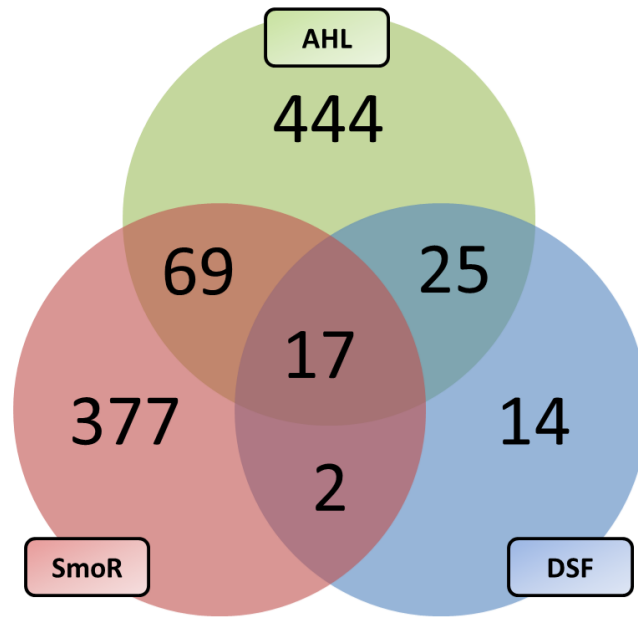


Figura 17. Diagrama de Venn dels conjunts de dades derivats dels RNA-Seq de: AHL vs DMSO, DSF vs DMSO i $\Delta smoR$ vs wt, indicant els conjunts de DEGs que se solapen entre dos o més grups.

Taula 6. Anàlisi d'enriquiment de termes KEGG dels DEGs comuns en presència d'AHLS i en absència del regulador SmoR.

Terme KEGG	ID KEGG	Input	Background	p-valor
Nitrogen metabolism	sml00910	4	12	0,0001
Glycerolipid metabolism	sml00561	2	7	0,0105
Biosynthesis of amino acids	sml01230	6	102	0,0123
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	sml00250	3	26	0,0145
Valine, leucine and isoleucine degradation	sml00280	2	20	0,0581

D'una banda, la categoria més significativa és "metabolisme del nitrogen", que inclou quatre representants del conjunt de dades: *smlt0151* (*glnA*), *smlt2775* (*narK*), *smlt0109* (*gltB*) i *smlt0108* (*gltD*).

La proteïna NarK actua com a un antiporter de nitrat/nitrit i s'expressa de forma elevada durant el creixement anaeròbic en presència de nitrat. Actua com a captador de nitrat, com a acceptor d'electrons en la respiració anaeròbia, i també allibera el nitrit com a producte de la respiració (198). GlnA és la sintasa de glutamina, a partir del glutamat i l'amoni, i té un paper clau en el metabolisme del nitrogen, ja que la concentració intracel·lular de glutamina és una dels principals senyals per a la regulació de la disponibilitat de nitrogen i permet l'assimilació d'amoni per a la biosíntesi d'alguns aminoàcids (199). L'operó *gltB-gltD* codifica per la sintasa de glutamat (són dues subunitats) a partir de glutamina, una de les dues vies de síntesi d'aquest aminoàcid.

Com s'ha observat prèviament amb canvis en l'expressió de gens regulats per Anr, activat en estats de baixa disponibilitat d'oxigen, sembla que el QS també té un paper activador sobre el metabolisme

RESULTATS I DISCUSSIÓ

del nitrogen, indicant que les senyals de QS en *S. maltophilia* poden induir l'activació de sistemes d'estrès en condicions de baixa disponibilitat d'oxigen i activant el metabolisme del nitrogen.

4.1.6. Homeòstasi del ferro en el mutant de SmoR

Entre els gens amb expressió més incrementada en la soca K279aΔ*smoR* s'han observat molt DEGs relacionats amb el metabolisme del ferro (Taula 7). Per exemple, l'operó *smlt2714-2712* està implicat en la detecció i captació de ferro. *Smlt2714* està anotat com a receptor dependent de TonB de tipus FecA, mentre que les proteïnes *Smlt2712* i *Smlt2713* s'ubiquen a la membrana externa i a l'espai extracel·lular, respectivament. Aquestes estarien encarregades de la detecció i transport del ferro a l'interior cel·lular.

Taula 7. Gens relacionats amb el metabolisme del ferro sobreexpressats en K279aΔ*smoR*.

Locus	Anotació	FC*	Regulat per Fur**
Smlt1144c	BfrA, exogenous ferric siderophore	2,04	Sí
Smlt1145	Transmembrane protein	2,04	Sí
Smlt1426	FepA, TonB-dependent OMP	2,04	Sí
Smlt1446	TonB-dependent OMP receptor	2,15	No
Smlt1820	TonB-dependent OMP receptor	2,15	No
Smlt2355	ABC transporter substrate-binding protein	2,02	No
Smlt2356	FepD/FepG, inner membrane protein	2,07	No
Smlt2357	FepC, cytoplasmic protein	2,17	No
Smlt2666	FecA2, TonB-dependent receptor	2,08	Sí
Smlt2712	Outer membrane protein	3,15	No
Smlt2713	Extracellular protein	6,3	No
Smlt2714	FecA-like TonB-dependent receptor	3,3	No
Smlt2850	FecA, TonB-dependent extracellular heme-binding protein	2,41	Sí
Smlt2937	FecA4, TonB-dependent receptor	2,28	Sí
Smlt2938	Iron regulated lipoprotein	2,42	Sí
Smlt2939	Energy transducer TonB	2,37	Sí
Smlt3022	FhuA, TonB-dependent siderophore receptor	2,16	Sí
Smlt3094	Energy transducer TonB	2,7	No
Smlt3999	FhuE, TonB-dependent siderophore receptor	2,13	Sí

*FC: Fold-change.

** Segons el treball de Kalidasan et al. (200).

Molts d'aquests gens estan descrits com a part del reguloma de *Fur* (*ferric uptake receptor*), codificat per *smlt1986*, que regula l'homeostasi del ferro, l'estrès oxidatiu i la virulència en molts bacteris gramnegatius (200).

Cal destacar que molts dels enzims que han aparegut en els RNA-Seq previs, relacionats amb el metabolisme de lípids, aminoàcids, oxigen i nitrogen, utilitzen el ferro com a cofactor, pel que el que s'observa en el mutant SmoR és una conseqüència de l'activació de sistemes i vies responsables de la captació de nutrients en condicions d'estrès com les induïdes per QS.

4.2. Caracterització del regulador de tipus TetR Smlt2053 en resposta a senyals relacionades amb el QS

Després de realitzar els assajos de transcriptòmica en situacions relacionades amb QS, aquest treball s'ha centrat en estudiar el regulador Smlt2053, donat els canvis observats en la seva expressió en totes les condicions estudiades. Aquest regulador que forma operó amb dos gens relacionats amb el catabolisme de lípids ha aparegut sobreexpressat en fase estacionària i en presència tant d'AHLs com DSF. Per contra, la seva expressió en el mutant del regulador SmoR s'ha vist reduïda. Aquest regulador està anotat com a *putative TetR-like regulator*, pel que s'ha hipotetitzat que podria actuar com a un regulador citoplasmàtic de la resposta global a QS en *S. maltophilia*.

4.2.1. Identificació del motiu d'unió al DNA

El primer pas per a la caracterització d'aquest regulador ha estat analitzar el seu context genòmic. Primerament, s'han cercat ortòlegs en espècies relacionades per tal de determinar alguna de les seves funcions biològiques. Per a tal objectiu, s'ha realitzat una cerca mitjançant l'eina BLASTp, resultant en una identitat elevada amb el regulador PsaA (PA3006) de *P. aeruginosa* PAO1. A nivell de seqüència, la proteïna Smlt2053 presenta un 36% d'identitat amb PsaA. També presenta una identitat alta amb proteïnes de les espècies més properes del gènere *Xanthomonas*: un 89% a nivell d'aminoàcids amb XAC2014 de *Xanthomonas citri* (Figura 18A). L'homologia observada entre les tres proteïnes està restringida principalment al domini N-terminal, regió que correspon amb el domini d'unió al DNA (189).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En *P. aeruginosa* PAO1, PsrA no forma operó amb cap altre gen, mentre que l'organització en *X. citri* i *S. maltophilia* és idèntica, on es troba formant operó amb dos gens addicionals: una enoil-CoA hidratasa (*XAC2013/Smlt2052*) i una acetil-CoA C-aciltransferasa (*XAC2012/Smlt2051*). Això suggereix una evolució diferent d'aquest regulador en espècies de la família *Xanthomonadaceae* (Figura 18B).

A més, la seqüència de reconeixement de PsrA en *P. aeruginosa* PAO1 s'ha determinat com a (G/C) AAAC(N₂₋₄)GTTT(G/C) (201). De manera notable, tant els reguladors Smlt2053 com XAC2014 presenten la mateixa seqüència de reconeixement del DNA, i la posició respecte al codó ATG inicial és similar en tots tres casos (Figura 18C).

Per tant, la seqüència similar de l'extrem N-terminal observada en els tres reguladors, així com les seqüències palindròmiques idèntiques de la regió reguladora suggereix que les tres proteïnes s'uneixen a la seva pròpia regió reguladora, tal i com es reporta per a PsrA (201, 202).

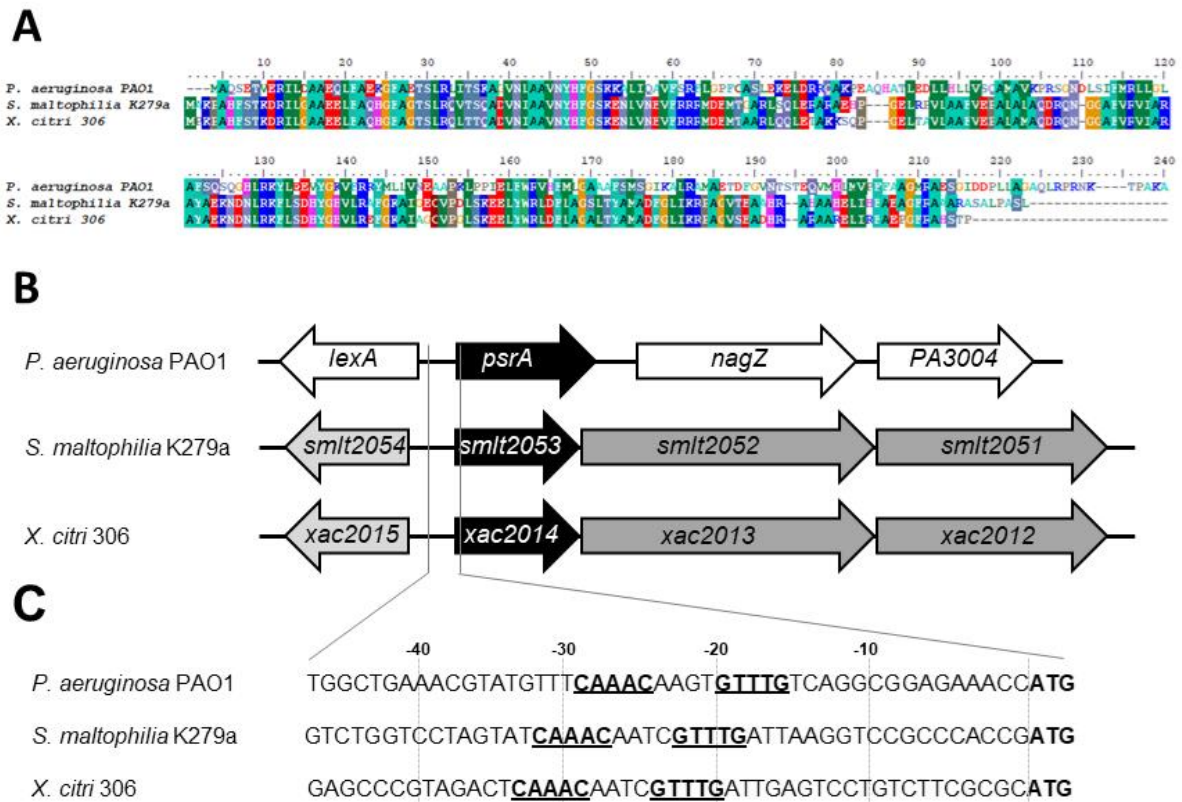


Figura 18. (A) Alineament de les proteïnes PsrA (*P. aeruginosa* PAO1), XAC2014 (*X. citri* 306) i Smlt2053 (*S. maltophilia* K279a). (B) Context genòmic de diversos reguladors de tipus TetR ortòlegs de Smlt2053. (C) Seqüències de la regió reguladora dels diversos reguladors mostrant la caixa hipotètica d'unió al DNA.

Aquests resultats inicials ens han motivat a estudiar l'activitat autoreguladora de Smlt2053, així com el paper que pot tenir en altres gens induïts per senyals de QS. Per aquest motiu, s'ha generat un mutant *knockout* per *smlt2053* en la soca K279a. Mitjançant un anàlisi per qRT-PCR entre la soca

RESULTATS I DISCUSSIÓ

salvatge (K279a wt) i la soca mutant (K279a Δ *smlt2053*) s'ha determinat l'expressió de diferents gens: *smlt2052*, el qual forma operó amb *smlt2053*; i *smlt0264* i *smlt2944*. Aquests dos darrers gens presenten patrons d'expressió similars a *smlt2053* en els estudis de transcriptòmica realitzats en la secció 4.1, el que ens ha fet pensar que poden estar regulats també per Smlt2053. Tant *smlt2053*, com *smlt0264* i *smlt2944* s'han observat entre els 10 DEGs més sobreexpressats en presència de tant DSF com AHLs.

L'absència de *smlt2053* ha resultat en un augment significatiu de l'expressió del gen adjacent *smlt2052* si es compara amb l'expressió en la soca salvatge, indicant una activitat repressora de Smlt2053 sobre l'expressió del seu propi operó, i validant l'organització com a operó dels gens *smlt2053-smlt2051*.

D'altra banda, no s'han observat diferències d'expressió significatives per als gens *smlt0264* i *smlt2944*, suggerint que la seva regulació pot anar per a una via diferent a la de Smlt2053 (Figura 19). Tot i així, per *smlt2944* s'observen lleugers canvis d'expressió, però no significatius.

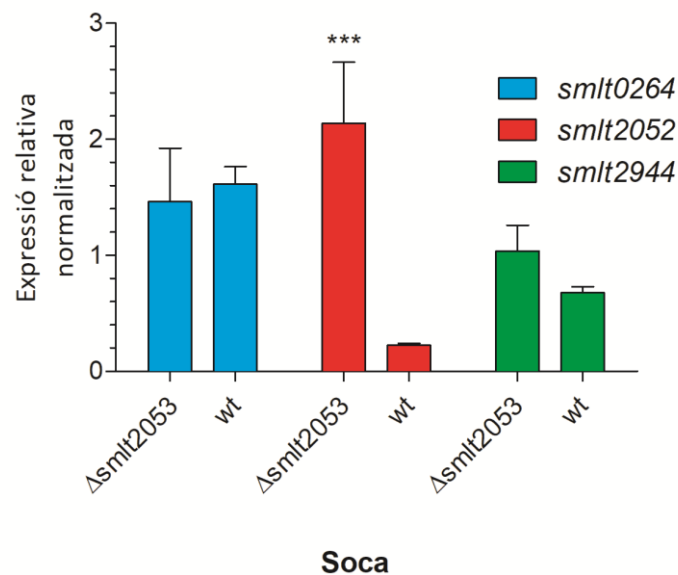


Figura 19. Expressió dels gens *smlt2052*, *smlt0264* i *smlt2944* en *S. maltophilia* K279a Δ *smlt2053* i la soca salvatge (wt) normalitzada pel gen housekeeping *rpoD*

Tenint en compte que PsrA funciona com un regulador clau de la fisiologia global de *P. aeruginosa* i que tant PsrA com Smlt2053 comparteixen el mateix motiu d'unió al DNA, s'han cercat candidats a motiu de reconeixement per PsrA en el genoma de *S. maltophilia* K279a utilitzant l'eina de cerca de la base de dades ProDoric. S'han observat diferents motius idèntics o amb alt grau de semblança al motiu prèviament identificat, en diferents localitzacions respecte a la seqüència del gen (Taula 8). Per exemple, el gen *smlt0198*, que codifica per una flavoproteïna B de transferència d'electrons ja s'havia identificat com a gen regulat per PsrA en la fase estacionària del creixement (201). Tot i així, la gran

RESULTATS I DISCUSSIÓ

majoria de gens obtinguts en *S. maltophilia* no encaixen amb els que s'han descrit prèviament a *P. aeruginosa*, suggerint de nou que Smlt2053 pot tenir funcions regulatòries diferents a les de PsrA.

Taula 8. Llistat de gens que presenten el motiu d'unió al DNA semblant al de PsrA/Smlt2053.

Locus ID	Descripció	Seqüència del motiu	Distància a l'ATG inicial
X = 5*			
Smlt0928	30S Ribosomal Protein S13 RpsM	GAAACcattgGTTTC	-121
Smlt1169	Uncharacterized	GAAACctggtGTTTG	+14
Smlt1861	Uncharacterized	GAAACcatgcGTTTG	+9
Smlt2488	RecB-like nuclease	GAAACgtggcGTTTG	+603
Smlt3340	TonB dependent receptor	GAAACcgcttGTTTC	-139
Smlt1974	Uncharacterized	CAAACgtacGTTTG	+110
X = 4			
Smlt2053	TetR/AcrR transcriptional regulator	CAAACaatcGTTTG	-32
Smlt0719	Uncharacterized	CAAACtggGTTTG	+138
Smlt0198	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	CAAACaaccGTTTC	-81
Smlt4049	Lipid A deacylase LpxR	GAAACcgaaGTTTG	+404
X = 3			
Smlt4589	DNA Polymerase I PolA	GAAACcctGTTTG	+2434
Smlt3371	MerR family transcriptional regulator	GAAACcgaGTTTC	+115
Smlt_t52	tRNA-Phe	GAAACcggGTTTG	-82
Smlt3346	Cysteine S-methyltransferase	GAAACggaGTTTC	-43
Smlt3170	Efflux RND transporter SmeG	CAAACagcGTTTC	-144
Smlt3085	Uncharacterized	GAAACgtgGTTTC	-309
Smlt2714	TonB-dependent receptor	GAAACaccGTTTC	-83
Smlt1243	Uncharacterized	CAAACcttGTTTC	+138
Smlt0297	Nucleotide-binding protein	CAAACcgtGTTTG	-141
X = 2			
Smlt3581	Amino acid permease	GAAACcgGTTTC	-154
Smlt2577	Excinuclease ABC subunit UvrA	CAAACggGTTTC	+834
Smlt2079	Uncharacterized	CAAACccGTTTG	-62
Smlt0608	Fumarylacetoacetate hydrolase	GAAACTtGTTTG	-35
Smlt1980	Uncharacterized	GTTTGctCAAAC	-66
X = 1			
Smlt2450	Helix-turn-helix transcriptional regulator	CAAACtGTTTG	-820
Smlt3201	Uncharacterized	CAAACcGTTTG	-66
Smlt2012	Protein translocase subunit SecF	GAAACaGTTTC	+3
Smlt3551	Signal peptidase I LepB	GAAACtGTTTG	+2
X = 0			
Smlt2913	Helix-turn-helix transcriptional regulator	GAAACGTTTC	-170
Smlt0339	DUF3011 domain-containing protein	GAAACGTTTC	+173
SMLT_RS23350	Uncharacterized	GAAACGTTTG	+171
Smlt1111	Ribosome-associated translation inhibitor RaiA	GAAACGTTTG	+10
SMLT_RS23155	Uncharacterized	CAAACGTTTG	+18

* On X és el nombre de nucleòtids de separació entre els palíndroms del motiu G/CAAAC(N_x)GTTTG/C.

Aquestes diferències entre PsrA i Smlt2053 correlacionen amb l'ús de FAs diferents entre totes dues espècies i també diferències en la seva fisiologia.

S'ha cercat aquest motiu en les seqüències reguladores de *smlt0264* i *smlt2944*, sense observar la seva presència. Tot i així, a la posició -330 pb respecte el codó ATG inicial del gen *smlt2944* s'ha identificat una caixa Smlt2053 degenerada, de la forma CAAAC-(N₈)-CTTTG, que podria servir de lloc d'unió al regulador Smlt2053 i que explicaria les lleugeres variacions de l'expressió observades per qRT-PCR (Figura 19).

4.2.2. Efectes fenotípics associats al regulador Smlt2053

Per a seguir aprofundint en el paper de Smlt2053 en la fisiologia de *S. maltophilia* s'ha realitzat una caracterització fenotípica d'un mutant per a aquest regulador (K279aΔ*smlt2053*).

El primer fenotip en estudiar-se ha estat el biofilm, donada l'elevada capacitat formadora de biofilm de *S. maltophilia*, la seva relació amb el QS i la rellevància clínica d'aquest. En assajos de formació de biofilm en placa de poliestirè de 96 pous s'ha observat que el mutant per *smlt2053* veu reduïda la capacitat de formar biofilm *in vitro* (Figura 20A). El mutant K279aΔ*smlt2053* s'ha complementat extracromosòmicament per observar si aquest fenotip es reverteix i, tot i que no és significatiu, s'observa un augment de la formació de biofilm. En canvi, la soca wt suplementada amb una còpia extra de *smlt2053* (wt/*smlt2053*) en un plasmidi replicatiu (de la sèrie pBBR1) produeix l'efecte contrari, augmentant significativament la formació de biofilm. La interpretació d'aquest resultat no és senzilla tenint en compte que Smlt2053 és un regulador transcripcional. Donat que la formació de biofilm és un procés multifactorial i no depenent de reguladors únics, és probable que els resultats observats es trobin afectats per a la diferent capacitat d'utilització d'àcids grassos durant el creixement bacterià, afectant a la motilitat i a l'adherència a superfícies. Tot i així, el regulador PsrA de *P. aeruginosa* s'ha demostrat que és deficient en la formació de biofilm, encara que la metodologia utilitzada en aquest treball ha estat diferent (203).

D'altra banda, també s'ha estudiat la virulència en el model de larves de *G. mellonella*, donat que PsrA s'ha caracteritzat com a un regulador de la virulència en *P. aeruginosa*, a través de la regulació de diversos factors de virulència i de la síntesi de pèptids de resistència (203). En les condicions d'aquest treball no s'ha observat que Smlt2053 estigui implicat en fenòmens de virulència *in vivo*, donat que no s'han determinat diferències en la supervivència de les larves (Figura 20B). En aquest

RESULTATS I DISCUSSIÓ

experiment la supervivència de les larves infectades amb la soca salvatge ha estat la mateixa que per les soques infectades amb el mutant per *smlt2053*.

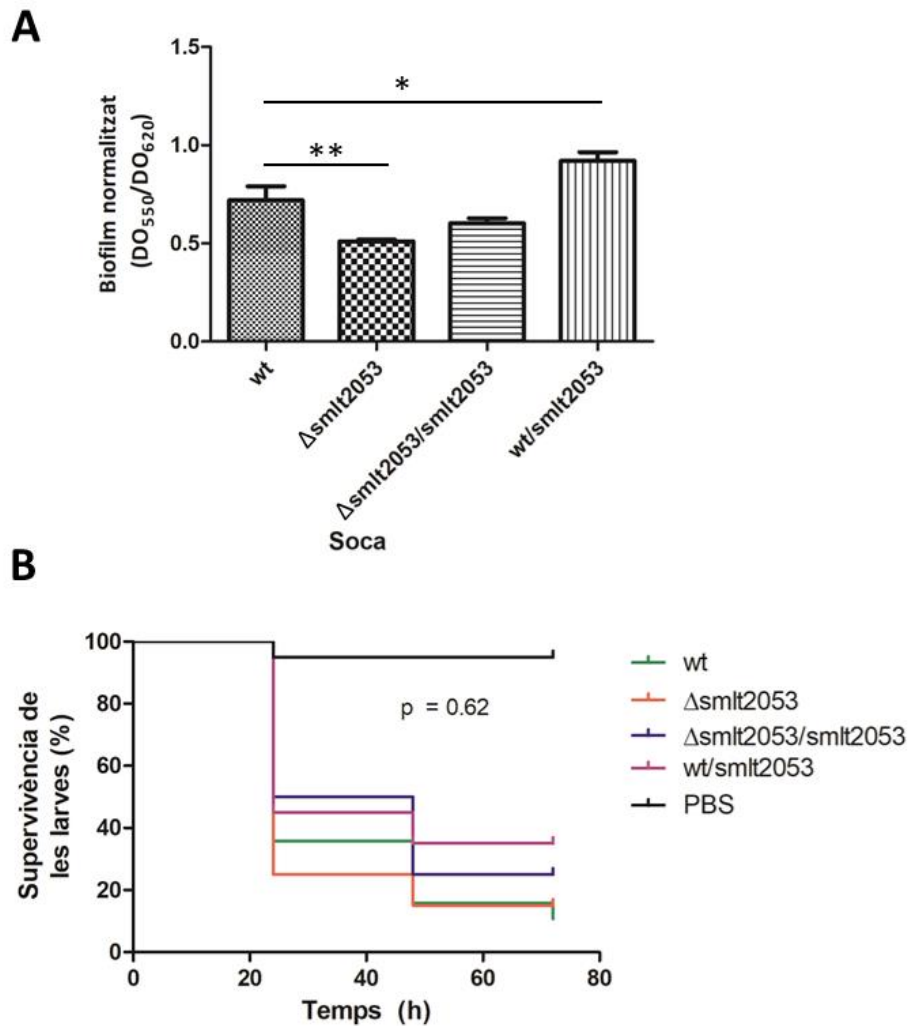


Figura 20. Caracterització fenotípica de Smlt2053. (A) Formació de biofilm en plaques de poliestirè. Es calcula el biofilm relatiu normalitzat com el ràtio de biofilm total (DO₅₅₀) i el creixement bacterià (DO₆₂₀). Estadístics * (p-val < 0,05) i ** (p-val < 0,01). (B) Estudi de virulència per infecció en larves de *G. mellonella*. Es representa el % de larves que sobreviuen a la infecció.

Per a complementar l'estudi fenotípic s'ha determinat el patró de resistències a diferents grups d'antibiòtics, donat l'efecte de PsaA sobre la resistència a polimixines i altres pèptids antimicrobians.

La CMI per a la colistina s'ha determinat en 2 µg/ml per a totes les soques estudiades, no observant els canvis deguts a l'absència de PsaA/Smlt2053 que s'havien observat prèviament per a PsaA. De tots els antibiòtics estudiats, només s'han observat lleugeres diferències en el patró de resistència a la piperacil·lina, un β-lactàmic d'ampli espectre. El mutant *Δsmlt2053* ha vist reduïda la CMI de 64 µg/ml a 32 µg/ml, revertint a 64 µg/ml en el complementat. Tot i així, segons les definicions de CLSI i EUCAST una reducció de 2-fold no pot considerar-se significativa i, per tant, no és rellevant.

4.2.3. Transcriptòmica del regulador Smlt2053

Després d'analitzar els resultats fenotípics del mutant *smlt2053* i determinar l'absència d'efectes clars sobre els fenotips més coneguts per a *S. maltophilia*, s'ha sotmès el mutant a un estudi transcriptòmic mitjançant RNA-Seq, per tal d'establir els canvis en l'expressió gènica depenents d'aquest regulador i aprofundir sobre el seu reguloma. El disseny experimental ha estat el mateix que pels estudis previs, recollint les mostres al final de la fase exponencial ($DO_{600}=1.5$) per triplicat.

Diferents evidències ens han portat a hipotetitzar la participació en el circuit regulatori del QS en *S. maltophilia*: (i) l'elevada expressió en presència tant de AHLs com DSF, (ii) la homologia amb el regulador PsrA de *P. aeruginosa* PAO1, el qual regula una ruta de β -oxidació, entre d'altres processos, i (iii) la naturalesa lipídica dels dos tipus de senyals de QS.

La deleció de *smlt2053* ha afectat l'expressió de 30 gens, però només 17 han superat els criteris d'inclusió ($p\text{-adj} < 0,05$ i $|fold\text{-}change| \geq 1.5$), d'acord amb la comparativa K279a wt i K279a Δ *smlt2053* (

Taula 9). Dels 17 DEGs, 10 s'han observat sobreexpressats en el mutant, mentre que els 7 restants s'han determinat infraexpressats, incloent el propi *smlt2053*. Els gens adjacents a *smlt2053* (*smlt2052* i *smlt2051*), que conformen operó amb aquest, han estat els més sobreexpressats en la soca K279a Δ *smlt2053*. Aquest resultat permet demostrar de nou l'activitat autorepressora del regulador Smlt2053, com s'havia determinat en els experiments de qRT-PCR (Figura 19).

L'associació de cada DEG a una categoria COG permet posar de manifest que hi ha 3 categories principals afectades per la deleció del regulador Smlt2053: COG-I (*Lipid metabolism*), COG-O (*Posttranslational modification and protein turnover*) i COG-P (*Inorganic ion transport*). Aquests resultats, juntament amb els resultats previs i la comparació amb PsrA han permès reafirmar el paper de Smlt2053 en el metabolisme de lípids i en la regulació de diferents processos cel·lulars.

També és interessant destacar la seva implicació en la resposta a l'estrès, donat que en el llistat de DEGs han aparegut proteïnes relacionades amb aquest procés. És el cas de les xaperones GrpE, DnaK i DnaJ (que formen l'operó *smlt1991-smlt1993*), HptG (*smlt1809*) i GroEL (*smlt4214*) que s'han vist sobreexpressades en el mutant. L'operó GrpE-DnaK-DnaJ ja s'havia determinat prèviament com a part del reguloma de PsrA, a través de la regulació de gens clau de la resposta a estrès, com RpoS i el sistema SOS (201). Aquest sistema de xaperones s'han relacionat amb el metabolisme del ferro, producció de factors de virulència i metabolisme de FAs, entre d'altres (204, 205).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 9. DEGs de la comparativa K279aΔsmlt2053 vs K279a WT.

Locus ID	Descripció	Fold-change	p-adj	Categoria COG
Smlt2052	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase	6,35	1,93E-110	I
Smlt2051	Acetyl-CoA C-acyltransferase	6,02	2,88E-76	I
Smlt0602	TonB-dependent receptor	1,66	4,92E-02	P
Smlt1809	Molecular chaperone HtpG	1,65	3,14E-06	O
Smlt1993	Molecular chaperone DnaJ	1,65	6,97E-06	O
Smlt0198	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	1,56	3,86E-04	C
Smlt1991	Nucleotide exchange factor GrpE	1,56	3,96E-03	O
Smlt3645	TonB-dependent receptor	1,55	1,70E-05	P
Smlt4241	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	1,54	1,37E-05	I
Smlt1486	Polyhydroxyalkanoate depolymerase	1,54	7,90E-06	I
Smlt1992	molecular chaperone DnaK	1,49	1,13E-05	O
Smlt2168	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	1,49	1,10E-02	E
Smlt1238	LysE family transporter	1,47	3,04E-04	S
Smlt4075	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	1,46	1,10E-02	O
Smlt1170	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine--D-glutamate ligase	1,44	4,42E-02	M
Smlt4214	Chaperonin GroEL	1,37	2,71E-03	O
Smlt0991	Endopeptidase La	1,37	2,71E-03	O
Smlt0262	Hypothetical protein	-1,34	2,34E-02	S
Smlt2944	Hypothetical protein	-1,36	4,05E-02	S
SMLT_RS21100	Pseudogen	-1,43	6,47E-03	-
Smlt1323	IS630-like element ISStma10 family transposase	-1,43	2,25E-02	L
Smlt0261	Bifunctional nicotinamide-nucleotide adenyltransferase	-1,46	1,36E-03	FH
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-1,49	3,49E-03	C
Smlt0055	Pseudo	-1,51	1,60E-04	-
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	-2,06	7,78E-05	P
Smlt0598	Asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	-2,36	1,63E-06	E
Smlt1445	Helix-turn-helix transcriptional regulator	-9,10	4,46E-42	K
Smlt1444	MFS transporter	-11,50	6,43E-14	EGP
Smlt1443	HlyD family secretion protein	-13,28	8,21E-80	V
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	-438,86	2,27E-07	K

La categoria COG-I referent al metabolisme de lípids indica el paper de Smlt2053 com a un dels principals reguladors del seu catabolisme. La proteïna Smlt1486 (PhaZ), anotada com a una depolimerasa de polihidroxiacanoats (PHAs) també té relació en la literatura amb PsrA. La inactivació de PsrA s'ha observat que indueix la β -oxidació, augmentant també l'activitat de les vies dels polímers de tipus PHA en *P. putida* (206). D'altra banda, l'acetil CoA carboxilasa Smlt4241, anotada com a AccC, participaria també en processos del metabolisme lipídic, sent regulada

negativament per Smlt2053. Aquesta proteïna forma part del complex de l'acetil CoA carboxilasa i catalitza el primer pas de la biosíntesi de malonil CoA a partir d'acetil CoA (207).

S'ha de destacar l'aparició en aquest experiment dels gens *smlt1574* (bacteriohemeritrina), *smlt2944* (no caracteritzada) i *smlt0264* (deshidrogenasa de FAs), que han aparegut en tots els RNA-Seq previs, i que torna a demostrar-se la possible relació amb Smlt2053. En aquest cas, es troben infraexpressats en el mutant.

El cas contrari el presenta la flavoproteïna Smlt0198, que apareix sobreexpressada en el mutant i que s'havia determinat prèviament un motiu candidat d'unió de PsrA en la seva regió promotora (Taula 8).

Aquests resultats suggereixen que el reguloma de Smlt2053 implica el control de l'expressió de diferents processos cel·lulars, i indica que en les condicions d'aquests estudi és probable que molts dels gens que estan directament regulats per Smlt2053 no hagin aparegut, tot i que els motius no són clars. S'hipotetitzava que un disseny experimental amb lleugers canvis podria millorar els resultats, com l'anàlisi transcriptòmic en diferents moments del creixement, induir l'expressió d'aquest regulador amb la presència de FAs exògens, o bé que realment el reguloma de Smlt2053 sigui reduït i no tan global com en *P. aeruginosa*.

Per tal de determinar altres gens que poden estar regulats *in vitro*, s'ha procedit a realitzar assajos d'unió DNA-Proteïna.

4.2.4. Assajos d'unió a promotors

Per a confirmar el paper de Smlt2053 com a regulador transcripcional, i confirmar la seva pròpia autoregulació, s'ha utilitzat la metodologia d'EMSA, descrita en la secció de mètodes.

El primer pas ha estat confirmar l'autoregulació de Smlt2053 a la seva regió reguladora, que conté el motiu CAAACaatcGTTTG en la posició -32 respecte a l'ATG inicial. Els assajos EMSA demostren una unió efectiva de Smlt2053 a la seva regió reguladora, depenent de la concentració (Figura 21). L'aparició de diferents bandes del complex DNA-proteïna podria indicar unió a proteïna monomèrica i dimèrica, o bé indicar un complex d'alta afinitat i un de baixa afinitat, tot i que no s'ha explorat aquesta qüestió en aquest treball.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tot i així, és evident que hi ha una unió forta amb baixes quantitats de proteïna, indicant que l'estat natural del sistema és la repressió constitutiva de Smlt2053 per ella mateixa, tal i com ja s'ha observat prèviament en altres reguladors de tipus TetR (208).

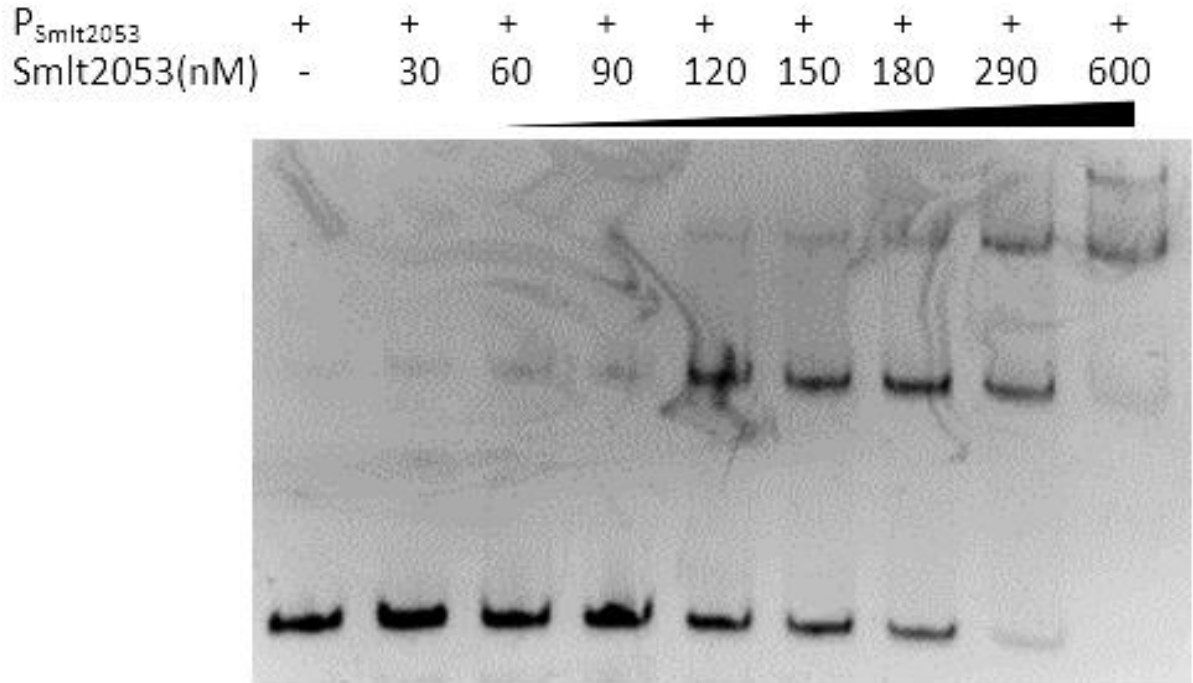


Figura 21. EMSA per a la regió promotora de *smlt2053* ($P_{Smlt2053}$) i la proteïna Smlt2053. El gradient de concentració de la proteïna Smlt2053-His tag varia de 30 a 600 nM amb una quantitat fixe de la sonda de 50 ng. El carril 1 s'utilitza com a control on no hi ha proteïna.

Per extendre el llistat de gens que poden estar regulats directament per Smlt2053, s'han seleccionat diversos gens que presenten el motiu d'uníó al DNA canònic de PsrA/Smlt2053 i s'ha amplificat la seva regió reguladora 5' per a realitzar més assajos d'uníó (Figura 22).

S'han seleccionat els gens en funció de les bases entre els palíndroms del motiu d'uníó a DNA. El motiu (G/C)AAAC(N₂₋₄)GTTT(G/C) canònic de PsrA indica que la separació ha de ser de 2-4 nucleòtids per a una uníó efectiva de PsrA. En aquest treball, en canvi, s'observa que no és necessàriament així: la regió reguladora del gen *smlt1974* conté el motiu CAAACgttacGTTTG, amb una separació de 5 nucleòtids, i l'assaig d'uníó per EMSA denota que Smlt2053 el pot reconèixer i unir-se, fet que no s'ha descrit prèviament. Aquest gen està anotat com a *uncharacterized* i no té homologia amb altres proteïnes descrites, però una cerca amb l'eina iterativa Jackhmmer, que permet determinar ortòlegs remots, indica certa relació amb proteïnes de bacteriòfags de *P. aeruginosa*.

D'altra banda, la uníó de Smlt2053 a la regió reguladora dels gens *smlt0198* (N₄), *smlt0297* (N₃) i *smlt0608* (N₂) valida la separació entre el palíndroma descrita per a PsrA.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

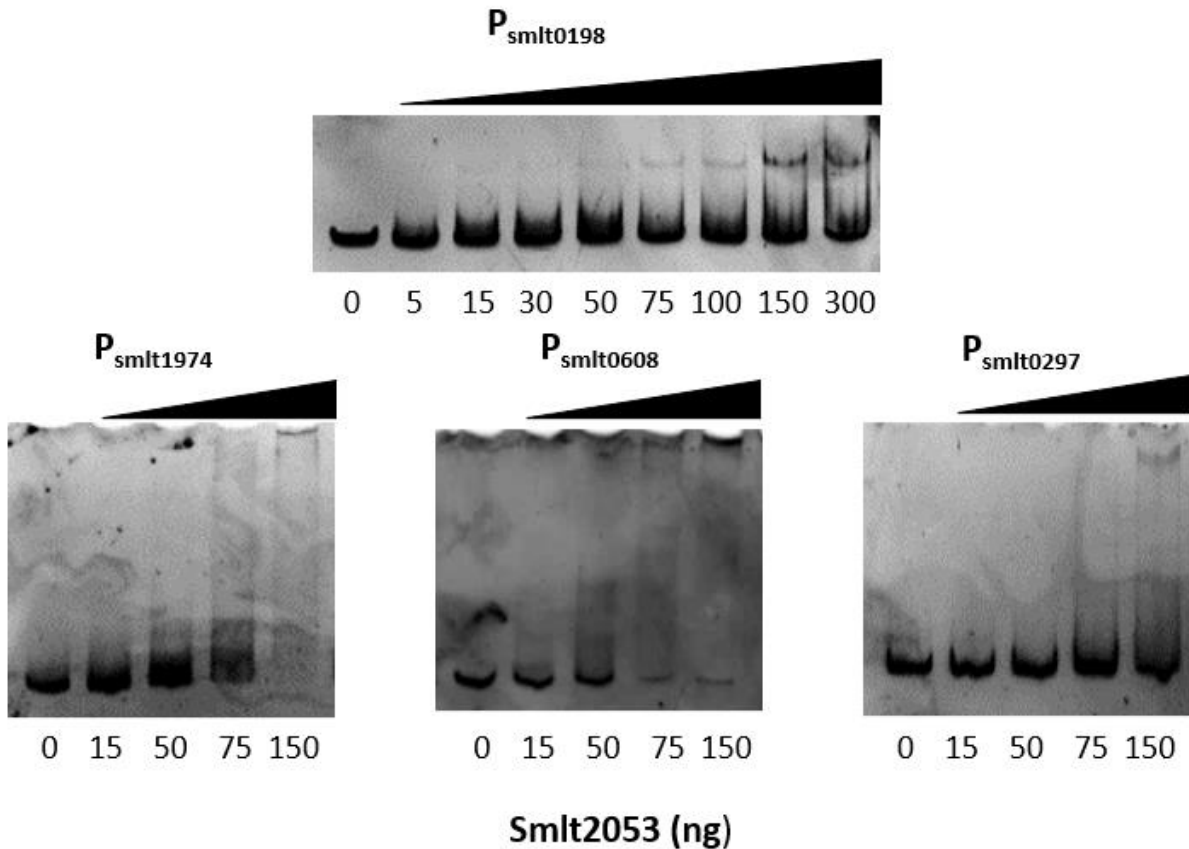


Figura 22. EMSA per a la regió promotora de gens candidats i la proteïna Smlt2053. El gradient indica la quantitat de proteïna en cada carril (en ng) amb una quantitat fixe de sonda de 50 ng.

Per tant, es confirma la regulació *in vitro* de Smlt2053 sobre *smlt0198*, concordant amb totes les evidències comentades anteriorment: (i) descrita com a part del reguloma de PsrA, (ii) presència del motiu canònic d'unió a PsrA/Smlt2053 i (iii) gen expressat de manera diferencial en el mutant K279aΔ*smlt2053*. Aquesta flavoproteïna està encarregada de la transferència d'electrons provinents de l'oxidació de FAs i aminoàcids a la cadena respiratòria, formant part del metabolisme energètic. És important remarcar que PsrA regula positivament a aquesta proteïna, mentre que els resultats d'aquest treball suggereixen una regulació negativa, donat que apareix lleugerament sobreexpressada en el mutant K279aΔ*smlt2053* (201). També cal destacar que aquestes proteïnes utilitzen el ferro com a cofactor, vinculant de nou el metabolisme del ferro amb el QS i el regulador Smlt2053.

Un cop demostrat que Smlt2053 actua com a element regulador de la transcripció, s'ha seguit amb la caracterització dels possibles lligands que pot reconèixer per entendre el paper en la fisiologia i metabolisme en *S. maltophilia*.

4.2.5. Assajos d'unió a àcids grassos

PsrA s'ha demostrat que participa en el reconeixement d'àcids grassos i aquests afecten la seva activitat repressora, alliberant-lo del DNA i activant la transcripció dels gens diana. Els FAs que pot reconèixer PsrA són únicament els FAs de cadena llarga (LCFAs), des del $C_{12:0}$ al $C_{18:1}^{\Delta 9}$ (185).

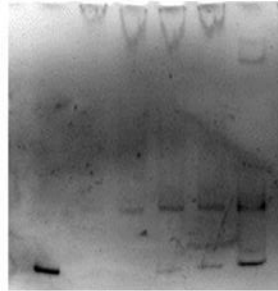
En aquest treball s'ha començat per estudiar l'efecte de FAs de cadena curta i mitja ($C_{4:0}$, àcid butíric i $C_{8:0}$, àcid octanoic, respectivament) sense observar canvis en la unió Smlt2053 a la seva pròpia regió reguladora (resultats no mostrats). Per centrar l'activitat de Smlt2053 en la detecció de FAs, s'han escollit alguns dels més presents en *S. maltophilia*. En treballs previs s'ha demostrat que el FA majoritari (tant cel·lular com extracel·lular) és l'àcid 13-metil-tetradecanoic (àcid isopentadecanoic, iso- $C_{15:0}$), indicant que també és part dels PLs de membrana (86). Altres FAs observats amb un percentatge rellevant a *S. maltophilia* són l'àcid palmític ($C_{16:0}$), àcid mirístic ($C_{14:0}$) i àcid làuric ($C_{12:0}$), entre d'altres (86).

Els assajos d'unió amb lligand s'han realitzat amb l'àcid làuric, l'àcid isopentadecanoic i l'àcid palmític (Figura 23). En les condicions d'aquest treball s'ha demostrat la capacitat dels tres FAs de revertir la unió Smlt2053 amb la regió diana del DNA, de manera similar a PsrA amb *P. aeruginosa*. En el cas de l'àcid làuric s'observa una unió més dèbil que pels FAs de cadena més llarga, suggerint una preferència per FAs de cadena major a 12 carbonis, tal i com s'ha descrit per a PsrA (185). A la concentració de 250 μ M, només s'observa una desunió parcial de Smlt2053 al DNA per $C_{12:0}$, mentre que a la mateixa concentració la quantitat de DNA lliure observada per efecte de iso- $C_{15:0}$ i $C_{16:0}$ és quasi total. Per tant, aquest resultat suggereixen per una banda que efectivament Smlt2053 participa en la regulació del metabolisme de FAs, i per altre que té preferència pels LCFAs majoritaris en *S. maltophilia*.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

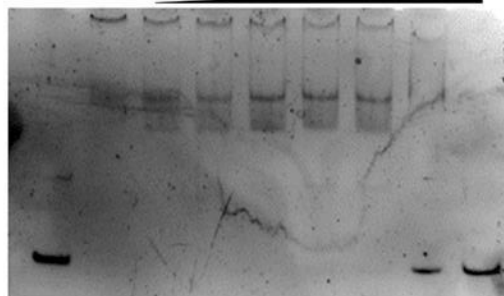
Àcid Làuric (C_{12:0})

P _{Smlt2053}	+	+	+	+	+	+
Smlt2053	-	+	+	+	+	+
C _{12:0} (μM)	-	-	50	250	500	1000



Àcid 13-Metil-tetradecanoic (iso-C_{15:0})

P _{Smlt2053}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Smlt2053	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Iso-C _{15:0} (μM)	-	-	1	5	10	25	50	100	250



Àcid Palmític (C_{16:0})

P _{Smlt2053}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Smlt2053	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C _{16:0} (μM)	-	-	1	5	10	50	250	500	1000

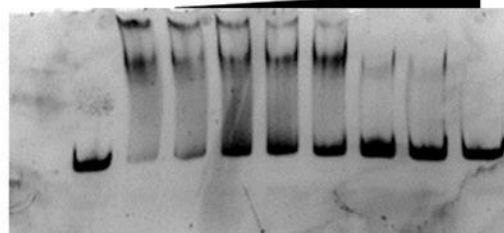


Figura 23. EMSA per estudiar l'efecte de diferents LCFAs sobre la unió Smlt2053 a la sonda P_{Smlt2053}. S'han afegit concentracions creixents de cada FA, a reaccions prèviament incubades 30 min amb Smlt2053-P_{Smlt2053}. El primer carril només conté la sonda P_{Smlt2053} i el segon carril inclou tant la proteïna Smlt2053 amb P_{Smlt2053} en presència del solvent utilitzat per a solubilitzar-les (descriu en la secció de mètodes).

En *X. citri*, s'ha descrit un regulador anomenat TfmR, de tipus TetR, que és capaç de sensar LCFAs. Els LCFAs actuen com a lligands per TfmR, el que l'allibera dels gens diana i permet l'expressió de MhpC, FadE i FadH, induint la β -oxidació (147). L'ortòleg de TfmR en *S. maltophilia* és Smlt3646, està localitzat abans de l'operó anotat BpoA-FadE (*smlt3647-smlt3648*). En *X. citri*, en canvi, s'ha determinat que BpoA és MhpC, implicada en el processatge dels èsters metílics d'àcids grassos (FAME, *fatty acid methyl esters*).

En presència d'AHLs i DSF s'observa una sobreexpressió important de BpoE/MhpC (*smlt3647*), pel que podria indicar la relació existent entre els ortòlegs de TfmR i PsrA en *S. maltophilia* en la regulació global del metabolisme de FAs.

4.2.6. Assajos d'unió a senyals de QS

Un cop confirmat el paper de Smlt2053 en el reconeixement de FAs, s'ha hipotetitzat que podria també estar implicat en el reconeixement de les molècules de QS de tipus AHL i DSF, donat que: (i) el DSF i l'àcid iso-C_{15:0} comparteixen la mateixa via de biosíntesi (101), (ii) les AHLs es componen d'una fracció lípida, amb una cadena acil, variable en llargada, (iii) Smlt2053 s'ha observat sobreexpressat tant en presència d'AHLs i DSFs en aquest treball.

El primer pas ha estat analitzar la resposta a les diferents AHLs utilitzades en aquest treball (Figura 24). Un dels principals inconvenients observats amb la metodologia d'EMSA seguida en aquest treball és la dificultat per revelar el gel en presència de solvents com el DMSO, donada la dificultat d'obtenir imatges clares sense artefactes. Tot i així, després de repetir per triplicat aquest experiment hi ha una lleugera evidència que la N-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HSL) pot ser reconeguda per PsrA a concentracions elevades, però no s'han obtingut resultats conclouents.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

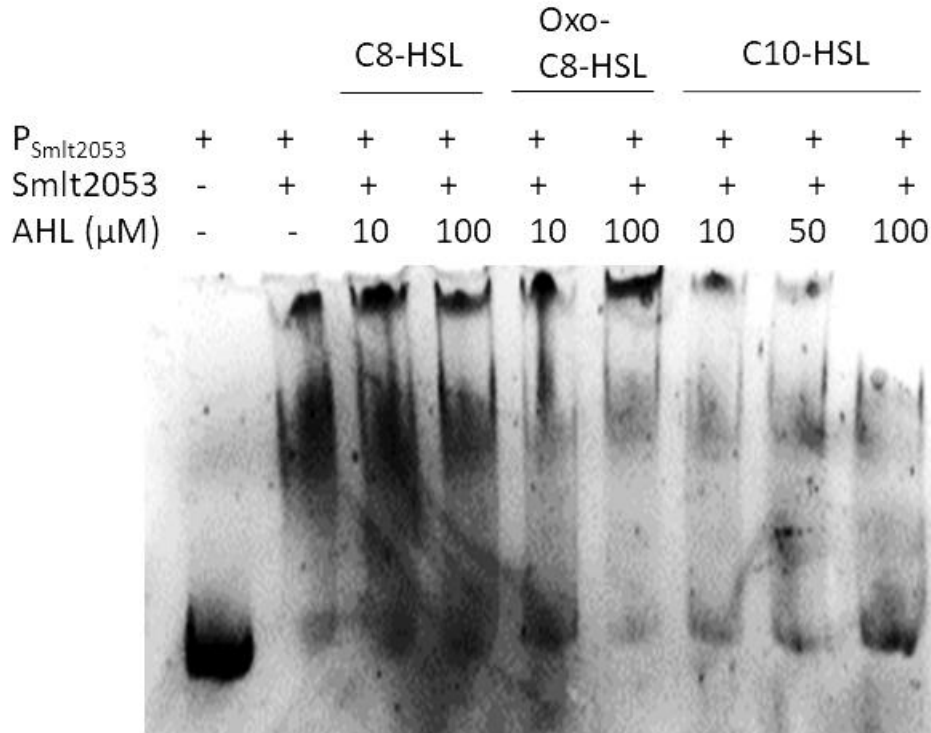
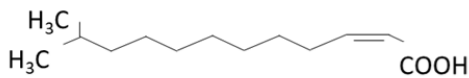


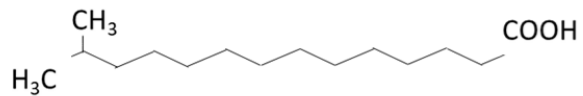
Figura 24. EMSA per estudiar l'efecte de les AHLs sobre la unió Smlt2053 a la sonda $P_{Smlt2053}$. S'han afegit concentracions de 10 μM , 50 μM (només per C10-HSL) i 100 μM , a reaccions prèviament incubades 30 min amb Smlt2053- $P_{Smlt2053}$. El primer carril només conté la sonda $P_{Smlt2053}$ i el segon carril inclou tant la proteïna Smlt2053 amb $P_{Smlt2053}$ en presència del solvent DMSO utilitzat per a solubilitzar-les.

Seguidament, s'ha fet el mateix anàlisi per a la molècula DSF, que és produïda per *S. maltophilia* K279a i que estructuralment és similar als àcids grassos utilitzats en la secció anterior (Figura 25).

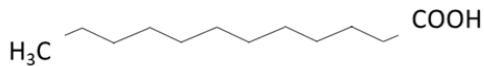
Àcid cis-11-metil-2-dodecenoic (DSF)



Àcid 13-metil-tetradecanoic (iso- $C_{15:0}$)



Àcid Lauric ($C_{12:0}$)



Àcid Palmític ($C_{16:0}$)

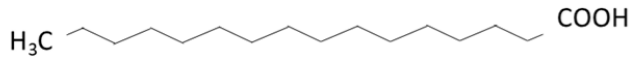


Figura 25. Estructura dels diferents àcids grassos utilitzats en aquesta secció.

Després d'afegir concentracions creixents de DSF a una reacció d'unió entre Smlt2053- $P_{Smlt2053}$ prèviament incubada, s'observa clarament que el DSF reverteix aquesta unió, observant un augment del DNA lliure dependent de concentració (Figura 26). En la concentració de 10 μM utilitzada per a suplementar els cultius de l'experiment de RNA-Seq ja s'observa un augment parcial del DNA lliure

RESULTATS I DISCUSSIÓ

en comparació amb concentracions més baixes, però no és fins a la concentració de 500 μM on s'observa una desunió total de Smlt2053 a la sonda que conté el motiu d'unió al DNA.

P_{Smlt2053}	+	+	+	+	+	+	+
Smlt2053	-	+	+	+	+	+	+
DSF (μM)	-	-	5	10	50	250	500

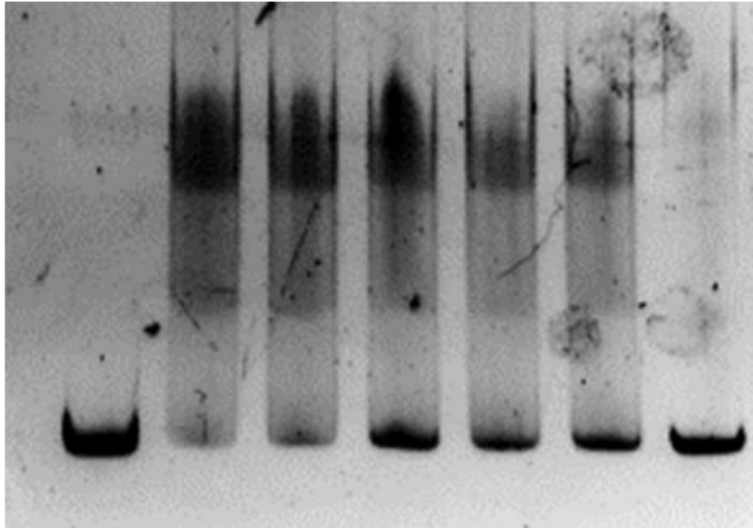


Figura 26. EMSA de la proteïna Smlt2053 amb la sonda P_{Smlt2053} en presència de DSF. S'han afegit concentracions creixents de DSF a reaccions prèviament incubades 30 min amb Smlt2053- P_{Smlt2053} . El primer carril només conté la sonda P_{Smlt2053} i el segon carril inclou tant la proteïna Smlt2053 amb P_{Smlt2053} en presència del solvent DMSO utilitzat per a solubilitzar el DSF.

Per tant, aquests resultats suggereixen que Smlt2053 és capaç de detectar i unir DSF intracel·lular i activar l'expressió de diferents gens relacionats amb el catabolisme lipídic. Això podria ser un indicador de una via de reciclatge del DSF en *S. maltophilia*, utilitzant aquesta senyal com a font de nutrients.

4.2.7. Caracterització dels gens candidats *smlt2944* i *smlt0264-smlt0268* i en la resposta a senyals de QS i a Smlt2053

Finalment, per a tancar aquesta secció, s'han decidit caracteritzar dos dels gens que semblen tenir una relació amb QS i PsrA segons els resultats obtinguts tant en la secció 1 com en l'estudi transcriptòmic d'aquesta segona secció.

El primer gen, *smlt2944*, no ha estat caracteritzat prèviament, tot i que conté un domini de la superfamília de les porines, pel que s'ha hipotetitzat que podria actuar com a porina de la membrana externa. Tot i així, la proteïna Smlt2944 presenta homologia amb altres proteïnes no caracteritzades d'espècies productores de DSF dels ordres Burkholderiales i Xanthomonadales. En canvi, presenta

RESULTATS I DISCUSSIÓ

certa homologia amb la proteïna DcaP de l'espècie *A. baumannii* (25% d'identitat i 99% de cobertura de seqüència). Aquesta identitat es correspon exclusivament al domini N-terminal de DcaP, que sembla estar implicat en el manteniment de la integritat estructural del canal a la membrana externa. És destacable el fet que la funció de DcaP s'ha determinat com a un canal de captació d'àcids dicarboxílics (209) i també s'ha proposat com a un bon candidat pel disseny de vacunes en front a aquest patogen (210).

La deleció de *smlt2944* ($K279a\Delta smlt2944$) ha resultat en una disminució de la permeabilitat de la membrana externa, efecte que es recupera parcialment amb la complementació de l'al·lel salvatge, tal i com indica l'assaig de permeabilitat NPN (Figura 27A). L'assaig de captació de NPN permet determinar la permeabilitat d'una membrana biològica. El fonament es basa en la sonda apolar NPN, que emet nivells elevats de fluorescència en ambients rics en PLs, però que n'emet poca en ambients aquosos (211). Aquestes propietats de la sonda NPN permet estudiar les propietats de la membrana externa dels bacteris gramnegatius. En una ME intacta i funcional, la sonda NPN té dificultats per atravesar-la, però en una ME amb algun defecte, la sonda NPN és capaç d'entrar i entrar en contacte amb els PLs de la cara interna emetent fluorescència.

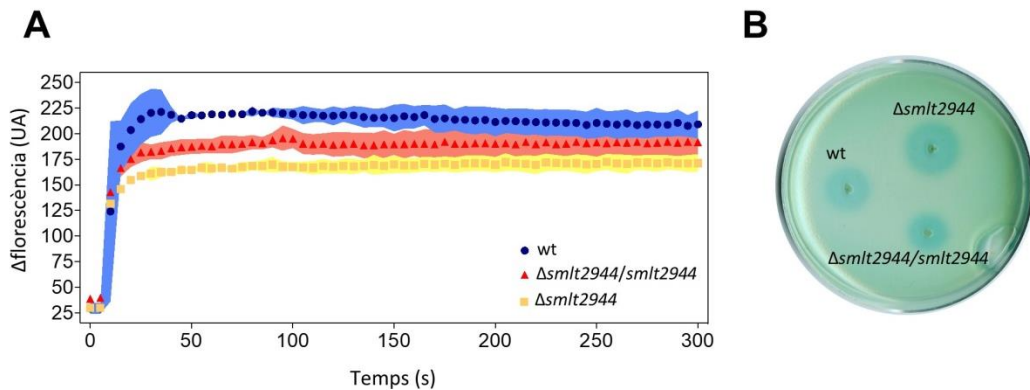


Figura 27. Caracterització fenotípica de *smlt2944*. (A) Assaig NPN per a determinar la permeabilitat de la membrana externa de *S. maltophilia* K279a salvatge (wt), el mutant per *smlt2944* ($\Delta smlt2944$) i el complementat ($\Delta smlt2944/smlt2944$). (B) Bioassaig de DSF per a les mateixes soques. L'halo blau al voltant del punt d'inoculació indica la producció de DSF.

Adicionalment, estudis de detecció de la producció de DSF han mostrat evidències que en la soca $K279a\Delta smlt2944$ hi ha un augment de la producció de DSF, que reverteixen als nivells de la soca salvatge quan es complementa (Figura 27B). Aquests resultats suggereixen que la porina *Smlt2944* pot estar relacionada amb el QS en *S. maltophilia* i podria actuar com a un canal d'entrada pel DSF, tot i que aquestes suposicions requereixen més recerca per a determinar la funció precisa en aquest context.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

El segon gen analitzat ha estat el gen *smlt0264*, juntament amb la resta de gens amb els que conforma un operó, *smlt0264-smlt0268*. Tant la organització d'aquest gens, així com les funcions predites indiquen que veritablement formen una única unitat transcripcional. Aquest operó inclou *smlt0264* (metilmalonat-semialdehid deshidrogenasa aciladora de CoA), *smlt0265* (acil-CoA hidratasa), *smlt0266* (enoil-CoA hidratasa), *smlt0267* (enoil-CoA hidratasa/isomerasa) i *smlt0268* (3-hidroxiisobutirat deshidrogenasa). Els homòlegs d'aquest operó es poden trobar en quasi totes les espècies productores de DSF, com l'operó *XC_2977-XC_2981* de *X. campestris* 8004 i l'operó *BCAM2191-BCAM2196* de *B. cenocepacia* J2315.

Els gens més ben caracteritzats d'aquest operó són *smlt0264* i *smlt0268*, que són ortòlegs de *mmsA* i *mmsB* de *P. aeruginosa*, respectivament. Aquest gens de *P. aeruginosa* formen operó amb el gen regulador *mmsR*, participant en la via de degradació de la valina (212). A més, *mmsB* s'ha trobat desregulat en la soca *P. aeruginosa* PA14, la qual no conté el regulador del QS MvfR (213) i en un altre treball s'ha determinat que forma part del reguloma de la senyalització DSF/Rpf *in planta* (183).

Per tal de determinar la funció d'aquest operó en *S. maltophilia* s'ha generat un mutant de tot l'operó (*K279aΔsmlt0264-smlt0268*) per investigar la capacitat de d'utilitzar diferents àcids grassos com a font de carboni. La soca salvatge, la mutant i la complementada s'han fet créixer en medi mínim M9 amb una única font de carboni al 1%, sent aquests àcids grassos DSF o iso-C_{15:0} (Figura 28). De forma interessant s'ha observat que el mutant té un creixement més lent en comparació a les altres dues soques amb l'al·lel salvatge, indicant que l'operó *smlt0264-smlt0268* conforma un operó de β-oxidació que no és només capaç de metabolitzar l'àcid gras més abundant en *S. maltophilia* (iso-C_{15:0}), sinó que també és capaç d'utilitzar el DSF com a font de carboni.

Aquestes evidències ens fan hipotetitzar que aquest operó pot jugar un paper important en el reciclatge del DSF, donat que també apareix sobreexpressat en fase estacionària, una situació fisiològica en la qual la concentració de DSF cel·lular comença a disminuir.

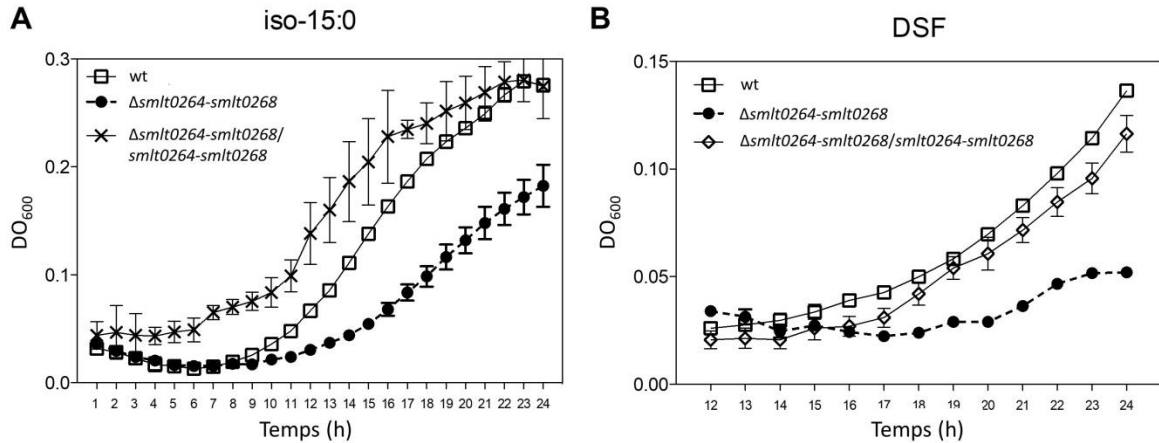


Figura 28. Corbes de creixement de *S. maltophilia* K279a salvatge (wt), el mutant per *smlt0264-smlt0268* ($\Delta smlt0264-smlt0268$) i el complementat ($\Delta smlt0264-smlt0268/smlt0264-smlt0268$) en medi mínim M9 utilitzant una única font de carboni: (A) iso-C_{15:0}. (B) DSF.

4.3. Caracterització del sistema de transport de fosfolípids Mla a *S. maltophilia* i el seu paper en resistència i virulència

4.3.1 Identificació del sistema Mla a *S. maltophilia*

S'ha observat en les seccions 1 i 2 un augment del metabolisme de FAs relacionats amb els senyals de QS i la regulació de Smlt2053. Donada la capacitat de Smlt2053 de unir iso-C_{15:0}, el principal PL de la membrana de *S. maltophilia*, s'ha decidit caracteritzar el sistema Mla en aquesta espècie, donada la controvèrsia respecte el seu paper en el transport anterògrad de PLs (132) i per la seva relació amb fenòmens de resistència i virulència en diverses espècies (214–216).

El primer pas ha estat determinar la localització i organització dels components del sistema Mla en *S. maltophilia* K279a. Utilitzant com a punt de partida el sistema Mla de *E. coli* (138) s'ha fet una cerca per homologia de les seqüències de les proteïnes i s'ha comparat amb altres espècies on el sistema Mla ha estat caracteritzat (Taula 10).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 10. Identitats de seqüència d'AA del sistema Mla en diferents espècies respecte el de *S. maltophilia* K279a.

% d'identitat de seqüència respecte a l'ortòleg a <i>S. maltophilia</i> *						
Espècie	VacJ/MlaA	MlaB	MlaC	MlaD	MlaE	MlaF
<i>S. maltophilia</i>	100% Smlt4675*	100% Smlt4674	100% Smlt4673	100% Smlt4672	100% Smlt4671	100% Smlt4670
<i>X. campestris</i>	63% XC_4301	58% XC_4300	67% XC_4299	77% XC_4298	91% XC_4297	86% XC_4296
<i>N. meningitidis</i>	39% NMB_1961	35% NMB_1962	27% NMB_1963	44% NMB_1964	45% NMB_1965	47% NMB_1966
<i>R. solanacearum</i>	45% RS_RS14830	40% RS_RS14820	22% RS_RS14825	41% RS_RS14835	49% RS_RS14840	51% RS_RS14845
<i>E. coli</i>	38% b2346	32% b3191	30% b3192	37% b3193	46% b3194	49% b3195
<i>P. aeruginosa</i>	40% PA2800	37% PA4452	30% PA4453	41% PA4454	44% PA4455	49% PA4456
<i>P. putida</i>	37% PP2163	32% PP0962	27% PP0961	44% PP0960	44% PP0959	50% PP0958

*S'indica el % d'identitat de seqüència i el locus ID de cada gen ortòleg.

El sistema Mla en *S. maltophilia* té tots els seus components codificats en un mateix operó (*smlt4670-smlt4675*), incloent la lipoproteïna MlaA, tal i com s'organitza en *X. campestris* i *N. meningitidis*, i similar a l'organització en *Ralstonia solanacearum*. En aquest darrer, *mlaA* es troba entre *mld* i *mldC*, i no en la darrera posició dins l'operó com en els 3 anteriors (Figura 29).

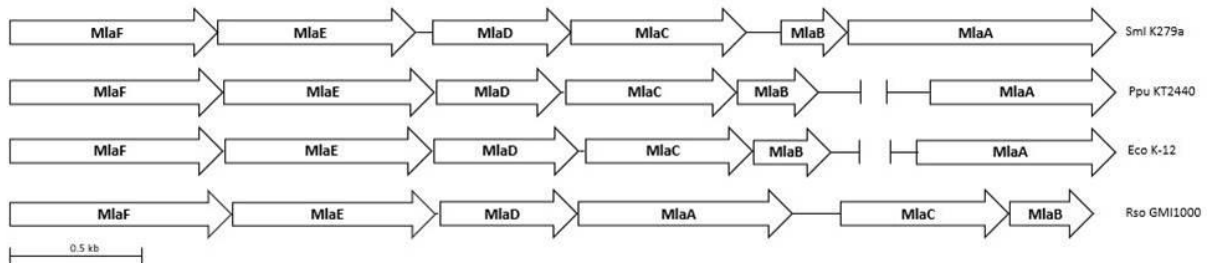


Figura 29. Comparativa de la organització genòmica dels components del sistema Mla en diferents espècies. L'organització per *S. maltophilia* K279a (Sml K279a) és similar en *N. meningitidis* i *X. campestris*. S'indica també l'organització de l'operó per a *P. putida* (Ppu KT2440), *E. coli* (Eco K-12) i *R. Solanacearum* (Rso GMI1000).

En els casos de *E. coli* i *Pseudomonas* (tant *P. aeruginosa* com *P. putida*), la localització de *mlaA* és diferent a la de resta de components de l'operó, suggerint una evolució diferent de *mlaA* en aquestes espècies.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La proteïna codificada per *smlt4675* està anotada com a “VacJ lipoprotein”, degut a que la primera descripció de MlaA es va donar en *S. flexneri*, on es va caracteritzar VacJ com a un gen de virulència (217).

Donada la conservació d'aquest sistema en *S. maltophilia*, s'ha hipotetitzat que la implicació en fenòmens de resistència i virulència pot ser similar a la reportada per altres espècies. El següent pas d'aquest treball, doncs, ha portat a la caracterització fenotípica d'aquest sistema.

4.3.2. Implicació del sistema Mla en fenòmens de resistència associats a una membrana alterada

Per a determinar les implicacions d'aquest sistema en la fisiologia de *S. maltophilia*, s'han generat dos mutants diferents: per una banda, s'ha deletat *mlaFEDCB* i per altra banda únicament la lipoproteïna MlaA/VacJ (*smlt4675*).

El primer fenomen a analitzar ha estat el patró de resistències de la soca salvatge, mutada i la complementada. En treballs previs d'aquest sistema, s'ha determinat que soques deficientes en algun dels components del sistema presenten un augment de la sensibilitat a compostos que danyen les membranes cel·lulars, com en *Burkholderia* (214), *E. coli* (216), *H. parasuis* (218) o *P. aeruginosa* (142), entre d'altres.

S'ha estudiat la sensibilitat a les sals biliars mitjançant un experiment d'eficiència de plaqueig (*efficiency of plating*), tal i com es descriu en la secció de mètodes, en medi MacConkey (Figura 30).

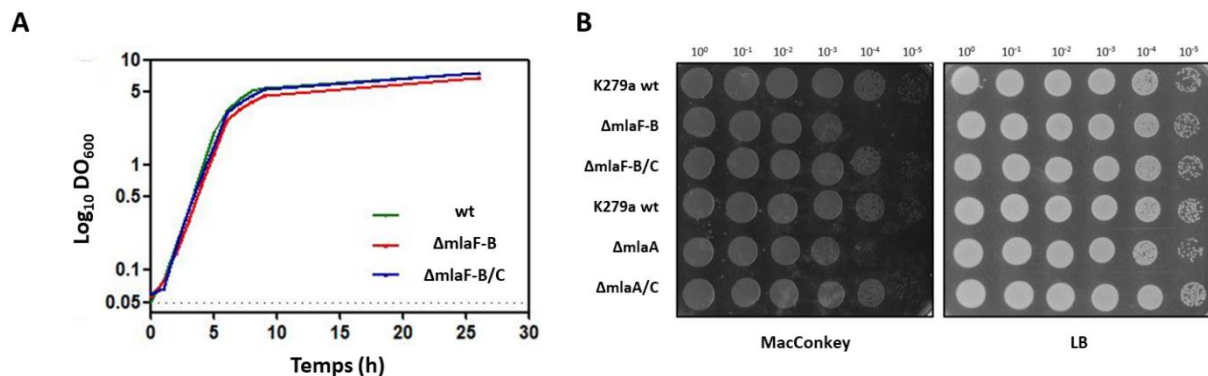


Figura 30. Efecte de les sals biliars en mutants del sistema Mla. (A) Corba de creixement per a la soca salvatge K279a (wt), el mutant per *mlaFEDCB* ($\Delta mlaF-B$) i per la soca mutada complementada amb l'al·lel salvatge ($\Delta mlaF-B/C$). (B) Eficiència de plaqueig en medi MacConkey amb el control de cèl·lules viables en LB.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

S'ha observat que tant el mutant $\Delta mlaFEDCB$ com el mutant per $\Delta mlaA$ presenten el mateix fenotip d'augment de susceptibilitat a les sals biliars. El medi MacConkey conté sals biliars les quals actuen com a detergent desestabilitzant les membranes bacterianes. Mentre que el creixement de les soques defectives del sistema Mla no es veu afectat en medi ric (Figura 30A), sí que hi ha un augment de la sensibilitat a les sals biliars (Figura 30B). La manca dels components del sistema Mla porta a una acumulació de PLs deslocalitzats a la cara externa de la ME, originant zones més sensibles a l'acció de molècules hidrofòbiques (les sals biliars són molècules amfipàtiques). Aquest fenotip es reverteix quan es transformen les soques mutants amb el seu al·lel salvatge, tornant als nivells de susceptibilitat observats per a la soca K279a salvatge.

Respecte els patrons de susceptibilitat a diferents classes d'antibiòtics, també s'ha estudiat quin és l'efecte de la deleció dels components del sistema Mla (Taula 11).

Taula 11. Susceptibilitat a diferents antibiòtics pels mutants Mla mitjançant el mètode de microdilució en placa.

Categoria	Antibiòtic	CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
		K279a	$\Delta mlaF-B$	$\Delta mlaF-B/C$	K279a	$\Delta mlaA$	$\Delta mlaA/C$
Carbapenems (β-lactàmics)	Imipenem	128	128	128	128	128	128
	Meropenem	8	8	8	8	8	8
β-lactàmics	Ceftazidima	2	2	2	2	2	2
	Piperacil·lina	32	32	32	32	32	32
	Piperacil·lina- Tazobactam	16	16	16	16	16	16
	Ticarcil·lina	64	64	64	64	64	64
	Ticarcil·lina- Clavulànic	1	1	1	1	1	1
	Tobramicina	32	32	32	32	32	32
Aminoglicòsids	Amikacina	8	8	8	8	8	8
	Gentamicina	8	8	8	8	8	8
	Kanamicina	128	128	128	128	128	128
	Streptomicina	32	32	32	32	32	32
	Tetraciclina	16	16	16	16	16	16
Tetraciclines	Minociclina	2	0,5	2	2	0,5	2
	Tigeciclina	4	4	4	4	4	4
	Ciprofloxacina	8	8	8	8	8	8
Quinolones	Levofloxacina	4	4	4	4	4	4
	Ofloxacina	4	4	4	4	4	4
	Norfloxacina	32	32	32	32	32	32
	Trimetoprim- Sulfametoxazol	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Polimixines	Colistina	2	0,5	2	2	0,5	1

RESULTATS I DISCUSSIÓ

De tots els antibiòtics estudiats, només s'observa canvis en el patró de susceptibilitat per a la colistina i la minociclina, tots dos amb un augment de 4-*fold* de la sensibilitat.

Les soques K279aΔ*mIa*FEDCB i K279aΔ*mIa*A tenen una CMI de 0,5 µg/ml per a la colistina, en front als 2 µg/ml de la soca salvatge. La transformació de la soca mutant amb les còpies dels gens intactes restaura totalment el fenotip de susceptibilitat per a K279aΔ*mIa*FEDCB, mentre que per K279aΔ*mIa*A només és parcial, sent la CMI del complementat 1 µg/ml. En treballs previs ja s'havia observat que el sistema Mla té relació amb la resistència a colistina (142, 219) i es confirma el mateix cas per a *S. maltophilia*. La colistina és hidrofòbica i sembla entrar a la MI permeabilitzant a través de la ME, pel que en una membrana danyada és esperable que la resistència a l'efecte d'aquest antibiòtic sigui menor.

En el cas de la minociclina també s'ha observat una reducció de 4-*fold*, sent la CMI per a les soques salvatge i complementada de 2 µg/ml, mentre que baixa a 0,5 µg/ml per a les soques mutades (Figura 31). Curiosament, els dos altres antibiòtics testats de la mateixa classe (tetraciclins) no afecten diferencialment als mutants per Mla. L'explicació a aquest fenomen podria donar-se per les propietats diferents de les tetraciclins utilitzades: la minociclina, una tetraciclina semisintètica és més hidrofòbica que la tetraciclina i la tigeciclina, pel que una superfície més hidròfoba per inactivació del sistema Mla tornaria les cèl·lules més sensibles a aquest antibiòtic (220, 221).

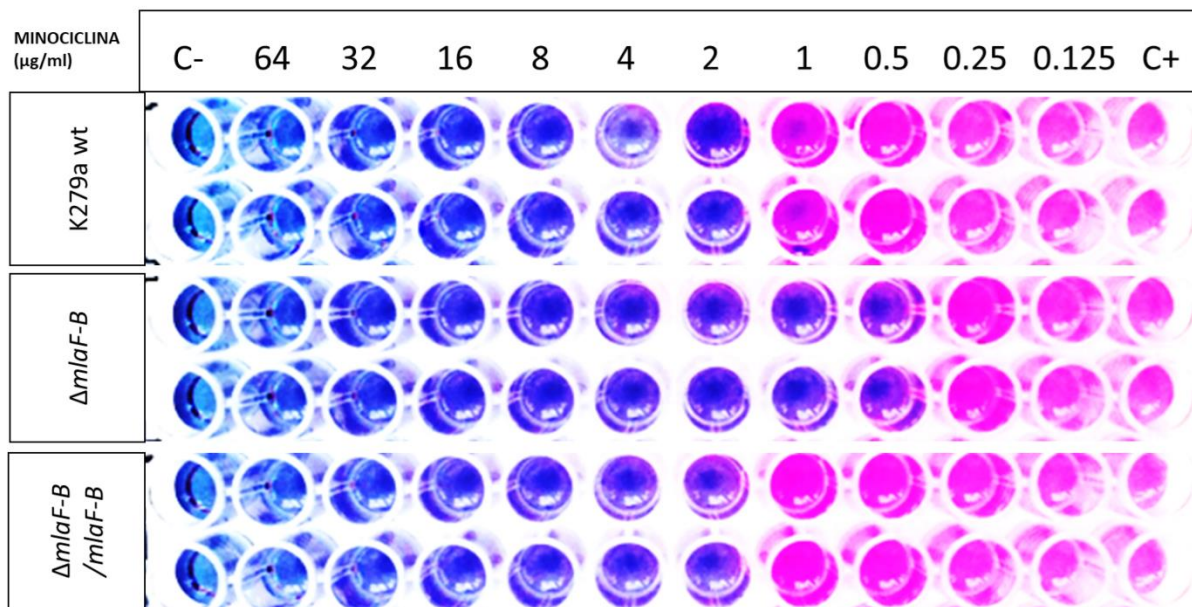


Figura 31. Determinació de la CMI per a la minociclina pel mutant Δ*mIa*FEDCB (Δ*mIa*F-B). Els duplicats contenen un control de creixement sense antibiòtic (C+) i un control de contaminació sense antibiòtic ni cèl·lules (C-).

És rellevant el fet que Mla no sembla tenir implicacions en les resistències a β -lactàmics, aminoglicòsids, sulfonamides i quinolones, tot i que s'hagi reportat en altres espècies (142, 215). Generalment, però, els assajos de resistència a antibiòtics en cèl·lules defectives pel sistema Mla han generat resultats diversos, indicant que hi ha altres mecanismes similars que podrien estar intervenint.

Per a acabar de determinar les diferències de susceptibilitat a altres compostos, s'ha testat l'EDTA sobre les mateixes soques (Figura 32). L'EDTA és un agent quelant que segresta els ions divalents de la ME, provocant repulsions electrostàtiques entre les molècules de LPS i portant a un desbalanç estructural de la ME degut a la pèrdua de LPS en la superfície (222).

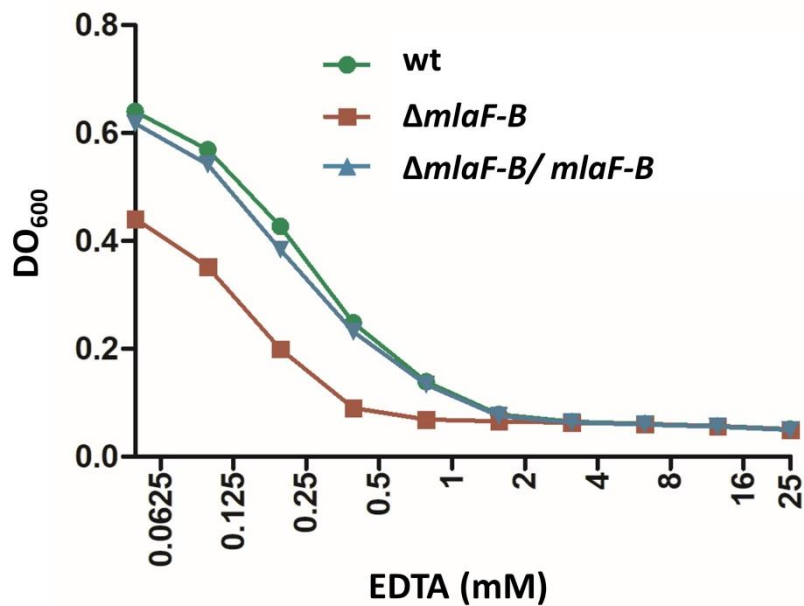


Figura 32. Estudi de sensibilitat a EDTA en plaques de 96 pous. Es representa la DO₆₀₀ mesurada després de 24 hores per a cada concentració d'EDTA.

Paral·lelament, la CMI a EDTA s'ha determinat en 3,125 mM per a les soques salvatge i complementada, mentre que per la soca mutant ha estat 0,78 mM, una reducció de 4-fold. El resultat és esperable, donat que en una condició de membrana danyada o alterada (per mala funció del sistema Mla) l'efecte de l'EDTA s'incrementa, resultant en un augment de la sensibilitat a aquest agent quelant.

En aquesta secció s'ha demostrat la importància del sistema Mla en *S. maltophilia* per a mantenir la integritat de la membrana, actuant com a un sistema important per a la protecció de la cèl·lula front compostos i agents tòxics.

4.3.3. Alteració de la formació de biofilm en el mutant Mla

Després de determinar canvis en els patrons de resistències deguts a una ME amb la integritat compromesa, el següent pas ha estat avaluar la capacitat formadora de biofilm en diferents condicions i amb diferents mètodes. Ja s'ha observat en algunes espècies que la deleció d'algun dels components del sistema Mla porta a una reducció en la formació de biofilm (218, 223).

L'aproximació més senzilla per avaluar la formació de biofilm és en plaques de microdilució, donat que és un mètode fiable i ràpid. En aquest treball s'ha determinat la formació de biofilm relativa en plaques de poliestirè tant en medi ric LB com en els medis mínims M9 i BM2 i en presència de colistina i EDTA en concentracions subinhibitòries, dos dels agents que prèviament s'han observat que afecten a les cèl·lules deficientes del sistema Mla (Figura 33).

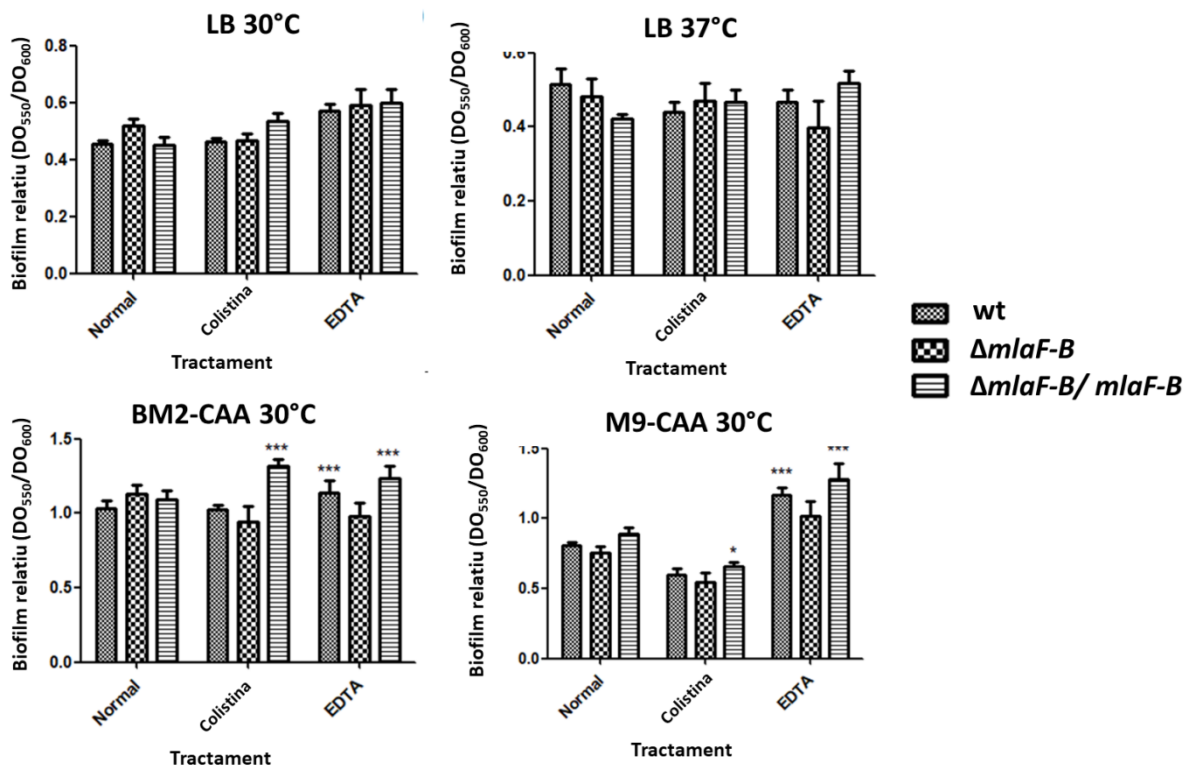


Figura 33. Estudi de la formació de biofilm en estàtic en plaques de 96 pous de poliestirè. Els panells superiors indiquen el biofilm resultant en medi ric LB a diferents temperatures (30°C, esquerra i 37°C, dreta). Els panells inferiors indiquen el biofilm resultant en medis mínims a 30°C (BM2, esquerra i M9, dreta). CAA fa referència als casaminoàcids utilitzats com a font de nitrogen en aquests medis. Per a cada condició, s'ha estudiat la formació de biofilm en presència de colistina i EDTA, tenint el control en el tractament "Normal" com a absència d'agent extern. * p-val < 0,05. *** p-val < 0,001 en un test de Tukey de comparacions múltiples.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En medi ric LB no s'han observat diferències en la formació de biofilm en cap de les condicions testades. Ni la temperatura, ni l'acció de la colistina o l'EDTA tenen efecte quan el creixement es dona en medi ric. En canvi, quan s'han utilitzat medis mínims, tals com el BM2 i el M9, s'ha observat que l'EDTA afecta lleugerament a la formació de biofilm relatiu, és a dir, el biofilm format en funció del creixement. El biofilm total en aquests casos també ha estat superior per a les soques salvatge i complementada. La colistina, en canvi, no sembla haver afectat a la formació de biofilm sota aquestes condicions. Una explicació a aquest fet podria ser que l'efecte de la colistina sobre les cèl·lules és ràpid, de minuts a poques hores, pel que les subpoblacions supervivents podrien seguir creixent de manera normal i acabant formant un biofilm relatiu similar a l'observat en condicions normals, sense agents externs. L'EDTA, d'altra banda, té un efecte permanent sobre l'estabilitat de la membrana i explicaria els resultats observats en aquest experiment.

Per a seguir aprofundint sobre la capacitat formadora de biofilm en aquestes soques, s'ha prosseguit a estudiar la formació de biofilm, també en estàtic, però en cambres μ -slide de 8 pous tractades amb un polímer (veure secció de mètodes) per a ser visualitzat en un microscopi confocal làser amb fluorescència. Les soques K279a salvatge, K279a Δ mIaFEDCB i K279a Δ mIaFEDCB/mIaFEDCB han estat marcades amb la variant més robusta de GFP sfGFP. En aquest cas, el medi triat ha estat BHI, donat que s'ha demostrat com el medi més robust per a estudiar la formació de biofilm *in vitro* en monocultiu i cocultiu (224). La formació de biofilm, tant en presència d'EDTA com sense ell, ha corroborat que la quantitat de biofilm de la soca K279a Δ mIaFEDCB és menor (Figura 34).

Concordant amb els resultats de la formació de biofilm en plaques de poliestirè de 96 pous, s'observa una formació de biofilm menor en el mutant Δ mIaFEDCB. Aquests biofilms s'han incubat durant 72 hores a 30°C en una atmosfera humida i el medi s'ha anat renovant cada 12 hores, pel que l'efecte inicial de l'EDTA sembla que ha estat clau en una menor adhesió de les cèl·lules a la superfície de la cambra, originant una quantitat menor de biofilm. Una explicació plausible a aquests fenotips observats té relació amb les primeres etapes de formació de biofilm, l'adhesió cel·lular a la superfície del material. En el cas de les cèl·lules deficientes del sistema Mla, aquesta interacció superfície-material es podria veure afectada, tot i que no ha estat objecte d'aquest treball determinar les causes d'aquestes observacions, principalment perquè la formació de biofilm en *S. maltophilia* és un procés que depèn també de condicions externes, com temperatura, pH, nivells d'oxigen, entre d'altres (10).

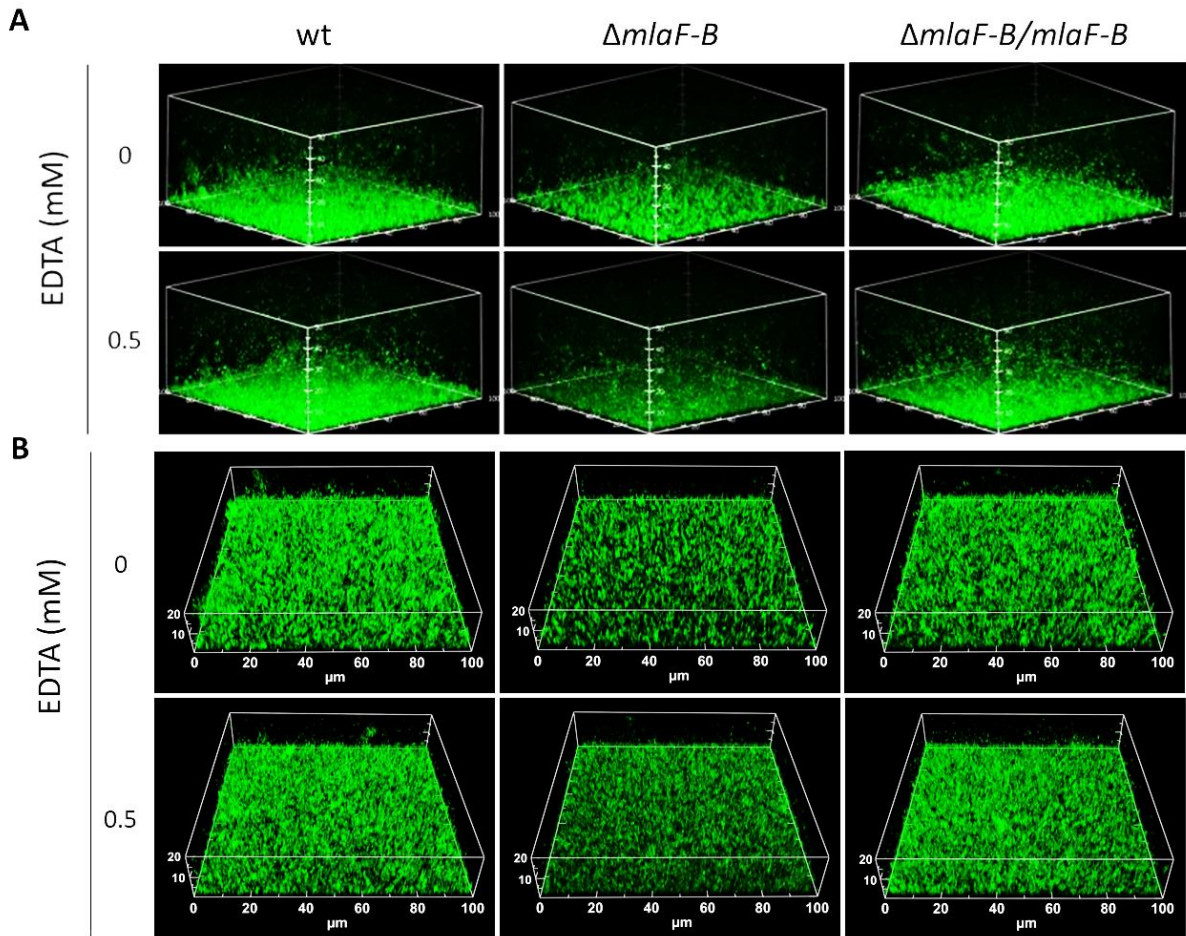


Figura 34. Formació de biofilm en medi BHI en cambres de 8 pous en presència i absència de EDTA 0.5 mM per a les soques salvatge (wt), el mutant $\Delta mIaFEDCB$ ($\Delta mIaF-B$) i el complementat $\Delta mIaFEDCB/mIaFEDCB$ ($\Delta mIaF-B/mIaF-B$) marcades amb sfGFP i visualitzades en un microscopi confocal. (A) Vista lateral del biofilm en 3D. (B) Vista superior del biofilm en 3D.

Per a determinar exactament la reducció de biofilm en les soques mutants pel sistema Mla, s'ha calculat el volum total de biofilm en les cambres utilitzades per a aquest experiment. Complementant els resultats observats en la Figura 34 s'observa una reducció aproximadament d'un 25% del biofilm en absència de Mla (Figura 35) tant em presència com absència d'EDTA en concentració subinhibitòria. Aquests resultats difereixen dels observats en la Figura 33, on no s'observaven diferències en medi ric sense EDTA. Tot i així, els resultats anteriors provenen de biofilms incubats 24 hores, mentre que els darrers provenen de 72 hores d'incubació. Tot i així, aquests resultats concorden amb els observats per a *A. pleuropneumoniae*, on únicament s'observaven diferències en la formació de biofilm pels mutants del sistema Mla a partir de les 24 hores d'incubació (223).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

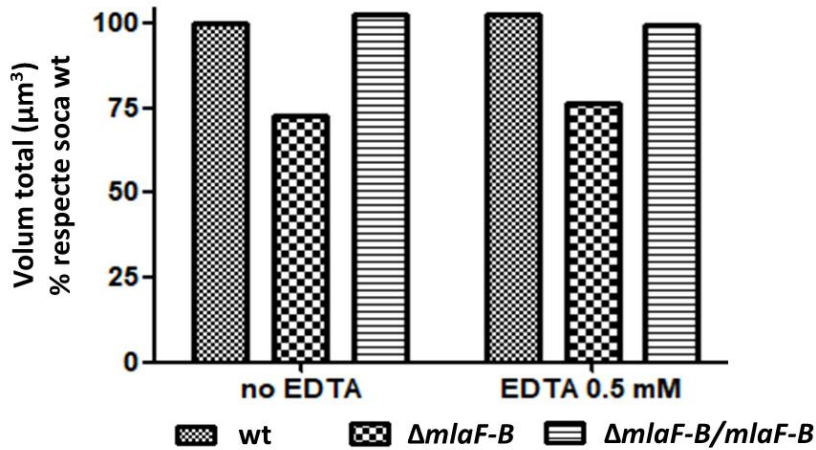


Figura 35. Volum dels biofilms finals observats en la Figura 34, calculat en μm^3 . El càlcul s'indica en referència al biofilm format per la soca salvatge (wt), establint-se com a 100%. Per a les soques mutades ($\Delta mlaF-B$) i complementades ($\Delta mlaF-B/mlaF-B$) s'indica el volum en forma de percentatge respecte la soca wt.

Tot i que hi ha treballs que han estudiat el biofilm en soques deficientes del sistema Mla indicant que la formació de biofilm es veu reduïda (142, 218, 223), també hi ha altres treballs on els mutants pel sistema Mla en produeixen més (225, 226). En el cas de *S. maltophilia*, sembla clar que la deficiència dels components Mla porten a una reducció de la formació de biofilm, com a mínim en les condicions aquí estudiades.

Finalment, per a tancar aquesta secció es va decidir també estudiar la formació de biofilm mixtes en presència de *P. aeruginosa*, un organisme que es colocalitza habitualment amb *S. maltophilia* en infeccions polimicrobianes (227).

Les soques marcades amb sfGFP de *S. maltophilia* es van incubar en les mateixes cambres μ -slide de 8 pous que en l'assaig de biofilm anterior amb la soca salvatge de *P. aeruginosa* PAO1 marcada amb la proteïna fluorescent pdTomato per a determinar com si el sistema Mla participa també en la resistència a compostos produïts exògenament per altres espècies (Figura 36). S'ha vist en molts treballs que *P. aeruginosa* és capaç de desplaçar altres microorganismes en cocultius *in vitro* i *in vivo* (228, 229), pel que s'ha volgut també determinar com afecta al creixement i establiment del biofilm de *S. maltophilia*. En treballs anteriors s'ha determinat que *S. maltophilia* pot afavorir l'establiment de *P. aeruginosa* i la seva virulència (227).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

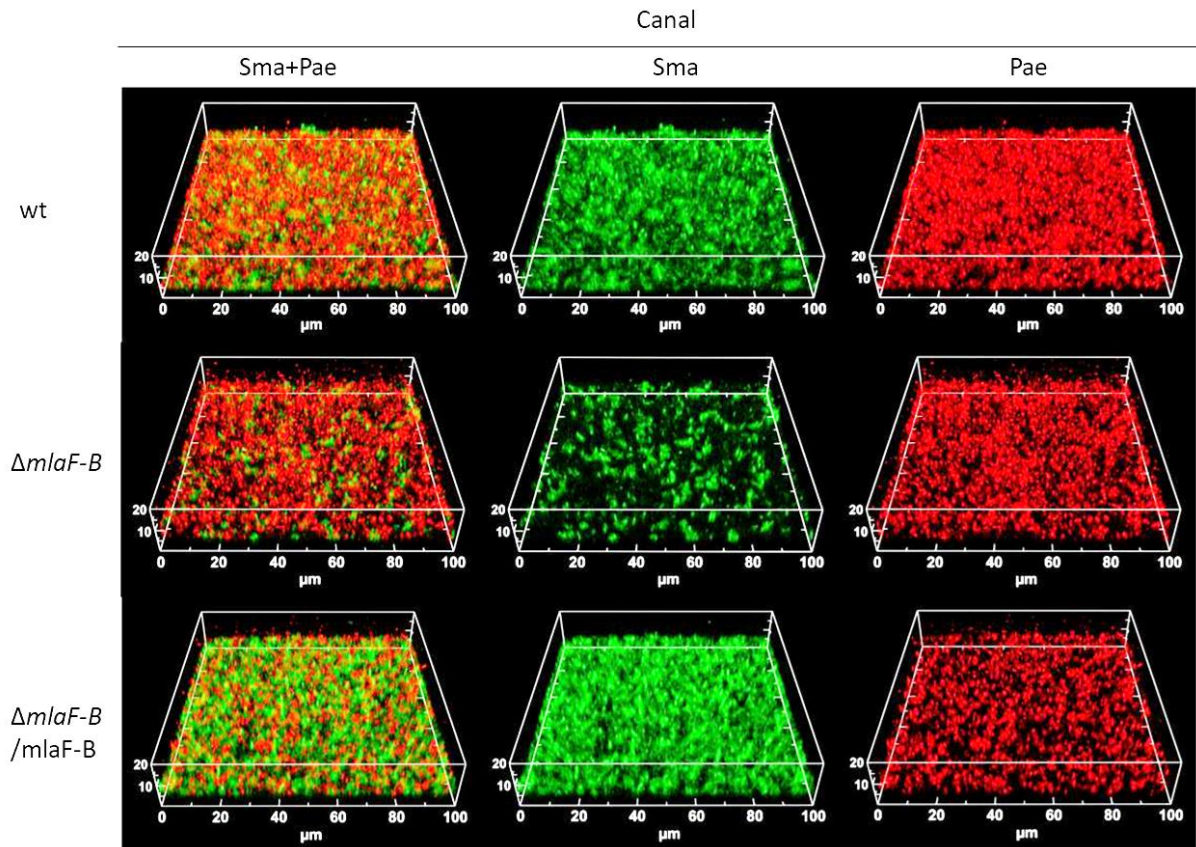


Figura 36. Biofilms mixtes de *P. aeruginosa* PAO1 marcada amb tdTomato i *S. maltophilia* K279a marcada amb sfGFP. En el panell superior el biofilm de PAO1 s'incuba juntament amb K279a salvatge (wt), en el panell central amb el mutant *mlaFEDCB* ($\Delta mlaF-B$) i en el panell inferior amb la soca complementada ($\Delta mlaF-B/mlaF-B$). La primera fila inclou tots dos canals de detecció (Sma, *S. maltophilia* i Pae, *P. aeruginosa*) la segona només el canal per *S. maltophilia* (Sma) i en la tercera només el canal per *P. aeruginosa* (Pae).

Tal i com s'havia observat en els biofilms monocultiu de *S. maltophilia*, el mutant K279a $\Delta mlaFEDCB$ produeix menys biofilm també en presència de *P. aeruginosa*, tot i que en aquest cas s'evidencia que la producció encara és menor. Els exoproductes de *P. aeruginosa* (com sideròfors i la senyal de QS HQNO) afecten al creixement d'altres microorganismes en cocultiu, competint per la disponibilitat ambiental d'oxigen (230). En *S. aureus* això provoca un canvi al metabolisme fermentatiu, tenint un impacte negatiu sobre el creixement (229). En el cas de *S. maltophilia* podria estar passant un efecte similar, tenint en compte que molècules de QS exògenes han demostrat induir una resposta a microòxia en els anàlisis transcriptòmic realitzat en la secció 1 d'aquest treball. En aquestes condicions estudiades, tot i que la viabilitat de *S. maltophilia* no es veu compromesa en presència de *P. aeruginosa* si que sembla que aquesta darrera pot competir amb *S. maltophilia*. Això s'observa millor en la Figura 37, on un biofilm mixte de les dues soques salvatges permet observar que hi ha una distribució força parella d'ambdues, tot i que a mesura que el biofilm creix la presència de *S. maltophilia* decreix. Això podria suggerir que les capacitats d'adhesió en la formació inicial del biofilm

no es veurien tant compromeses com el desenvolupament o creixement posterior, on *P. aeruginosa* competiria fortament amb *S. maltophilia*.

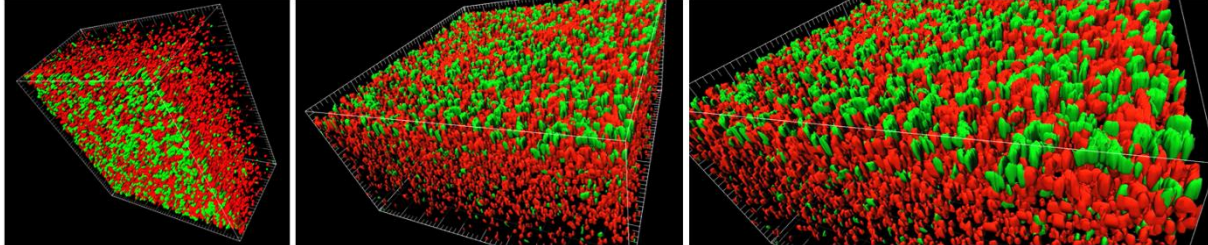


Figura 37. Biofilm mixte de les soques salvatges marcades amb proteïnes fluorescents de *S. maltophilia* (verd, sfGFP) i *P. aeruginosa* (vermell, tdTomato).

4.3.4. Alteració de la membrana externa i augment de la permeabilitat en mutants pel sistema Mla

Per a seguir estudiant els efectes d'agents externs sobre una membrana defectiva en el sistema de manteniment de l'asimetria de PLs, s'han cultivat les soques de *S. maltophilia* salvatge, mutant i complementada en presència de EDTA per a ser observades per microscòpia. L'objectiu d'aquesta secció ha estat determinar canvis morfològics en l'estructura cel·lular.

El primer pas ha inclòs l'observació en un microscopi electrònic de rastreig (SEM, *scanning electron microscope*) de cultius incubats amb i sense EDTA en la concentració subinhibitòria de 0,5 mM (Figura 38). En condicions normals de cultiu, sense la presència de cap agent extern, les cèl·lules s'observen amb una morfologia normal, amb la forma característica de bacil de *S. maltophilia*. Tot i tenir un sistema Mla deficient, no s'han observat diferències morfològiques ni estructurals per a les cèl·lules $\Delta mlaFEDCB$ en absència d'EDTA, suggerint que o bé hi ha altres sistemes implicats en el manteniment de l'asimetria de la ME, o bé que la pèrdua d'aquests components no és crítica per a mantenir la integritat de la membrana.

En canvi, quan les cèl·lules s'han incubat prèviament amb EDTA les cèl·lules han presentat canvis morfològics significatius, inclús trets que indiquen la reducció de la viabilitat fisiològica cel·lular. Les cèl·lules $\Delta mlaFEDCB$ en presència d'EDTA han adoptat una morfologia més aviat esfèrica i de mida reduïda, observant-se protuberàncies en algunes d'elles. En les imatges ampliades s'observa un augment de la rugositat de la membrana, probablement causada per l'acumulació de vesícules de membrana externa, i també de forats a algunes cèl·lules. Això podria induir la formació de cèl·lules fantasma (*bacterial ghost cells*), on per diferents motius hi ha un trencament de la membrana i les

cèl·lules perden tot el seu material citoplasmàtic i nucleic per mantenir l'estructura de l'envolta (231).

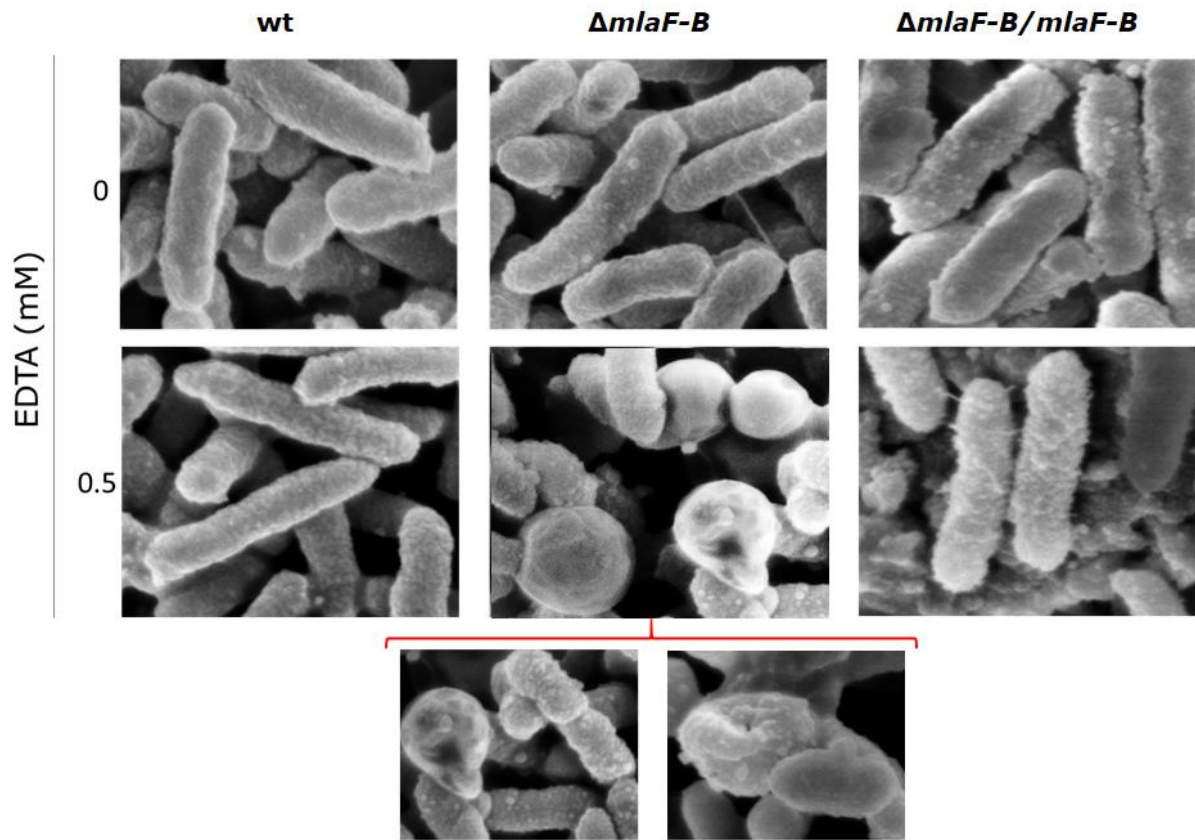


Figura 38. Imatges representatives de cultius de *S. maltophilia* salvatge (wt), Δ mlaFEDCB (Δ mlaF-B) i Δ mlaFEDCB/mlaFEDCB (Δ mlaF-B/mlaF-B) en absència i presència de 0,5 mM EDTA observades al SEM. Es mostren també imatges ampliades per a la soca Δ mlaF-B per a millorar la visualització de trets característics.

També podrien estar formant-se esferoplasts, on per mecanismes físics o enzimàtics (en aquest cas per efecte de l'EDTA) és perd la membrana externa i en ocasions també la paret cel·lular (232).

També s'ha realitzat el mateix experiment utilitzant la colistina com a agent tòxic en comptes de l'EDTA, i no s'han observat diferències en cap de les soques ni condicions. Aquests resultats poden respondre a la resistència heterogènia que s'ha observat en *S. maltophilia* per a aquest antibiòtic (22). El que s'hauria observat en les imatges de microscòpia resultants dels cultius incubats amb colistina serien les subpoblacions supervivents a l'efecte de l'antibiòtic, adoptant un fenotip de resistència i per tant creixent sense problemes morfològics.

Per tal de determinar com d'afectada està la permeabilitat de la membrana en els mutants Δ mlaFEDCB s'ha decidit realitzar un assaig de detecció de la permeabilitat de membrana mitjançant la sonda fluorescent NPN, tal i com es descriu en la secció de mètodes. En aquest treball s'ha estudiat

RESULTATS I DISCUSSIÓ

aquesta permeabilitat per a les soques salvatge (wt), la mutant $\Delta mlaFEDCB$ ($\Delta mlaF-B$) i complementada ($\Delta mlaF-B/mlaF-B$) (Figura 39).

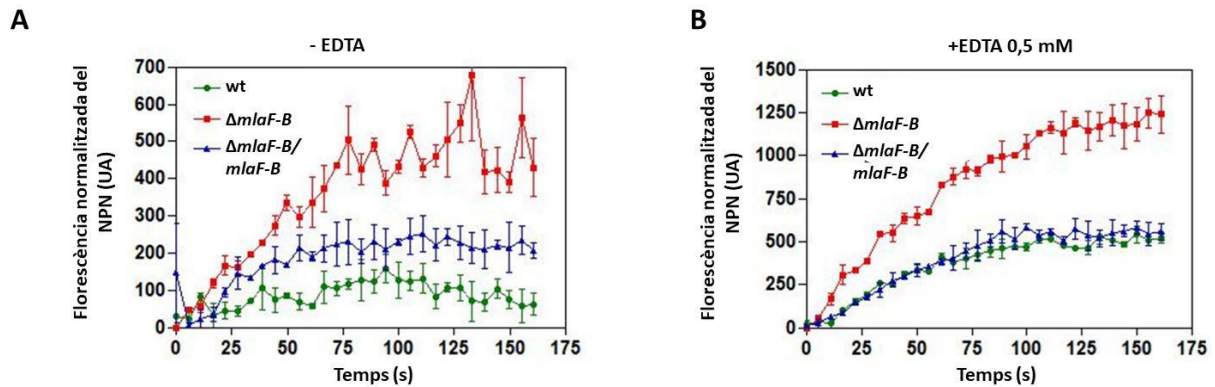


Figura 39. Assaig de permeabilitat NPN per a les soques del sistema Mla: salvatge (wt), mutant $\Delta mlaFEDCB$ ($\Delta mlaF-B$) i complementada $\Delta mlaF-B/mlaF-B$ ($\Delta mlaF-B/mlaF-B$). (A) Assaig NPN en condicions normals, sense EDTA. (B) Assaig NPN en presència de EDTA 0,5 mM.

L'assaig NPN permet confirmar que el sistema Mla està implicat en el manteniment de la permeabilitat de la OM. Sense la presència de cap agent extern, s'observen diferències evidents i significatives ($p < 0,001$ amb una comparació post-test de *Dunn*) entre les soques salvatge i complementada i la soca defectiva $\Delta mlaFEDCB$ (Figura 39A). Tot i així s'ha volgut també testar l'efecte de l'EDTA, agent que afegeix més pressió sobre l'estabilitat de la ME. En presència d'EDTA les diferències de permeabilitat entre les ME de la soca salvatge i la mutant encara s'evidencien més (Figura 39B), confirmant la implicació d'aquest sistema en una correcta integritat de la membrana.

Per a tancar l'estudi de la permeabilitat de la membrana i els canvis morfològics dependents del sistema Mla, s'han observat també les cèl·lules tractades amb EDTA en un microscopi de transmissió (TEM, *Transmission scanning microscope*), per tal de confirmar les evidències que suggerien les imatges amb el SEM de l'aparició de cèl·lules buides de contingut intracel·lular.

Les imatges al TEM de cultius de *S. maltophilia* incubats amb 0,5 mM d'EDTA indiquen que pel mutant $\Delta mlaFEDCB$ algunes cèl·lules perden tot el seu contingut intracel·lular per inestabilitat de la membrana (Figura 40). Es tornen també a observar les morfologies esfèriques com han indicat prèviament les imatges obtingudes pel SEM, inclús en una de les cèl·lules s'observa el que podria ser una perforació de la membrana per on hauria escapat tot el contingut intracel·lular (assenyalat amb una fletxa vermella).

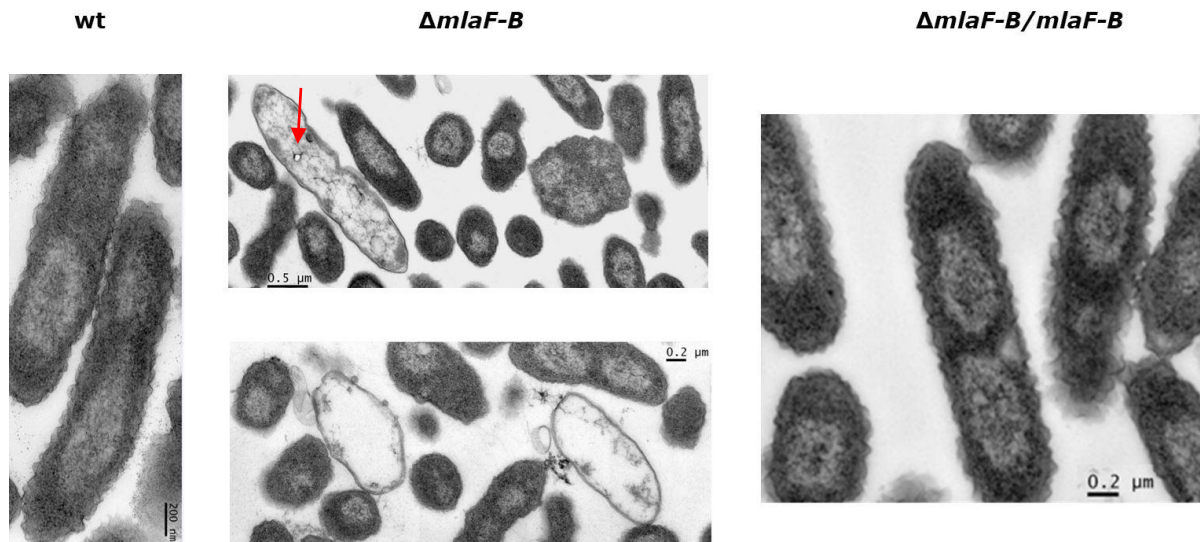


Figura 40. Imatges representatives de cultius de *S. maltophilia* salvatge (wt), $\Delta mlaFEDCB$ ($\Delta mlaF-B$) i $\Delta mlaFEDCB/mlaFEDCB$ ($\Delta mlaF-B/mlaF-B$) en absència i presència de 0,5 mM EDTA observades al TEM. La fletxa vermella indica un possible forat a la cèl·lula.

També sembla que les imatges del mutant $\Delta mlaFEDCB$ mostren cèl·lules sense ME, a raó de la comparació amb les imatges de la soca salvatge i la complementada. En aquestes, s'observen membranes amb moltes ondulacions, degudes probablement tant a l'efecte de l'EDTA com a la preparació de la mostra, on hi ha alguns passos de fixació i deshidratació. En les cèl·lules buides del mutant $\Delta mlaFEDCB$ no s'observa aquesta característica, suggerint per tant una pèrdua total de la ME.

Els resultats d'aquesta secció permeten confirmar que la pèrdua del sistema Mla en *S. maltophilia* torna les cèl·lules molt més sensibles a l'acció de compostos tòxics externs, tot i que no sembla un fenotip crític en condicions normals. Tot i així, en condicions ambientals normals, on hi ha una gran presència i diversitat d'altres organismes, el sistema Mla jugaria un paper clau en el manteniment de la membrana i la protecció de les cèl·lules a exoproductes d'altres espècies convivents habituals de *S. maltophilia*, com *P. aeruginosa* o *B. cenocepacia*.

4.3.5. Contingut total d'àcids grassos en el mutant Mla

En aquest treball s'ha volgut determinar si existeixen diferències en la composició total de FAs entre les socas salvatge i la defectiva en el sistema Mla. Tot i que el sistema Mla no participa en la síntesi de FAs, degut a les implicacions que té en el transport de PLs, s'ha volgut determinar la possible relació amb el contingut de FAs total. Com es descriu en la secció de mètodes, cultius per triplicat de les tres soques s'han recollit en fase exponencial mitjana-tardana ($DO_{600} = 1,5$) per determinar la composició mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS). També s'ha

RESULTATS I DISCUSSIÓ

avaluat la composició en altres punts del creixement, com l'inici de la fase exponencial ($DO_{600} = 0,8$) i fase exponencial ($DO_{600} = 5$), tot i que els resultats han estat pràcticament idèntics, pel que no s'han inclòs en la representació (Figura 41).

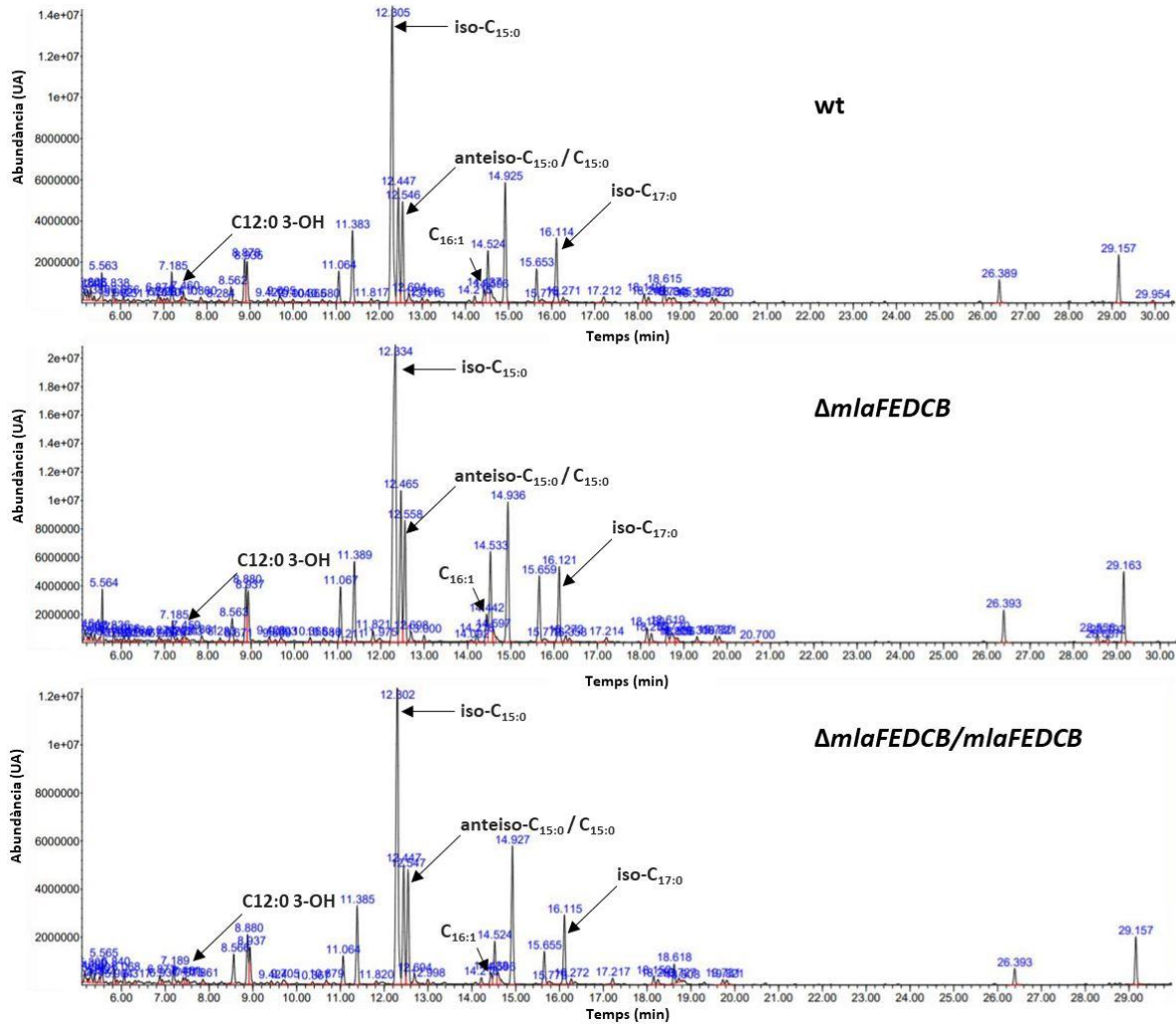


Figura 41. Anàlisi de la composició total d'àcids grassos en les soques de *S. maltophilia* K279a wt (superior), $\Delta mlaFEDCB$ (mig) i $\Delta mlaFEDCB/mlaFEDCB$ (inferior), determinat per GC-MS. S'indiquen les espècies més probables d'acord amb el temps de retenció.

S'ha determinat que la composició de FAs no varia entre cap de les soques testades, com s'havia hipotetitzat. Els pics amb major abundància relativa s'han associats a les espècies més probables, tot que no s'han mostrat tots en la figura, es recull la informació en la Taula Annex M. Els FAs amb major abundància en totes les soques han estat el iso-C_{15:0}, C_{16:1}, anteiso-C_{15:0} / C_{15:0}, C_{12:0} 3-OH i iso-C_{17:0}. Aquests resultats són similars als obtinguts prèviament amb altres soques de *S. maltophilia*, però tal i com s'havia observat, la composició varia lleugerament entre soques (86).

4.3.6. Rol de la proteïna d'unió a substrat MlaC en el transport de fosfolípids

Finalment, s'ha volgut estudiar el paper que té la proteïna MlaC en el transport de PLs en *S. maltophilia*. El paper d'aquesta proteïna transportadora periplàsmica ha estat àmpliament discutit en la literatura, on ja s'ha demostrat que té alta afinitat per diferents PLs, en funció del contingut de PLs de cada espècie. Per exemple, en el cas de MlaC de *P. aeruginosa*, s'ha detectat la capacitat d'unir diferents PLs, incloent PG, PE i CL (142). Resultats similars s'han observat per a les proteïnes MlaC de *E. coli* (233), *A. baumannii* (226) i *R. solanacearum* (141). La producció i purificació de MlaC es detalla en la secció de mètodes. Resumidament, s'ha clonat (sense el pèptid senyal) en un vector pET28b amb una marca de polihistidina (*his-tag*) en l'extrem N-terminal i produïda en *E. coli* BL21(DE3), obtenint-se una bona quantitat de proteïna purificada (Figura 42).

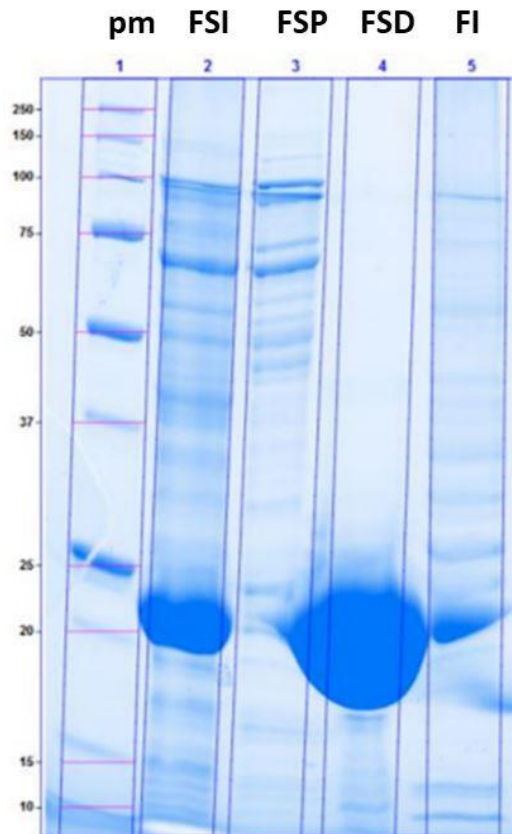


Figura 42. Purificació de la proteïna MlaC de *S. maltophilia* (*smlt4673*) produïda en *E. coli* BL21(DE3). Pm: pes molecular del patró; FSI: fracció soluble inicial; FSP: fracció soluble després de la purificació; FSD: fracció soluble després de dialitzar; FI: fracció insoluble.

El següent pas ha estat analitzar els PLs que carrega la proteïna MlaC purificada, per tal de determinar les possibles espècies que pot unir, tot i que ha estat produïda heterològament en *E. coli*.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Després de la preparació de la mostra, l'anàlisi s'ha realitzat per espectrometria de masses acoblada a un espectròmetre LTQ FT per a determinar la composició de PLs (Figura Annex 1). El resum dels PLs detectats s'ha recollit per a una millor visualització en la Taula 12.

Tot i que l'assaig no s'ha realitzat en condicions natives (MlaC expressada heteròlogament en *E. coli*), s'observen diferents espècies de PLs com a probables que poden ser reconegudes i unides per MlaC de *S. maltophilia*.

Taula 12. PLs detectats per MS en condicions desnaturalitzants. S'indica el mode (negatiu o positiu) i els valors m/z associats a las espècies de PLs més probables d'acord amb la base de dades <https://lipidmaps.org>.

[M-H]-	PLs	[M+H]²⁺	PLs
585,5107	PI (O-18:0)	549,538	ND
613,5421	PI (O-20:0)	563,516	PA (12:0/14:1)
661,4176	PG (14:1/14:1)	651,605	PG (12:0/15:1)
693,4721	PG (14:0/16:0)	677,602	PG (14:1/15:1)
	PG (15:0/15:0)		
719,4877	PG(15:0/17:1)	690,538	PC (18:0/11:1)
	PG (13:0/19:1)		PC (12:0/17:1)
733,5035	PG (14:1/18:0)	704,558	PC (12:0/18:1)
	PG (13:0/20:1)		PC (14:0/16:1)
747,5191	PG (15:0/18:1)	716,551	PE (16:0/18:2)
	PG (16:0/18:1)		PC (14:0/17:2)
773,535	PG (14:0/20:1)	718,57	PE (16:0/18:1)
	PG (18:1/18:1)		PC (15:0/16:1)
	PG (14:0/22:2)	730,561	PE (15:0/20:2)
			PC (14:0/18:2)
[M-2H]²⁻	PLs		
914,2949	ND	778,5645	PS (14:0/21:0)
			PS (20:0/15:0)
		744,556	PC (15:0/18:2)
			PS (15:0/18:3)

* PI = fosfatidilinositol, PG = fosfatidilglicerol, PA = àcid fosfàtic, PC = fosfatidilcolina, PE = fosfatidiletanolamina, PS = fosfatidilserina.

El següent pas ha estat aconseguir una proteïna MlaC delipidada per a poder realitzar assajos d'unió de PLs sintètics. Per a tal efecte la proteïna nativa (amb PLs) es va analitzar utilitzant un espectròmetre MALDI-TOF/TOF. També es va analitzar la proteïna després de delipidar-la via HPLC (Figura 43).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

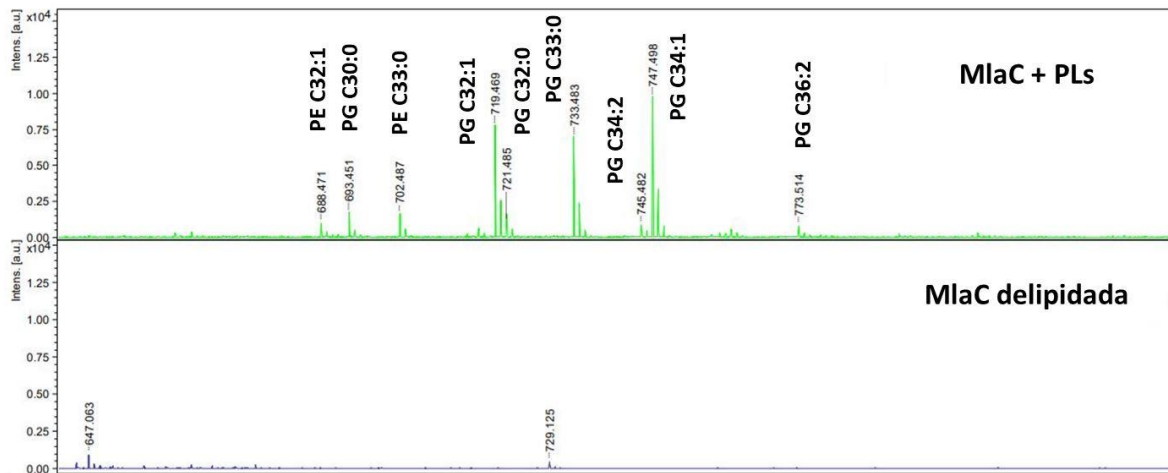


Figura 43. Anàlisi MALDI-TOF/TOF en mode negatiu de la proteïna MlaC de *S. maltophilia* amb els PLs units (panell superior) i després de delipidar-la mitjançant HPLC (panell inferior). S'indiquen les espècies més probables de PLs *d'E.coli* pels pics majoritaris.

Els PLs més probables que uneix MlaC de *S. maltophilia* són dels tipus PG i PE, com s'ha descrit anteriorment per altres proteïnes MlaC. Finalment, s'ha volgut demostrar la unió a PLs mitjançant la tecnologia de termoforesi de microescala (MST) per mitjà de gradients de temperatura que permet determinar la constant K_D (afinitat d'unió). S'han testat les variants de PE C14/C14 i C16/C16 tant per MST com per nanoDSF (fluorimetria diferencial) (Figura 44).

Per a la PE C16 no s'ha observat unió a MlaC en cap dels dos assajos realitzats. En el cas de la PE C14 tots dos assajos indiquen unió a MlaC, establint per MST una K_D de 795 μM , el que indica una afinitat baixa per a aquest PL.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

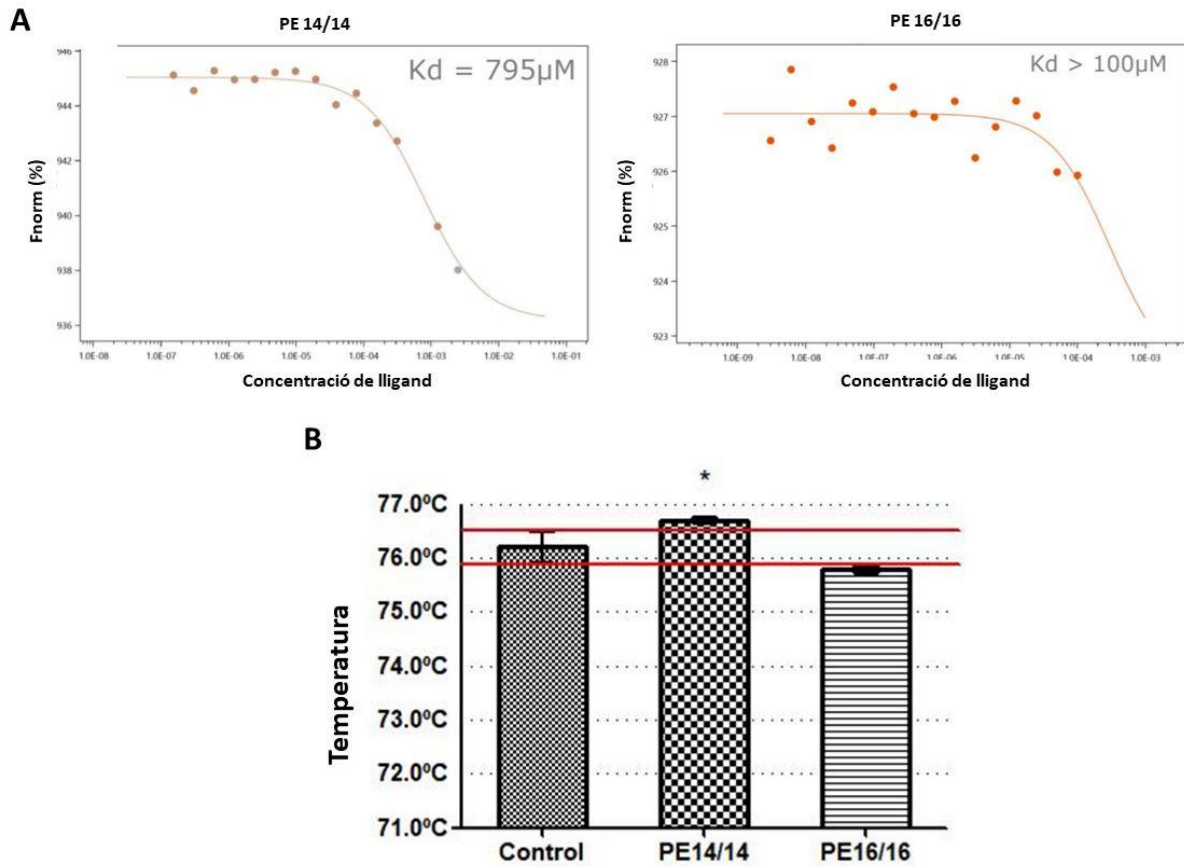


Figura 44. Assaig d'unió de MlaC a dos PLs (PE 14/14 i PE 16/16). (A) Anàlisi mitjançant MST, que implica monitoritzar la fluorescència emesa per la proteïna marcada a través d'un microgradient de temperatura. S'analitza la fluorescència emesa en comparació amb la proteïna sense compost (f_{norm}). (B) Anàlisi mitjançant nanoDSF, que implica monitoritzar la temperatura de fusió de la proteïna en absència i presència de cada compost. Es considera significat la unió a compost si hi ha una diferència de 0,5°C en comparació amb el control. *indica unió potencial.

5.DISCUSSIÓ GENERAL

5. DISCUSSIÓ GENERAL

En aquest treball s'ha estudiat fonamentalment la resposta a la densitat poblacional i a dos tipus de senyals de QS de *S. maltophilia* i posteriorment s'han caracteritzat dos sistemes relacionats amb la fisiologia i homeòstasi lipídica en aquesta espècie, el regulador transcripcional SmIt2053 relacionat amb el metabolisme de FAs i el sistema de transport de PLs Mla. Tots aquests sistemes s'han caracteritzat per tal de determinar la implicació que poden tenir com a factors de virulència i resistència a antimicrobians. El model final proposat es resumeix en la Figura 45.

Els senyals de QS de tipus DSF i AHL, utilitzats en aquest treball, utilitzen metabòlits intermediaris del metabolisme de lípids. D'una banda, el DSF es sintetitza mitjançant la proteïna RpfF, que té activitats tioesterasa i deshidratasa. RpfF actua sobre les molècules de 3-hidroxi-11-metil-dodecanoil-ACP que provenen del cicle d'elongació de FAs en dos passos, convertint el precursor en àcid cis-11-metil-2-dodecenoic, el senyal DSF (95). La metilació en el carboni 11 probablement prové de l'aminoàcid ramificat leucina (98). Cal destacar que tant el DSF com el iso-C_{15:0} (àcid isopentadecanoic), el FA més abundant en *S. maltophilia*, es generen a través de la mateixa ruta biosintètica (86, 101). Les sintases de senyals de tipus AHL utilitzen com a substrats la S-adenosilmetionina (SAM) i una cadena acil-ACP, d'on obtenen l'anell lactona i la cadena acil, respectivament (234).

S. maltophilia produeix de manera endògena el senyal de tipus DSF, tot i que s'ha observat la presència de dues variants del clúster *rpf* en aquesta espècie. Les variants *rpf-1* produeixen DSF de manera similar a *Xanthomonas*, compartint els aspectes mecànics i de percepció, mentre que les variants *rpf-2* només produeixen DSF en presència d'altres productors del senyal (87, 92).

En aquest període de Tesi doctoral s'ha identificat la resposta de *S. maltophilia* als senyals de QS de tipus AHL i DSF per entendre els mecanismes que regula el QS en aquesta espècie (secció 4.1). S'ha utilitzat com a model la soca K279a, una variant *rpf-1*, i per tant productora de DSF. La inducció amb DSF, però, s'ha donat en un moment del creixement on no hi ha producció d'aquest senyal, que és màxima en l'inici de la fase estacionària (78). Per contra, en *S. maltophilia* no s'ha caracteritzat una sintasa d'AHLs però conté el regulador de tipus LuxR *solo* SmoR, capaç de sensar com a mínim la senyal 3-oxo-C8-HSL produïda per altres espècies (115).

La inducció amb DSF ha permès identificar l'expressió diferencial de 58 gens, mostrant només 2 d'ells una menor expressió en presència de DSF, tot i que no s'ha pogut determinar cap relació amb processos coneguts relacionats amb el QS basat en DSF. Dels 56 gens amb sobreexpressió en presència de DSF s'ha observat que la majoria es categoritzen dins els processos energètics

DISCUSSIÓ GENERAL

cel·lulars. Les categories COG més sobrerrepresentades són el metabolisme de lípids, aminoàcids i el transport de ions. Aquesta inducció del metabolisme cel·lular relacionat amb la captació i utilització de nutrients essencials s'ha observat també en l'espècie relacionada *Xanthomonas citri* durant les primeres etapes d'infecció *in planta* (183). Resultats en *X. campestris* indiquen també una regulació del metabolisme general cel·lular, especialment la utilització de nutrients, coordinada pel sistema Rpf (235). Aquests resultats indiquen que el DSF modula diversos factors de virulència, incloent gens implicats en metabolisme, resposta a l'estrès i regulació de la transcripció, per a promoure l'adaptació a l'ambient complex que es troba en processos d'infecció. Tant el gènere fitopatogen *Xanthomonas* com *Stenotrophomonas*, habiten nínxols altament complexes amb la presència de diferents comunitats bacterianes. Tenir sistemes de detecció de senyals produïdes exògenament es presenta com una adaptació positiva que permet regular fortament l'expressió gènica i adaptar-se als canvis ambientals (56, 236).

Contràriament a les observacions del DSF, amb pocs DEGs, la inducció amb AHLs ha determinat l'expressió diferencial de 555 gens, trobant-se 271 sobreexpressats i 284 infraexpressats. Tot i així la classificació en categories COG permet determinar que la majoria de processos regulats per AHLs en *S. maltophilia* estan relacionats també amb el metabolisme energètic. També s'ha observat sobrerrepresentació de gens implicats en processos de regulació transcripcional, possiblement modulats per SmoR, entre d'altres. Sorprenentment, s'ha observat un solapament de diversos gens que apareixen desregulats tant en presència d'AHLs com DSF, suggerint una resposta comuna global de la cèl·lula a aquestes senyals. Aquest fet s'ha descrit en espècie del gènere *Burkholderia* que utilitzen sistemes de QS basats en AHLs i BDSF. En *B. cenocepacia* s'han observat gens regulats positivament per BDSF que també estan regulats pel sistema d'AHLs CepIR, el que indica que els dos senyals són necessaris per una expressió total d'algunes funcions cel·lulars (237, 238). En aquests treballs s'ha determinat que la producció d'AHLs està regulada pels nivells de BDSF ja que el mutant de la sintasa de BDSF produeix menys AHLs que la soca salvatge, i la producció es restableix parcialment en presència de BDSF exogen (238). Aquesta regulació ve mediada pel regulador de BDSF RpfR, que influeix els nivells intracel·lulars de c-di-GMP que regulen l'expressió de la sintasa d'AHLs CepI a través del regulador GtrR (239, 240).

Donat el solapament d'un nombre important de gens induïts tant per AHLs com DSF s'ha postulat la existència d'un regulador comú que expliqui aquesta resposta. Una cerca de motius d'unió al DNA entre els gens comuns a AHL i DSF ha identificat el lloc d'unió al DNA canònic del regulador Anr/Fnr. Anr és un regulador clau que s'activa en condicions de baixa disponibilitat d'oxigen, ja que aquest actua com a regulador negatiu de la seva transcripció (241). També aquest regulador està estimulat pels productes del catabolisme de la fosfatidilcolina (242). Anr actua dirigint el creixement en

DISCUSSIÓ GENERAL

condicions anòxiques a través de vies de denitrificació o per respiració microaeròbica (243). En *P. aeruginosa*, mutants del regulador LasR tenen un increment en l'activitat d' Anr (192, 195). S'ha demostrat que Anr regula directament HemN, una coproporfirinogen III oxidasa, i forma part del reguloma *core* en el gènere *Pseudomonas* (193). En aquest treball HemN (smlt1690) s'ha observat que presenta el motiu d'unió a Anr i es troba altament sobreexpressat en presència de DSF i AHLs, mentre que es troba infraexpressat en el mutant SmoR. El mateix patró s'observa per a la hemeritrina Mhr (Smlt1574), que també forma part del reguló d'Anr en *Pseudomonas* i que ajuda el *fitness* bacterià en condicions de baixa disponibilitat d'oxigen, captant-lo i transportant-lo (195). Aquests resultats evidencien la relació entre QS i Anr també en *S. maltophilia*, actuant com a resposta a ambients d'alta densitat cel·lular, on tenir estratègies per suplir la manca d'oxigen pot ser un avantatge per a la població.

Adicionalment, per a confirmar que la resposta observada en presència d'AHLs està mediada per SmoR, s'ha volgut caracteritzar el seu reguloma. Aquest regulador està implicat, segons la classificació COG, en processos metabòlics, especialment de carbohidrats i transport d'ions, així com en vies de transducció de senyal i en vies de biogènesi de la membrana. La classificació de termes KEGG també apunta a una presència important de gens relacionats amb el metabolisme d'aminoàcids i lípids. SmoR està identificat com a un regulador de tipus LuxR *solo* (115). Aquests reguladors no tenen una sintasa de tipus LuxI coneguda i poden respondre a una gran varietat de senyals produïts per altres espècies bacterianes, inclús molècules produïdes per eucariotes (41, 116). En l'espècie relacionada *X. oryzae* s'han descrit dos LuxR *solo*, OryR i XocR, que uneixen senyals produïts per les plantes que colonitzen (244, 245). També, en *X. campestris* s'ha descrit el regulador XccR que també regula processos de virulències (246). SmoR en *S. maltophilia* com a mínim permet sensar la molècula 3-oxo-C8-HSL, tot i que no es descarta que pugui unir altres variants AHL (115). El reguloma comú de SmoR i AHLs en les condicions estudiades inclou 86 gens (17 si s'inclou el reguloma de DSF), que tornen a posar de manifest la relació amb el metabolisme energètic i el metabolisme del nitrogen, probablement a través del regulador Anr.

Finalment, s'ha detectat una elevada presència de gens sobreexpressats en el mutant SmoR que estan regulats per Fur (*ferric uptake regulator*), el qual regula l'expressió gènica coordinada en resposta als nivells disponibles de ferro. En condicions de disponibilitat de ferro el complex Fur-Fe²⁺ s'uneix als gens diana (implicats en captació de ferro i síntesi de sideròfors) reprimint la seva expressió. Per contra, quan els nivells són baixos Fur s'allibera de les zones promotores i s'activa l'expressió dels gens diana (247). En *S. maltophilia*, el ferro s'ha demostrat que regula negativament la producció de DSF, probablement a través de Fur. A més, la disponibilitat de ferro es postula com el mediador d'alguns dels fenotips regulats per DSF, com la formació de biofilm, la resposta a l'estrès

oxidatiu i l'expressió de proteïnes de membrana (102). Mentre que la presència de ferro regula negativament la producció de DSF aquests resultats indiquen que l'absència del regulador SmoR indueix un estat de baixa disponibilitat de ferro. En aquest sentit el regulador SmoR actuaria positivament sobre Fur reprimint l'expressió dels gens diana. En absència de SmoR, l'activació de Fur seria menor i per tant s'expressarien gens (sideròfors i transportadors de ferro) encarregats d'augmentar la seva disponibilitat. Tot i així, no es pot descartar que hi hagi un mecanisme independent, o la presència d'altres reguladors que afegixin complexitat al sistema. En altres espècies hi ha resultats contradictoris. Per una banda la acumulació de molècules de QS acostuma a reprimir la síntesi de sideròfors, tot i que en *P. aeruginosa* s'ha reportat un augment de la producció en resposta a QS (248). Calen més estudis per poder establir una relació entre el QS i el ferro en *S. maltophilia*.

La segona part d'aquest treball ha permès la identificació i caracterització del regulador Smlt2053, un ortòleg de PsrA de *P. aeruginosa*. En aquest capítol l'objectiu ha estat caracteritzar el regulador Smlt2053, derivat dels resultats del capítol 1 on s'ha vist sobreexpressat en totes les condicions estudiades. Aquest regulador de tipus TetR està sobreexpressat en la fase estacionària del creixement, en presència de les senyals de QS DSF i AHLs i també en el mutant del regulador d'AHLs SmoR. En *P. aeruginosa*, PsrA controla positivament la producció de PQS reprimint gens implicats en la β -oxidació, específicament de l'homòleg de FadE PA0506, augmentant la concentració disponible del precursor octanoil-CoA necessari per a la síntesi de PQS (249). PsrA també està implicat en la regulació de la β -oxidació, el *fitness* epifític, QS, biosíntesi d'antibiòtics, i dels reguladors LexA i RpoS (185, 201, 202, 249–251). Smlt2053 és ortòleg de PsrA, però l'organització és diferent. En *S. maltophilia* *smlt2053* està formant operó amb *smlt2052* i *smlt2051*, que són homòlegs de FadB i FadA, respectivament. Aquesta organització també s'observa en l'espècie relacionada *X. campestris*. La cerca *in silico* del motiu d'unió a DNA de PsrA ha determinat que Smlt2053 utilitza la mateixa seqüència palindròmica en *S. maltophilia* i *X. campestris*, indicant que probablement la funció de Smlt2053 en aquestes espècies pot ser semblant a la reportada per PsrA.

La caracterització fenotípica de Smlt2053 només ha permet associar Smlt2053 a la formació de biofilm, ja que el mutant produeix menys que la soca salvatge, mentre que la soca amb còpies extres de *smlt2053* té una formació lleugerament major. Aquest resultat concorda amb el que s'ha observat a *P. aeruginosa* (203).

També ha estat objecte d'aquest treball identificar el reguloma de Smlt2053. Només 17 gens han presentat expressió diferencial entre la soca mutant i la salvatge, associant-se la majoria dels gens al metabolisme lipídic i la resposta a estrès. Els gens que localitzen amb *smlt2053* a l'operó (*fadA* i *fadB*)

s'han trobat sobreexpressats en el mutant, suggerint una regulació negativa per Smlt2053, com s'ha descrit en *Pseudomonas* (201). També han aparegut desregulades xaperones relacionades amb la resposta a l'estrès, posant de manifest novament la implicació d'aquest sistema en una regulació del *fitness* cel·lular més enllà de la β -oxidació i la utilització de FAs com a font de nutrients. És també rellevant la presència en aquest RNA-Seq dels gens *smlt0264* i *smlt2944*, que han aparegut prèviament com a part dels 10 gens més sobreexpressats en presència de DSF i AHLs. *Smlt0264* forma un operó amb altres gens (*smlt0264-smlt0268*) que s'han relacionat amb el sistema de l'àcid cis-2-decenoic (cis-DA) de *P. aeruginosa*. Aquest sistema cis-DA és membre de la família de senyals de DSF i funciona com un autoinductor de la dispersió de biofilm (85). També s'ha observat un homòleg en *S. aureus* implicat en la formació i dispersió del biofilm, el que suggereix que la distribució pot ser més àmplia del que inicialment es pensava (252). En aquest treball s'ha observat que aquest operó és necessari per al creixement òptim en condicions on l'única font de carboni és el DSF o el FA iso-C_{15:0}. Donat que tant el DSF com el iso-C_{15:0} comparteixen via de síntesi (101) sembla que *S. maltophilia* pot utilitzar indistintament aquest FAs a través d'aquest operó. El motiu pel qual també es troba sobreexpressat en presència d'AHLs no ha estat investigat, però s'hipotetitza que alguns mecanismes enzimàtics, com acilases d'AHLs descrites àmpliament, podrien actuar sobre la molècula exògena d'AHL hidrolitzant l'enllaç amida entre la cadena acil i l'anell homoserina lactona (253). Això permetria per una banda, permetre l'entrada de la cadena acil alliberada en el catabolisme general de FAs a través de la β -oxidació, actuant com a un sistema de reciclatge en altres espècies amb producció endògena, mecanisme conegut com a QS turnover o quorum quenching (254). Un altre gen estudiat amb relació a Smlt2053 i el QS ha estat *smlt2944*, que tot i no estar caracteritzat, presenta homologia amb la porina de membrana externa DcaP d'*A. baumannii*, que sembla tenir relació amb la captació d'àcids dicarboxílics (209). En *S. maltophilia* s'observa que està relacionada amb la permeabilitat de la membrana i hi ha indicacions que amb la producció de DSF, tot i que els experiments realitzats necessiten confirmació addicional.

Finalment, s'han realitzat assajos d'unió de la proteïna Smlt2053 al DNA en gens que presenten el domini d'unió a DNA de PsrA. S'ha pogut confirmar l'autoregulació negativa de la pròpia expressió de Smlt2053, així com a d'altres gens, implicats en el metabolisme energètic, reforçant la idea que actua com a un regulador global del metabolisme en *S. maltophilia*. De la mateixa manera que amb PsrA, Smlt2053 també respon a àcids grassos de cadena llarga (LCFAs), sent capaç de detectar FAs a partir de 12 carbonis, i de manera rellevant, el iso-C_{15:0}, el FA més abundant en *S. maltophilia*. Donat els resultats anteriors, s'ha hipotetitzat també que podria sensar DSF. Els resultats no deixen dubtes en aquest sentit i Smlt2053 es confirma com el primer regulador citoplasmàtic de DSF en *Xanthomonadaceae*, activant en presència d'aquest gens relacionats amb la β -oxidació. Aquest fet

important manifesta que *S. maltophilia* pot utilitzar el DSF com a font de carboni, a banda dels efectes que té sobre altres fenotips típics del QS.

No està clar la relació amb SmoR que pot tenir Smlt2053. En *V. harveyi* el reguloma de LuxR inclou també gens relacionat amb el metabolisme, entre d'altres. LuxR en aquesta espècie regula directament l'expressió de MetJ, un regulador transcripcional que entre d'altres regula la biosíntesi de la metionina. De forma interessant, MetJ regula directament l'ortòleg de PsaA, que en aquesta espècie es troba formant operó amb FadE, encarregat de les primeres etapes de la β -oxidació. L'efecte global total és negatiu: LuxR regula negativament l'expressió de MetJ, que és un activador de l'expressió de PsaA (196). Aquesta relació s'ha observat en aquest treball, on el mutant del regulador SmoR de *S. maltophilia* presenta una sobreexpressió de PsaA. Tot i així, no tenim evidències de la participació d'un regulador intermig entre SmoR i Smlt2053, com en el cas de *V. harveyi*.

D'altra banda, en *X. citri*, s'ha descrit TfmR com a un regulador del metabolisme de FAs diferent a PsaA. Donat que l'ortòleg de PsaA en aquesta espècie presenta la mateixa organització genòmica que en *S. maltophilia* (*smlt2053-fadB-fadA* / *XAC2014-fadB1-fadA*) no es pot descartar que la β -oxidació en *Xanthomonadaceae* estigui controlada per 2 o més reguladors (147).

El mecanisme de reciclatge del senyal DSF (*DSF turnover*) s'ha començat a investigar en els darrers anys. En *Xcc* i *X. oryzae* s'ha vist que el DSF s'acumula al principi de la fase estacionària i decreix ràpidament (173, 255). S'ha suggerit que RpfB participa en la degradació del DSF en algunes espècies de *Xanthomonas* (256), pel que s'ha hipotetitzat que en espècies productores de DSF que contenen RpfB dins del clúster *rpf* aquesta pot actuar com a substituta de la canònica FadD, tot i que hi ha resultats contradictoris (257). En el cas de *S. maltophilia*, l'homòleg més proper a FadD d'*E. coli* és RpfB, pel que l'hipòtesi anterior encaixaria amb les observacions en aquesta espècie. Tot i així, és necessària més recerca per determinar la funció exacta de RpfB.

Finalment, s'ha caracteritzat el sistema Mla de manteniment de l'asimetria dels PLs a la membrana externa en *S. maltophilia*. Aquest sistema es va caracteritzar per primer cop l'any 2009 en *E. coli*, mostrant-se essencial per a la integritat de l'envolta cel·lular (138). Aquest sistema, format per *mlaFEDCBA*, transporta els PLs deslocalitzats de la cara externa de la membrana externa (ME) a l'interior cel·lular pel seu reciclatge. Donat que la cara externa de la ME està composta principalment pel LPS, l'acumulació de PLs indueix a la formació de zones inestables per on poden entrar compostos hidrofòbics i comprometent la cèl·lula (139). Encara hi ha controvèrsia sobre la direccionalitat del transport del sistema Mla: si bé hi ha fortes evidències del transport retrògrad de la ME a la MI: (i) la fosfolipasa de membrana externa PldA processa els PLs mal localitzats a la cara externa de la ME, suprimint els defectes dels mutants Mla; (ii) MlaA, proteïna de membrana externa,

DISCUSSIÓ GENERAL

té un porus només accessible des de la superfície cel·lular, suggerint que el transport des de la MI no és factible; (iii) evidències del transport anterògrad (de MlaD a la MI a MlaC al periplasma) *in vitro* s'han donat sense la presència de MlaF, tot i ser necessària per l'hidròlisi d'ATP *in vivo* i (iv) proteïnes amb dominis MCE (*mammalian cell entry*), com MlaD, estan implicades en el transport retrògrad en altres espècies bacterianes i en els cloroplasts de plantes (258). Tot i així, hi ha molts treballs que assenyalen una direccionalitat MI-ME en el sistema Mla, pel que encara són necessaris més estudis per a clarificar-ho (142, 226, 259). Tot i així, l'objectiu d'aquest treball no ha estat identificar la direccionalitat del transport, sinó determinar la implicació d'aquest sistema en fenotips de resistència i virulència.

Primerament s'ha identificat el sistema Mla en *S. maltophilia* codificat en l'operó *smlt4670-smlt4675*, de manera semblant a espècies com *X. campestris* i *N. meningitidis*. En altres espècies, la lipoproteïna MlaA no es troba en el mateix operó que la resta de components. S'ha determinat que mutants defectius en alguns dels components del sistema presenten un augment de la susceptibilitat a alguns antibiòtics, com la colistina i la minociclina, i a altres compostos tòxics com les sals biliars i l'EDTA. De manera semblant, la sensibilitat a EDTA i sals biliars s'ha descrit en la majoria de sistemes defectius Mla (138, 142, 260). En canvi, canvis en la susceptibilitat a antibiòtics s'han observat també, però les classes d'antibiòtics són variables entre sistemes de diferents espècies. En canvi, estudis de la permeabilitat de la membrana indiquen que el mutant pel sistema Mla és més permeable a l'acció de compostos com l'EDTA, característica observada en la majoria de sistemes estudiats.

L'estudi de la morfologia cel·lular indica que en condicions normals la membrana no es veu afectada per la deficiència de components Mla, però en condicions d'agents externs (com EDTA), algunes cèl·lules perden el seu contingut intracel·lular, adoptant morfologies esfèriques i formant esferoplasts.

En estudis de biofilms s'observa una reducció en la formació de biofilm en mutants de Mla, que s'evidencia en presència de concentracions subinhibitòries d'EDTA. També, en biofilms mixtes amb *P. aeruginosa* s'observa una reducció de la formació de biofilm, probablement associada als exoproductes secretats per aquesta espècie.

El contingut total d'àcids grassos cel·lulars indica que el sistema Mla no participa en vies de síntesi o degradació, donat que no s'observen diferències en contingut entre les soques salvatges i mutants.

Finalment, s'ha pogut caracteritzar un dels PLs que pot unir, sent la fosfoetanolamina de 14C, per dos mètodes independents. En canvi, no s'ha observat unió de MlaC a fosfolípids de 16 carbonis. Aquests resultats suggereixen la possibilitat de que MlaC pugui unir iso-C_{15:0}, donat que és un FA de 14 carbonis amb una ramificació metil en la posició C13. Seria interessant realitzar els mateixos tipus

DISCUSSIÓ GENERAL

d'assaig amb aquest iso-C_{15:0} per a confirmar aquesta suposició, ja que l'evolució de la proteïna MlaC sembla indicar que té afinitat pels PLs majoritaris produït per cada espècie (142).

Amb tot, s'evidencia que el sistema Mla participa en la integritat de la membrana externa, com s'ha descrit en la literatura, eliminant els PLs mal localitzats a la superfície cel·lular. Defectes en aquest sistema tenen efectes pleiotròpics, com s'ha pogut observar: patrons de resistència alterats i reducció en la formació de biofilms.

DISCUSSIÓ GENERAL

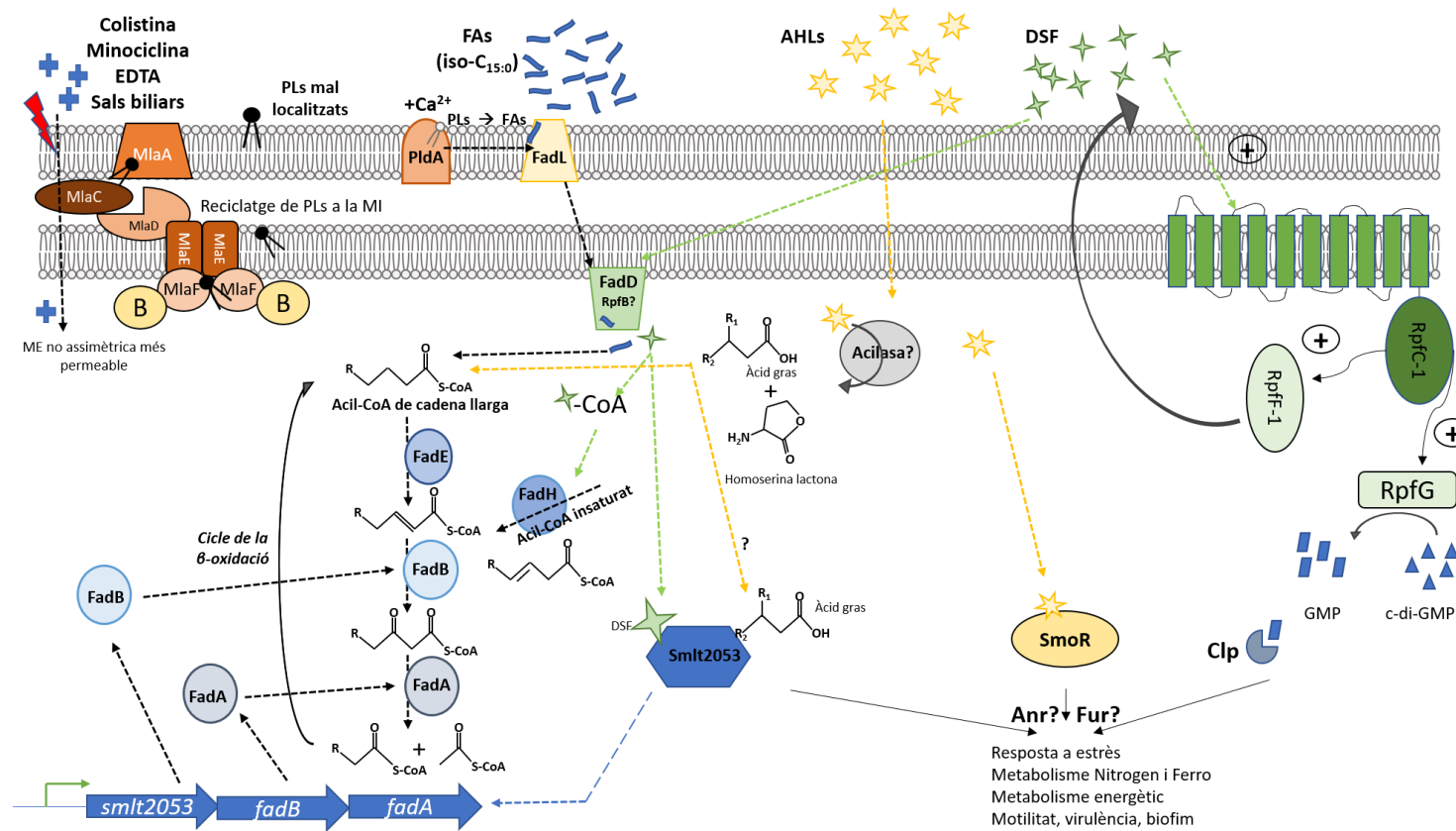


Figura 45. Model esquemàtic dels sistemes de QS, el reciclatge de PLs i una de les rutes catabòliques de lípids on està implicat el regulador Smlt2053 en *S. maltophilia*. El sistema Mla s'encarrega del manteniment de l'assimetria dels PLs de la ME. Defectes en aquest sistema augmenten la permeabilitat de la ME, fent-la més susceptible a l'acció d'agents externs com alguns antibiòtics (colistina i minociclina, EDTA i sals biliars, entre d'altres) que poden arribar fins al citoplasma. Un altre sistema de manteniment d'aquesta asimetria està mediat per PldA, que actua sobre els PLs localitzats a la cara externa de la ME convertint-los en FAs. El sistema FadL/FadD permet el reciclatge d'aquests FAs mitjançant una ruta de β -oxidació. De manera general, els FAs de cadena llarga (com el majoritari iso-C15:0) entren a la cèl·lula pel sistema FadL/FadD i entren als cicles de β -oxidació. Els àcids grassos insaturats, com el DSF, s'ajuden de FadH per a entrar al cicle. Les AHLs exògenes són detectades pel regulador SmoR, que actua com a regulador transcripcional. El sistema de DSF en K279a, de tipus rpf-1, s'encarrega de la síntesi (RpfF) i detecció (RpfC) del DSF. RpfG acua sobre el pool de c-di-GMP intracel·lular convertint-lo en GMP, que activa el regulador global Clp. El regulador Smlt2053 detecta àcids grassos de cadena llarga (incloent el DSF) i permet l'expressió de diversos gens, com els del seu propi operó, FadA i FadB, implicats en els darrers passos de la β -oxidació. S'hipotetza que una acilasa pot trencar l'anell lactona de les AHLs, alliberant un FA que també pot ser detectat per Smlt2053. Finalment, els reguladors Clp, Smlt2053 i SmoR actuen sobre el metabolisme energètic de la cèl·lula i la resposta a estrès, probablement a través de reguladors com Anr i Fur, el que acaba afectant fenotips com la motilitat, el biofilm i la virulència.

DISCUSSIÓ GENERAL

6.CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. El reguloma de *S. maltophilia* en resposta a les diferents fases del creixement (fase exponencial mitja-tardana i fase estacionària) implica la desregulació del 64% del transcriptoma i reflexa un desbalanç favorable al metabolisme energètic durant la fase estacionària.
2. *S. maltophilia* respon a les molècules autoinductores (AIs) del QS, DSF i AHLs, modulant l'expressió de múltiples gens implicats en diverses funcions cel·lulars, principalment implicades en metabolisme energètic i de transducció de senyal. Hi ha una resposta comuna entre AHLs i DSF, d'acord amb el solapament de 42 gens sobreexpressats sota les dues senyals que inclouen l'operó *smlt0264-smlt0268* implicat en processos catabòlics de lípids.
3. El regulador de tipus LuxR *solo* anomenat SmoR té un reguloma comú amb el de l'inducció amb AHLs, indicant que part dels canvis observats en resposta a AHLs es deriven de l'activitat del regulador SmoR.
4. De forma general, l'efecte del QS en *S. maltophilia* implica l'acció coordinada de diversos gens on destaquen aquells relacionats amb el metabolisme energètic de lípids i aminoàcids, amb el metabolisme del ferro i el nitrogen, i múltiples reguladors transcripcionals. Destaquen gens que presenten un motiu d'unió a reguladors globals com Anr/Fnr i Fur, suggerint una adaptació a condicions de baixa disponibilitat d'oxigen, estrès oxidatiu i virulència.
5. El regulador transcripcional Smlt2053, relacionat amb el metabolisme d'àcids grassos, respon a la densitat cel·lular, als efectes de les senyals AI exògenes de QS i a l'activitat del regulador SmoR. Smlt2053 autoregula negativament la seva pròpia expressió i s'uneix a un motiu conservat al DNA per a regular l'expressió de diversos gens, la majoria dels quals estan implicats en el metabolisme energètic, la resposta a estrès i la β -oxidació.
6. Smlt2053 exerceix la seva acció reguladora unint àcids grassos de cadena llarga, incloent iso-C_{15:0}, l'àcid gras més abundant de *S. maltophilia*. Smlt2053 és el primer regulador citoplasmàtic de DSF conegut i en presència d'aquest podria activar la β -oxidació a través de la regulació de l'activitat FadA i FadB. Probablement, el sistema d'enzims codificats per l'operó *smlt0264-smlt0268* està implicat en la utilització de DSF i iso-C_{15:0} com a fonts energètiques.

CONCLUSIONS

7. Es valida el sistema ortòleg a Mla en *S. maltophilia* pel manteniment de l'assimetria dels fosfolípids a la membrana externa mitjançant l'estudi del seu component periplasmàtic MlaC, ja que aquest és capaç d'unir fosfolípids *in vitro*. Els fosfolípids que carrega aquesta proteïna semblen correspondre amb els més abundants a la família *Xanthomonadaceae*.
8. El sistema Mla és clau per a mantenir la permeabilitat de la membrana externa a *S. maltophilia*, ja que participa en diferents fenotips de resistència i modula la formació de biofilm sota condicions d'estrès per a les membranes. Aquest sistema podria ser una diana atractiva per a nous antibacterians.

7.REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

7. REFERÈNCIES

1. Hugh R, Leifson E. 1963. A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon 13:133–138.
2. Swings J, De Vos P, Van den Mooter M, De Ley J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. Int J Syst Bacteriol 33:409–413.
3. 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.
4. Berg G, Martinez JL. 2015. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? Front Microbiol 6:241–241.
5. Ochoa-Sánchez LE, Vinuesa P. 2017. Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. Front Microbiol 8:1548.
6. Mercier-Darty M, Royer G, Lamy B, Charron C, Lemenand O, Gomart C, Fourreau F, Madec J-Y, Jumas-Bilak E, Decousser J-W. 2020. Comparative whole-genome phylogeny of animal, environmental, and human strains confirms the genogroup organization and diversity of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. Appl Environ Microbiol 86.
7. Gröschel MI, Meehan CJ, Barilar I, Diricks M, Gonzaga A, Steglich M, Conchillo-Solé O, Scherer I-C, Mamat U, Luz CF, De Bruyne K, Utpatel C, Yero D, Gibert I, Daura X, Kampmeier S, Rahman NA, Kresken M, van der Werf TS, Alio I, Streit WR, Zhou K, Schwartz T, Rossen JWA, Farhat MR, Schaible UE, Nübel U, Rupp J, Steinmann J, Niemann S, Kohl TA. 2020. The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*. Nat Commun 11:2044.
8. Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D, Dow JM. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nat Rev Microbiol 7:514–525.
9. Berg G, Eberl L, Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ Microbiol 7:1673–1685.
10. Brooke JS. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev 25:2–41.
11. Schoch PE, Cunha BA. 1987. *Pseudomonas maltophilia*. Infect Control 8:169–172.
12. Lai C-H, Chi C-Y, Chen H-P, Chen T-L, Lai C-J, Fung C-P, Yu K-W, Wong W-W, Liu C-Y. 2004. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. J Microbiol Immunol Infect 37:350–358.

REFERÈNCIES

13. Wang W-S, Liu C-P, Lee C-M, Huang F-Y. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in adults: four years' experience in a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 37:359–365.
14. Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. 1998. Molecular Epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Clinical Specimens from Patients with Cystic Fibrosis and Associated Environmental Samples. *J Clin Microbiol* 36:1953–1958.
15. Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Front Microbiol* 8:2276.
16. Casadevall A, Pirofski L-A. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J Water Health* 7 Suppl 1:S2–S18.
17. Trifonova A, Strateva T. 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect Dis (Lond)* 51:168–178.
18. Brooke JS, Di Bonaventura G, Berg G, Martinez J-L. 2017. Editorial: A Multidisciplinary Look at *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Multi-Drug-Resistant Global Opportunistic Pathogen. *Frontiers in Microbiology* 8:1511.
19. Brooke JS. 2014. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:1–4.
20. Willsey GG, Eckstrom K, LaBauve AE, Hinkel LA, Schutz K, Meagher RJ, LiPuma JJ, Wargo MJ. 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* Differential Gene Expression in Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Reveals Shared and Cystic Fibrosis Strain-Specific Responses to the Sputum Environment. *J Bacteriol* 201:e00074-19.
21. Junco SJ, Bowman MC, Turner RB. 2021. Clinical outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* infection treated with trimethoprim/sulfamethoxazole, minocycline, or fluoroquinolone monotherapy. *Int J Antimicrob Agents* 58:106367.
22. Martínez-Servat S, Yero D, Huedo P, Marquez R, Molina G, Daura X, Gibert I. 2018. Heterogeneous Colistin-Resistance Phenotypes Coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Influence Colistin Susceptibility Testing. *Front Microbiol* 9:2871.
23. Hand E, Davis H, Kim T, Duhon B. 2016. Monotherapy with minocycline or trimethoprim/sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Antimicrob Chemother* 71:1071–1075.
24. Biagi M, Vialichka A, Jurkovic M, Wu T, Shajee A, Lee M, Patel S, Mendes RE, Wenzler E. 2020. Activity of Cefiderocol Alone and in Combination with Levofloxacin, Minocycline, Polymyxin B, or Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00559-20.
25. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745.

REFERÈNCIES

26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
27. Zhuo C, Zhao Q, Xiao S. 2014. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 9:e108409.
28. Zgair AK, Chhibber S. 2011. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J Med Microbiol* 60:1032–1037.
29. de Oliveira-Garcia D, Dall’Agnol M, Rosales M, Azzuz ACGS, Alcántara N, Martínez MB, Girón JA. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* 5:625–636.
30. Liu W, Tian X-Q, Wei J-W, Ding L-L, Qian W, Liu Z, Wang F-F. 2017. BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci Rep* 7:4665.
31. An S, Tang J. 2018. The Ax21 protein influences virulence and biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Arch Microbiol* 200:183–187.
32. Bostanghadiri N, Ardebili A, Ghalavand Z, Teymouri S, Mirzarazi M, Goudarzi M, Ghasemi E, Hashemi A. 2021. Antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-associated genes among *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *BMC Research Notes* 14:151.
33. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P, Weber W. 2002. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *J Biol Chem* 277:11042–11049.
34. Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, Fiscarelli E, Zarrilli R, De Carolis E, Petrucca A, Nencioni L, Colonna B, Casalino M. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *Int J Med Microbiol* 301:34–43.
35. Ribitsch D, Heumann S, Karl W, Gerlach J, Leber R, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Eiteljoerg I, Remler P, Siegert P, Lange J, Maurer KH, Berg G, Guebitz GM, Schwab H. 2012. Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: Screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. *J Biotechnol* 157:140–147.
36. García CA, Passerini De Rossi B, Alcaraz E, Vay C, Franco M. 2012. Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. *Rev Argent Microbiol* 44:150–154.
37. 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.
38. Manefield M, Turner SL. 2002. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology*. Microbiology Society,.

REFERÈNCIES

39. Federle MJ, Bassler BL. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 112:1291–1299.
40. Fuqua C, Greenberg EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:685–695.
41. 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.
42. Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. 2002. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 44:171–179.
43. Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, González JE. 2003. Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 185:325–331.
44. Quiñones B, Dulla G, Lindow SE. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18:682–693.
45. Bassler BL. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109:421–424.
46. Jiang Q, Chen J, Yang C, Yin Y, Yao K. 2019. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *Biomed Res Int* 2019:2015978.
47. Nealson K, Platt T, Hastings J. 1970. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol* 104:313–322.
48. 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.
49. Engebrecht J, Nealson K, Silverman M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32:773–781.
50. Engebrecht J, Silverman M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci* 81:4154.
51. Williams P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology (Reading)* 153:3923–3938.
52. Galloway WRJD, 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.
53. Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9505–9509.

REFERÈNCIES

54. Kaplan HB, Greenberg EP. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163:1210–1214.
55. Ng W-L, Bassler BL. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43:197–222.
56. Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S. 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345–349.
57. Ji G, Beavis R, Novick RP. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276:2027–2030.
58. Taga ME, Bassler BL. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14549–14554.
59. Hawver LA, Jung SA, Ng W-L. 2016. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol Rev* 40:738–752.
60. Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199.
61. Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346.
62. Khan F, Javaid A, Kim Y-M. 2019. Functional Diversity of Quorum Sensing Receptors in Pathogenic Bacteria: Interspecies, Intraspecies and Interkingdom Level. *Curr Drug Targets* 20:655–667.
63. Papenfort K, Bassler BL. 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:576–588.
64. Chong G, Kimyon O, Manfield M. 2013. Quorum Sensing Signal Synthesis May Represent a Selective Advantage Independent of Its Role in Regulation of Bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *PLoS One* 8:e67443.
65. Rajput A, Kaur K, Kumar M. 2016. SigMol: repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 44:D634–639.
66. Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS. 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454:595–599.
67. Ahlgren NA, Harwood CS, Schaefer AL, Giraud E, Greenberg EP. 2011. Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *PNAS* 108:7183–7188.
68. Lindemann A, Pessi G, Schaefer AL, Mattmann ME, Christensen QH, Kessler A, Hennecke H, Blackwell HE, Greenberg EP, Harwood CS. 2011. Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *PNAS* 108:16765–16770.

REFERÈNCIES

69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Schuster M, Greenberg EP. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296:73–81.
73. Diggie SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P. 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* 14:87–96.
74. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L-H. 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9:339–343.
75. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 41:1–20.
76. Lee J, Zhang L. 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6:26–41.
77. Ryan RP, An S, Allan JH, McCarthy Y, Dow JM. 2015. The DSF Family of Cell–Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators. *PLOS Pathogens* 11:e1004986.
78. Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJG, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* 24:555–566.
79. Deng Y, Wu J, Tao F, Zhang L-H. 2011. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev* 111:160–173.
80. Zhou L, Zhang L-H, Cámara M, He Y-W. 2017. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends Microbiol* 25:293–303.
81. Huedo P, Coves X, Daura X, Gibert I, Yero D. 2018. Quorum sensing signaling and quenching in the multidrug-resistant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Cell Infect Microbiol* 8:122–122.
82. Qian G, Wang Y, Liu Y, Xu F, He Y-W, Du L, Venturi V, Fan J, Hu B, Liu F. 2013. *Lysobacter* enzymogenes uses two distinct cell-cell signaling systems for differential regulation of secondary-metabolite biosynthesis and colony morphology. *Appl Environ Microbiol* 79:6604–6616.

REFERÈNCIES

83. Boon C, Deng Y, Wang L-H, He Y, Xu J-L, Fan Y, Pan SQ, Zhang L-H. 2008. A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *ISME J* 2:27–36.
84. Deng Y, Boon C, Chen S, Lim A, Zhang L-H. 2013. Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with quorum sensing systems and T3SS. *BMC Microbiol* 13:231.
85. Amari DT, Marques CNH, Davies DG. 2013. The putative enoyl-coenzyme A hydratase Dspl is required for production of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion autoinducer cis-2-decenoic acid. *J Bacteriol* 195:4600–4610.
86. Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Ruyra À, Roher N, Daura X, Gibert I. 2015. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 6:761.
87. Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martínez P, Ruyra À, Roher N, Roca I, Vila J, Daura X, Gibert I. 2014. Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *J Bacteriol* 196:2431.
88. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, Fiscarelli E, Dicuonzo G, Savini V, D'Antonio D, Di Bonaventura G. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* 11:159.
89. Lira F, Berg G, Martínez JL. 2017. Double-face meets the bacterial world: the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 8:2190.
90. 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.
91. Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. 2008. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2670–2675.
92. He Y-W, Zhang L-H. 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 32:842–857.
93. Deng Y, Liu X, Wu J, Lee J, Chen S, Cheng Y, Zhang C, Zhang L-H. 2015. The host plant metabolite glucose is the precursor of diffusible signal factor (DSF) family signals in *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* 81:2861–2868.
94. Deng Y, Wu J, Yin W, Li P, Zhou J, Chen S, He F, Cai J, Zhang L-H. 2016. Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. *Environ Microbiol* 18:1534–1545.

REFERÈNCIES

95. Zhou L, Yu Y, Chen X, Diab AA, Ruan L, He J, Wang H, He Y-W. 2015. The Multiple DSF-family QS Signals are Synthesized from Carbohydrate and Branched-chain Amino Acids via the FAS Elongation Cycle. *Sci Rep* 5:13294.
96. Huang T-P, Lee Wong AC. 2007. Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Res Microbiol* 158:702–711.
97. Huedo P, Conchillo-Solé O, Yero D, Martínez-Servat S, Daura X, Gibert I. 2014. Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain M30, Isolated from a Chronic Pressure Ulcer in an Elderly Patient. *Genome Announc* 2:e00576-14.
98. Bi H, Christensen QH, Feng Y, Wang H, Cronan JE. 2012. The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Mol Microbiol* 83:840–855.
99. Kim H-B, Srinivasan S, Sathiyaraj G, Quan L-H, Kim S-H, Bui TPN, Liang Z-Q, Kim Y-J, Yang D-C. 2010. *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1522–1526.
100. Kaur A, Chaudhary A, Kaur A, Choudhary R, Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89:1103–1112.
101. Heath RJ, Rock CO. 2002. The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep* 19:581–596.
102. García CA, Alcaraz ES, Franco MA, Passerini de Rossi BN. 2015. Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Front Microbiol* 6:926.
103. Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S, Van Putte W, De Rycke R, Van Driessche G, Vitse J, Raemdonck K, Devreese B. 2015. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 6:298.
104. Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, Watt SA, Niehaus K, Yang L, Tolker-Nielsen T, Dow JM. 2008. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 68:75–86.
105. Twomey KB, O'Connell OJ, McCarthy Y, Dow JM, O'Toole GA, Plant BJ, Ryan RP. 2012. Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 6:939–950.
106. de Rossi BP, García C, Alcaraz E, Franco M. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* interferes via the DSF-mediated quorum sensing system with *Candida albicans* filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. *Rev Argent Microbiol* 46:288–297.

REFERÈNCIES

107. Alavi P, Müller H, Cardinale M, Zachow C, Sánchez MB, Martínez JL, Berg G. 2013. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. PLOS ONE 8:e67103.
108. Zhu H, Thuruthyil 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.
109. Veselova M, Kholmeckaya M, Klein S, Voronina E, Lipasova V, Metlitskaya A, Mayatskaya A, Lobanok E, Khmel I, Chernin L. 2003. Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. Folia Microbiol (Praha) 48:794–798.
110. Valle A, Bailey MJ, Whiteley AS, Manefield M. 2004. N-acyl-l-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. Environ Microbiol 6:424–433.
111. Hu H, He J, Liu J, Yu H, Tang J, Zhang J. 2016. Role of N-acyl-homoserine-lactone (AHL) based quorum sensing on biofilm formation on packing media in wastewater treatment process. RSC Adv 6:11128–11139.
112. Tan CH, Koh KS, Xie C, Zhang J, Tan XH, Lee GP, Zhou Y, Ng WJ, Rice SA, Kjelleberg S. 2015. Community quorum sensing signalling and quenching: microbial granular biofilm assembly. npj Biofilms Microbiomes 1:1–9.
113. Tan CH, Koh KS, Xie C, Tay M, Zhou Y, Williams R, Ng WJ, Rice SA, Kjelleberg S. 2014. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules. ISME J 8:1186–1197.
114. Ishizaki S, Sugiyama R, Okabe S. 2017. Membrane fouling induced by AHL-mediated soluble microbial product (SMP) formation by fouling-causing bacteria co-cultured with fouling-enhancing bacteria. Sci Rep 7:8482.
115. Martínez P, Huedo P, Martínez-Servat S, Planell R, Ferrer-Navarro M, Daura X, Yero D, Gibert I. 2015. *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). Front Cell Infect Microbiol 5:41.
116. Hudaiberdiev S, Choudhary KS, Vera Alvarez R, Gelencser Z, Ligeti B, Lamba D, Pongor S. 2015. Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. Front Cell Infect Microbiol 5:20.
117. Subramoni S, Venturi V. 2009. LuxR-family “solos”: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. Microbiology (Reading) 155:1377–1385.
118. Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev 67:593–656.
119. Mühlradt PF, Golecki JR. 1975. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. Eur J Biochem 51:343–352.

REFERÈNCIES

120. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414.
121. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D, Brock T. 2008. *Brock Biology of Microorganisms*, 12th ed. Pearson.
122. Neal DJ, Wilkinson SG. 1982. Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia*. Structural studies of the side-chain, core, and lipid-A regions of the lipopolysaccharide from strain NCTC 10257. *Eur J Biochem* 128:143–149.
123. McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K. 2003. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect Immun* 71:3068–3075.
124. Whitfield C, Trent MS. 2014. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 83:99–128.
125. Huang T-P, Somers EB, Wong ACL. 2006. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* 188:3116–3120.
126. Dowhan W, Bogdanov M. 2009. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annu Rev Biochem* 78:515–540.
127. Moser R, Aktas M, Fritz C, Narberhaus F. 2014. Discovery of a bifunctional cardiolipin/phosphatidylethanolamine synthase in bacteria. *Mol Microbiol* 92:959–972.
128. Yao J, Rock CO. 2013. Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1831:495–502.
129. Zhang Y-M, Rock CO. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:222–233.
130. Röttig A, Steinbüchel A. 2013. Acyltransferases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:277–321.
131. Zhang Y-M, Rock CO. 2008. Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res* 49:1867–1874.
132. Lundstedt E, Kahne D, Ruiz N. 2021. Assembly and Maintenance of Lipids at the Bacterial Outer Membrane. *Chem Rev* 121:5098–5123.
133. Jones NC, Osborn MJ. 1977. Translocation of phospholipids between the outer and inner membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 252:7405–7412.
134. Lasch P, Schultz CP, Naumann D. 1998. The influence of poly-(L-lysine) and porin on the domain structure of mixed vesicles composed of lipopolysaccharide and phospholipid: an infrared spectroscopic study. *Biophys J* 75:840–852.

REFERÈNCIES

135. Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CR. 2000. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J* 19:5071–5080.
136. May KL, Silhavy TJ. 2018. The *Escherichia coli* Phospholipase PldA Regulates Outer Membrane Homeostasis via Lipid Signaling. *mBio* 9:e00379-18.
137. Dekker N. 2000. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol Microbiol* 35:711–717.
138. Malinverni JC, Silhavy TJ. 2009. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *PNAS* 106:8009–8014.
139. Yeow J, Tan KW, Holdbrook DA, Chong Z-S, Marzinek JK, Bond PJ, Chng S-S. 2018. The architecture of the OmpC-MlaA complex sheds light on the maintenance of outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 293:11325–11340.
140. Abellón-Ruiz J, Kaptan SS, Baslé A, Claudi B, Bumann D, Kleinekathöfer U, van den Berg B. 2017. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nat Microbiol* 2:1616–1623.
141. Huang YM, Miao Y, Munguia J, Lin L, Nizet V, McCammon JA. 2016. Molecular dynamic study of MlaC protein in Gram-negative bacteria: conformational flexibility, solvent effect and protein-phospholipid binding. *Protein Sci* 25:1430–1437.
142. Yero D, Díaz-Lobo M, Costenaro L, Conchillo-Solé O, Mayo A, Ferrer-Navarro M, Vilaseca M, Gibert I, Daura X. 2021. The *Pseudomonas aeruginosa* substrate-binding protein Ttg2D functions as a general glycerophospholipid transporter across the periplasm. *Commun Biol* 4:1–16.
143. Ekiert DC, Bhabha G, Isom GL, Greenan G, Ovchinnikov S, Henderson IR, Cox JS, Vale RD. 2017. Architectures of Lipid Transport Systems for the Bacterial Outer Membrane. *Cell* 169:273-285.e17.
144. Thong S, Ercan B, Torta F, Fong ZY, Wong HYA, Wenk MR, Chng S-S. 2016. Defining key roles for auxiliary proteins in an ABC transporter that maintains bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Elife* 5:e19042.
145. Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K. 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol* 66:829–839.
146. Xu Y, Heath RJ, Li Z, Rock CO, White SW. 2001. The FadR.DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276:17373–17379.
147. Teper D, Zhang Y, Wang N. 2019. TfmR, a novel TetR-family transcriptional regulator, modulates the virulence of *Xanthomonas citri* in response to fatty acids. *Mol Plant Pathol* 20:701–715.

REFERÈNCIES

148. Feng Y, Cronan JE. 2010. Overlapping repressor binding sites result in additive regulation of *Escherichia coli* FadH by FadR and ArcA. *J Bacteriol* 192:4289–4299.
149. Feng Y, Cronan JE. 2009. *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the *fabA* gene and in vivo identification of the essential reaction catalyzed by FabB. *J Biol Chem* 284:29526–29535.
150. Cronan JE, Waldrop GL. 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res* 41:407–435.
151. Choi K-H, Heath RJ, Rock CO. 2000. β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Is a Determining Factor in Branched-Chain Fatty Acid Biosynthesis. *J Bacteriol* 182:365–370.
152. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream M-A, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9:R74.
153. Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh TR. 2000. A TEM-2 β -lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 46:879–884.
154. Aubert DF, Hamad MA, Valvano MA. 2014. A Markerless deletion method for genetic manipulation of *Burkholderia cenocepacia* and other multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 1197:311–327.
155. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
156. Flannagan RS, Linn T, Valvano MA. 2008. A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus *Burkholderia*. *Environ Microbiol* 10:1652–1660.
157. Abda EM, Krysciak D, Krohn-Molt I, Mamat U, Schmeisser C, Förstner KU, Schaible UE, Kohl TA, Nieman S, Streit WR. 2015. Phenotypic Heterogeneity Affects *Stenotrophomonas maltophilia* K279a Colony Morphotypes and β -Lactamase Expression. *Front Microbiol* 6:1373.
158. Choi K-H, 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.
159. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.
160. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2015. eggNOG 4.5: a hierarchical

REFERÈNCIES

- orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research* 44:D286–D293.
161. Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T. 2006. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* 22:1600–1607.
 162. Bu D, Luo H, Huo P, Wang Z, Zhang S, He Z, Wu Y, Zhao L, Liu J, Guo J, Fang S, Cao W, Yi L, Zhao Y, Kong L. 2021. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research* 49:W317–W325.
 163. Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* 43:W39–W49.
 164. CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th edition. CLSI M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 165. Sd S, L N, Y K. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif)* 42.
 166. Sutterlin HA, Shi H, May KL, Miguel A, Khare S, Huang KC, Silhavy TJ. 2016. Disruption of lipid homeostasis in the Gram-negative cell envelope activates a novel cell death pathway. *PNAS* 113:E1565–E1574.
 167. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7:214–229.
 168. Loh B, Grant C, Hancock RE. 1984. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 26:546.
 169. Hellman LM, Fried MG. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols* 2:1849–1861.
 170. Alexander CG, Wanner R, Johnson CM, Breitsprecher D, Winter G, Duhr S, Baaske P, Ferguson N. 2014. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844:2241–2250.
 171. Venturi V. 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 30:274–291.
 172. Torres-Cerna CE, Morales JA, Hernandez-Vargas EA. 2019. Modeling Quorum Sensing Dynamics and Interference on *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 10:1835.
 173. Wang L-H, He Y, Gao Y, Wu JE, Dong Y-H, He C, Wang SX, Weng L-X, Xu J-L, Tay L, Fang RX, Zhang L-H. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* 51:903–912.

REFERÈNCIES

174. Butcher BG, Bronstein PA, Myers CR, Stodghill PV, Bolton JJ, Markel EJ, Filiatrault MJ, Swingle B, Gaballa A, Helmann JD, Schneider DJ, Cartinhour SW. 2011. Characterization of the Fur Regulon in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J Bacteriol* 193:4598–4611.
175. Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A, Kashiwagi K, Igarashi K. 2008. Identification of a Spermidine Excretion Protein Complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:872–878.
176. Bay DC, Stremick CA, Slipski CJ, Turner RJ. 2017. Secondary multidrug efflux pump mutants alter *Escherichia coli* biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds. *Res Microbiol* 168:208–221.
177. Interplay between OmpA and RpoN Regulates Flagellar Synthesis in *Stenotrophomonas maltophilia*.
178. He Y, Xu T, Fossheim LE, Zhang X-H. 2012. FliC, a Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. *PLOS ONE* 7:e45070.
179. Hazen TH, Daugherty SC, Shetty A, Mahurkar AA, White O, Kaper JB, Rasko DA. 2015. RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli* prototype isolates. *Front Microbiol* 6:569.
180. Caglar MU, Houser JR, Barnhart CS, Boutz DR, Carroll SM, Dasgupta A, Lenoir WF, Smith BL, Sridhara V, Sydykova DK, Vander Wood D, Marx CJ, Marcotte EM, Barrick JE, Wilke CO. 2017. The *E. coli* molecular phenotype under different growth conditions. *Scientific Reports* 7:45303.
181. Schmidtke C, Findeiß S, Sharma CM, Kuhfuß J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U. 2012. Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Res* 40:2020–2031.
182. Alkhateeb RS, Vorhölter F-J, Steffens T, Rückert C, Ortseifen V, Hublik G, Niehaus K, Pühler A. 2018. Comparative transcription profiling of two fermentation cultures of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 sampled in the growth and in the stationary phase. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:6613–6625.
183. Li L, Li J, Zhang Y, Wang N. 2019. Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. *BMC Genomics* 20:55.
184. Gao R, Krysciak D, Petersen K, Utpatel C, Knapp A, Schmeisser C, Daniel R, Voget S, Jaeger K-E, Streit WR. 2015. Genome-Wide RNA Sequencing Analysis of Quorum Sensing-Controlled Regulons in the Plant-Associated *Burkholderia glumae* PG1 Strain. *Appl Environ Microbiol* 81:7993–8007.
185. Kang Y, Nguyen DT, Son MS, Hoang TT. 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* PsaA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 beta-oxidation operon. *Microbiology (Reading)* 154:1584–1598.

REFERÈNCIES

186. Oglesby AG, Farrow JM, Lee J-H, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, Vasil ML. 2008. The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* 283:15558–15567.
187. Hausmann S, Gonzalez D, Geiser J, Valentini M. 2021. The DEAD-box RNA helicase RhIE2 is a global regulator of *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle and pathogenesis. *Nucleic Acids Res* 49:6925–6940.
188. Oun S, Redder P, Didier J-P, François P, Corvaglia A-R, Buttazzoni E, Giraud C, Girard M, Schrenzel J, Linder P. 2013. The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol* 10:157–165.
189. Haycocks JRJ, Grainger DC. 2016. Unusually situated binding sites for bacterial transcription factors can have hidden functionality. *PLOS ONE* 11:e0157016.
190. Körner H, Sofia HJ, Zumfit WG. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27:559–592.
191. Tribelli PM, Nickel PI, Oppezzo OJ, López NI. 2013. Anr, the anaerobic global regulator, modulates the redox state and oxidative stress resistance in *Pseudomonas extremaustralis*. *Microbiology (UK)* 159:259–268.
192. Hammond JH, Dolben EF, Smith TJ, Bhujra S, Hogan DA. 2015. Links between Anr and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 197:2810.
193. Tribelli PM, Lujan AM, Pardo A, Ibarra JG, Fernández Do Porto D, Smania A, López NI. 2019. Core regulon of the global anaerobic regulator Anr targets central metabolism functions in *Pseudomonas species*. *Sci Rep* 9:9065.
194. Tsoy OV, Ravcheev DA, Čuklina J, Gelfand MS. 2016. Nitrogen Fixation and Molecular Oxygen: Comparative Genomic Reconstruction of Transcription Regulation in Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology* 7:1343.
195. Clay ME, Hammond JH, Zhong F, Chen X, Kowalski CH, Lee AJ, Porter MS, Hampton TH, Greene CS, Pletneva EV, Hogan DA. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutant fitness in microoxia is supported by an Anr-regulated oxygen-binding hemerythrin. *PNAS* 117:3167–3173.
196. Chaparian RR, Ball AS, van Kessel JC. 2020. Hierarchical Transcriptional Control of the LuxR Quorum-Sensing Regulon of *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 202:e00047-20.
197. Licciardello G, Caruso A, Bella P, Gheleri R, Strano CP, Anzalone A, Trantas EA, Sarris PF, Almeida NF, Catara V. 2018. The LuxR Regulators PcoR and RfiA Co-regulate Antimicrobial Peptide and Alginate Production in *Pseudomonas corrugata*. *Front Microbiol* 9:521.
198. Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, Ishitani R, Nureki O. 2015. Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nat Commun* 6:7097.

REFERÈNCIES

199. van Heeswijk WC, Westerhoff HV, Boogerd FC. 2013. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:628–695.
200. Kalidasan V, Joseph N, Kumar S, Awang Hamat R, Neela VK. 2018. Iron and Virulence in *Stenotrophomonas Maltophilia*: All We Know So Far. *Front Cell Infect Microbiol* 8:401.
201. Kojic M, Jovcic B, Vindigni A, Odreman F, Venturi V. 2005. Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 246:175–181.
202. Chatterjee A, Cui Y, Hasegawa H, Chatterjee AK. 2007. PsrA, the *Pseudomonas sigma* regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *Appl Environ Microbiol* 73:3684.
203. Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock REW. 2008. Induction by cationic antimicrobial peptides and involvement in intrinsic polymyxin and antimicrobial peptide resistance, biofilm formation, and swarming motility of PsrA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190:5624–5634.
204. Neckers L, Tatu U. 2008. Molecular Chaperones in Pathogen Virulence: Emerging New Targets for Therapy. *Cell Host Microbe* 4:519–527.
205. Seydlová G, Halada P, Fišer R, Toman O, Ulrych A, Svobodová J. 2012. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *J Appl Microbiol* 112:765–774.
206. Fonseca P, de la Peña F, Prieto MA. 2014. A role for the regulator PsrA in the polyhydroxyalkanoate metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440. *Int J Biol Macromol* 71:14–20.
207. Clarke SD, Nakamura MT. 2004. Fatty Acid Synthesis and its Regulation, p. 99–103. *In* Lennarz, WJ, Lane, MD (eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, New York.
208. Cuthbertson L, Nodwell JR. 2013. The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:440.
209. Bhamidimarri SP, Zahn M, Prajapati JD, Schleberger C, Söderholm S, Hoover J, West J, Kleinekathöfer U, Bumann D, Winterhalter M, van den Berg B. 2019. A multidisciplinary approach toward identification of antibiotic scaffolds for *Acinetobacter baumannii*. *Structure* 27:268–280.e6.
210. Khalid K, Irum S, Ullah SR, Andleeb S. 2022. In-Silico Vaccine Design Based on a Novel Vaccine Candidate Against Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Int J Pept Res Ther* 28:16.
211. Träuble H, Overath P. 1973. The structure of *Escherichia coli* membranes studied by fluorescence measurements of lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta* 307:491–512.

REFERÈNCIES

212. Steele MI, Lorenz D, Hatter K, Park A, Sokatch JR. 1992. Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 267:13585–13592.
213. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahme LG. 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55:998–1014.
214. Bernier SP, Son S, Surette MG. 2018. The Mla Pathway Plays an Essential Role in the Intrinsic Resistance of *Burkholderia cepacia* Complex Species to Antimicrobials and Host Innate Components. *J Bacteriol* 200:e00156-18.
215. Palmer LD, Minor KE, Mettlach JA, Rivera ES, Boyd KL, Caprioli RM, Spraggins JM, Dalebroux ZD, Skaar EP. 2020. Modulating Isoprenoid Biosynthesis Increases Lipooligosaccharides and Restores *Acinetobacter baumannii* Resistance to Host and Antibiotic Stress. *Cell Reports* 32:108129.
216. Sharma P, Haycocks JRJ, Middlemiss AD, Kettles RA, Sellars LE, Ricci V, Piddock LJV, Grainger DC. 2017. The multiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA repair and outer membrane integrity. *Nat Commun* 8:1444.
217. Suzuki T, Murai T, Fukuda I, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C. 1994. Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 11:31–41.
218. Zhao L, Gao X, Liu C, Lv X, Jiang N, Zheng S. 2017. Deletion of the *vacJ* gene affects the biology and virulence in *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Gene* 603:42–53.
219. Liu J, Xiao G, Zhou W, Yang J, Wang Y, Wu Y, Cheng X, Sun Z. Various Novel Colistin Resistance Mechanisms Interact To Facilitate Adaptation of *Aeromonas hydrophila* to Complex Colistin Environments. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e00071-21.
220. Shankar C, Nabarro LEB, Anandan S, Veeraraghavan B. 2017. Minocycline and Tigecycline: What Is Their Role in the Treatment of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms? *Microb Drug Resist* 23:437–446.
221. Leive L, Telesetsky S, Coleman WG, Carr D. 1984. Tetracyclines of various hydrophobicities as a probe for permeability of *Escherichia coli* outer membranes. *Antimicrob Agents Chemother* 25:539–544.
222. May KL, Grabowicz M. 2018. The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:8852–8854.
223. Xie F, Li G, Zhang W, Zhang Y, Zhou L, Liu S, Liu S, Wang C. 2016. Outer membrane lipoprotein VacJ is required for the membrane integrity, serum resistance and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 183:1–8.

REFERÈNCIES

224. Wijesinghe G, Dilhari A, Gayani B, Kottegoda N, Samaranyake L, Weerasekera M. 2019. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med Princ Pract* 28:28–35.
225. Powers MJ, Simpson BW, Trent MS. 2020. The Mla pathway in *Acinetobacter baumannii* has no demonstrable role in anterograde lipid transport. *eLife* 9:e56571.
226. Kamischke C, Fan J, Bergeron J, Kulasekara HD, Dalebroux ZD, Burrell A, Kollman JM, Miller SI. 2019. The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane. *eLife* 8:e40171.
227. McDaniel MS, Schoeb T, Swords WE. 2020. Cooperativity between *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa* during Polymicrobial Airway Infections. *Infect Immun* 88:e00855-19.
228. Bragonzi A, Farulla I, Paroni M, Twomey KB, Pirone L, Lorè NI, Bianconi I, Dalmastrì C, Ryan RP, Bevivino A. 2012. Modelling Co-Infection of the Cystic Fibrosis Lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* Reveals Influences on Biofilm Formation and Host Response. *PLoS One* 7:e52330.
229. Filkins LM, Graber JA, Olson DG, Dolben EL, Lynd LR, Bhuju S, O'Toole GA. 2015. Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J Bacteriol* 197:2252–2264.
230. O'Brien S, Fothergill JL. 2017. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol Lett* 364:fnx128.
231. Lubitz P, Mayr UB, Lubitz W. 2009. Applications of bacterial ghosts in biomedicine. *Adv Exp Med Biol* 655:159–170.
232. Sun Y, Sun T-L, Huang HW. 2014. Physical Properties of *Escherichia coli* Spheroplast Membranes. *Biophys J* 107:2082–2090.
233. Ercan B, Low W-Y, Liu X, Chng S-S. 2019. Characterization of Interactions and Phospholipid Transfer between Substrate Binding Proteins of the OmpC-Mla System. *Biochemistry* 58:114–119.
234. Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill MEA. 2002. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9:685–694.
235. Zhang C, Lv M, Yin W, Dong T, Chang C, Miao Y, Jia Y, Deng Y. 2019. *Xanthomonas campestris* Promotes Diffusible Signal Factor Biosynthesis and Pathogenicity by Utilizing Glucose and Sucrose from Host Plants. *Mol Plant Microbe Interact* 32:157–166.

REFERÈNCIES

236. Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, McCarthy RR, Woods DF, Scarciglia S, Adams C, Fog Nielsen K, Gram L, O'Gara F. 2019. Quorum Sensing Signaling Alters Virulence Potential and Population Dynamics in Complex Microbiome-Host Interactomes. *Front Microbiol* 10:2131.
237. Schmid N, Pessi G, Deng Y, Aguilar C, Carlier AL, Grunau A, Omasits U, Zhang L-H, Ahrens CH, Eberl L. 2012. The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in *Burkholderia cenocepacia* H111. *PLOS ONE* 7:e49966.
238. Udine C, Brackman G, Bazzini S, Buroni S, Acker HV, Pasca MR, Riccardi G, Coenye T. 2013. Phenotypic and Genotypic Characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 Mutants Affected in Homoserine Lactone and Diffusible Signal Factor-Based Quorum Sensing Systems Suggests Interplay between Both Types of Systems. *PLOS ONE* 8:e55112.
239. Deng Y, Lim A, Wang J, Zhou T, Chen S, Lee J, Dong Y-H, Zhang L-H. 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.
240. Yang C, Cui C, Ye Q, Kan J, Fu S, Song S, Huang Y, He F, Zhang L-H, Jia Y, Gao Y-G, Harwood CS, Deng Y. 2017. *Burkholderia cenocepacia* integrates cis-2-dodecenoic acid and cyclic dimeric guanosine monophosphate signals to control virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13006–13011.
241. Ye RW, Haas D, Ka JO, Krishnapillai V, Zimmermann A, Baird C, Tiedje JM. 1995. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* 177:3606–3609.
242. Jackson AA, Gross MJ, Daniels EF, Hampton TH, Hammond JH, Vallet-Gely I, Dove SL, Stanton BA, Hogan DA. 2013. Anr and its activation by PlcH activity in *Pseudomonas aeruginosa* host colonization and virulence. *J Bacteriol* 195:3093–3104.
243. Alvarez-Ortega C, Harwood CS. 2007. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* 65:153–165.
244. 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.
245. Xu H, Zhao Y, Qian G, Liu F. 2015. XocR, a LuxR solo required for virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Front Cell Infect Microbiol* 5.
246. 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.
247. Troxell B, Hassan HM. 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3:59.

REFERÈNCIES

248. McRose DL, Baars O, Seyedsayamdost MR, Morel FMM. 2018. Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *PNAS* 115:7581–7586.
249. Wells G, Palethorpe S, Pesci EC. 2017. *PsrA* controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the *FadE* homolog, PA0506. *PLOS ONE* 12:e0189331.
250. Chin-A-Woeng TFC, van den Broek D, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. 2005. The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator *psrA* represses the production of the antifungal metabolite phenazine-1-carboxamide. *Mol Plant Microbe Interact* 18:244–253.
251. Novovic KD, Malesevic MJ, Filipic BV, Mirkovic NL, Miljkovic MS, Kojic MO, Jovčić BU. 2019. *PsrA* regulator connects cell physiology and class 1 integron integrase gene expression through the regulation of *lexA* gene expression in *Pseudomonas* spp. *Curr Microbiol* 76:320–328.
252. Jennings JA, Courtney HS, Haggard WO. 2012. Cis-2-decenoic acid inhibits *S. aureus* growth and biofilm in vitro: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 470:2663–2670.
253. Utari PD, Vogel J, Quax WJ. 2017. Deciphering Physiological Functions of AHL Quorum Quenching Acylases. *Frontiers in Microbiology* 8:1123.
254. Sio CF, Otten LG, Cool RH, Diggle SP, Braun PG, Bos R, Daykin M, Cámara M, Williams P, Quax WJ. 2006. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74:1673–1682.
255. He Y-W, Wu J, Cha J-S, Zhang L-H. 2010. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol* 10:187.
256. Almeida RPP, Killiny N, Newman KL, Chatterjee S, Ionescu M, Lindow SE. 2012. Contribution of *rpfB* to cell-to-cell signal synthesis, virulence, and vector transmission of *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:453–462.
257. Bi H, Yu Y, Dong H, Wang H, Cronan JE. 2014. *Xanthomonas campestris* *RpfB* is a Fatty Acyl-CoA Ligase Required to Counteract the Thioesterase Activity of the *RpfF* Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase. *Mol Microbiol* 93:262–275.
258. Powers MJ, Trent MS. 2019. Intermembrane transport: Glycerophospholipid homeostasis of the Gram-negative cell envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:17147–17155.
259. Hughes GW, Hall SCL, Laxton CS, Sridhar P, Mahadi AH, Hatton C, Piggot TJ, Wotherspoon PJ, Leney AC, Ward DG, Jamshad M, Spana V, Cadby IT, Harding C, Isom GL, Bryant JA, Parr RJ, Yakub Y, Jeeves M, Huber D, Henderson IR, Clifton LA, Lovering AL, Knowles TJ. 2019. Evidence for phospholipid export from the bacterial inner membrane by the *Mla* ABC transport system. *Nat Microbiol* 4:1692–1705.
260. Chong Z-S, Woo W-F, Chng S-S. 2015. Osmoporin *OmpC* forms a complex with *MlaA* to maintain outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 98:1133–1146.

8.ANNEX

8. ANNEX

ANNEX

Taula Annex A Llistat de soques de *S. maltophilia* utilitzades en aquest treball.

Soca	Abreviació	Característiques	Font
K279a	wt	K279a salvatge	Dr. J. Maxwell Dow
K279a/pBBR1MCS1	wt*	K279a amb el plasmidi replicatiu PBBR1-MCS1 per la complementació de mutants	Aquest treball
K279a/pBBR1MCS1-BAD	wt*	K279a amb el plasmidi replicatiu PBBR1-MCS1-BAD per la complementació de mutants	Aquest treball Dr. Uwe Mamat
K279a/mini-Tn7T-Gm-Pc-sfGFP_opt	wt*	K279a marcada florescentment amb sfGFP	Aquest treball
K279aΔ <i>mlaFEDCB</i> /pBBR1MCS1	Δ <i>mlaF-B</i>	K279a mutant dels components FEDCB del sistema Mla	Aquest treball
K279aΔ <i>mlaFEDCB</i> /pBBR1MCS1- <i>mlaFEDCB</i>	Δ <i>mlaF-B/mlaF-B</i>	K279a complementada pel mutant dels components FEDCB del sistema Mla	Aquest treball
K279aΔ <i>mlaFEDCB</i> /pBBR1MCS1/mini-Tn7T-Gm-Pc-sfGFP_opt	Δ <i>mlaF-B**</i>	K279a mutant pels components FEDCB del sistema Mla marcada amb sfGFP	Dr. Uwe Mamat
K279aΔ <i>mlaFEDCB</i> /pBBR1MCS1- <i>mlaFEDCB</i> /mini-Tn7T-Gm-Pc-sfGFP_opt	Δ <i>mlaF-B/mlaF-B**</i>	K279a complementada pel mutant dels components FEDCB del sistema Mla marcada amb sfGFP	Dr. Uwe Mamat
K279aΔ <i>mlaA</i> /pBBR1MCS1-BAD	Δ <i>mlaA</i>	K279a mutant del gen <i>mlaA</i> (lipoproteïna de transport de fosfolípids)	Aquest treball
K279aΔ <i>mlaA</i> /pBBR1MCS1-BAD- <i>mlaA</i>	Δ <i>mlaA/mlaA</i>	K279a complementada pel mutant <i>mlaA</i>	Aquest treball
K279aΔ <i>smoR</i> /pBBR1MCS1	Δ <i>smoR</i>	K279a mutant del gen <i>smoR</i> (regulador d'AhLs)	Aquest treball
K279aΔ <i>smoR</i> /pBBR1MCS1- <i>smoR</i>	Δ <i>smoR/smoR</i>	K279a complementada pel mutant <i>smoR</i>	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt2053</i> /pBBR1MCS1	Δ <i>smlt2053</i>	K279a mutant del gen <i>smlt2053</i> (regulador transcripcional)	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt2053</i> /pBBR1MCS1- <i>smlt2053</i>	Δ <i>smlt2053/smlt2053</i>	K279a complementada pel mutant <i>smlt2053</i>	Aquest treball
K279a/pBBR1MCS1- <i>smlt2053</i>	wt/ <i>smlt2053</i>	K279a amb una còpia extracromosòmica del gen <i>smlt2053</i>	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt0264-smlt0268</i> /pBBR1MCS1	Δ <i>smlt0264-smlt0268</i>	K279a mutant per l'operó <i>smlt0264-smlt0268</i> (catabolisme de lípids/aminoàcids)	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt0264-smlt0268</i> /pBBR1MCS1- <i>smlt0264-smlt0268</i>	Δ <i>smlt0264-smlt0268/smlt0264-smlt0268</i>	K279a complementada pel mutant <i>smlt0264-smlt0268</i>	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt2944</i> /pBBR1MCS1	Δ <i>smlt2944</i>	K279a mutant del gen <i>smlt2944</i> (porina putativa)	Aquest treball
K279aΔ <i>smlt2944</i> /pBBR1MCS1- <i>smlt2944</i>	Δ <i>smlt2944/smlt2944</i>	K279a complementada pel mutant <i>smlt2944</i>	Aquest treball

*Cada soca wt amb un plasmidi diferent s'utilitza pel seu conjunt de soques corresponents, que carreguen el mateix plasmidi.

** Conjunt de soques marcades florescentment, utilitzades en assajos de biofilm, amb la soca salvatge també marcada.

ANNEX

Taula Annex B. Llistat de plasmidis utilitzats en aquest treball.

Plasmidi	Característiques	Font
pBBR1-MCS1	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre amb resistència al cloramfenicol	Laboratori GMB
pBBR1-MCS1-BAD	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre, amb el promotor de l'operó de l'arabina (pBAD) amb resistència a cloramfenicol	Laboratori GMB
pGPI-SceI-SacB	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre que expressa l'endonucleasa I-SceI amb el marcador SacB. Mantingut en <i>E. coli</i> DH5 α	(156)
pGPI-SceI-XCm	Plasmidi suïcida en <i>S. maltophilia</i> i replicatiu en <i>E. coli</i> SY327. Expressa la proteïna λ pir requerida per a la clonació i propagació de plasmidis amb origen de replicació R6K. Expressa gen de resistència a cloramfenicol	(154)
pRK2013	Plasmidi <i>helper</i> que proporciona els gens <i>traI</i> <i>mob</i> necessaris per a la mobilització de plasmidis amb <i>oriT</i> , com pGPI-SceI-XCm i pGPI-SceI-SacB. Es manté en <i>E. coli</i> DH5 α	(154)
pET28b	Plasmidi d'expressió de proteïnes amb una cua d'histidina His-tag	Laboratori GMB
pGPI-SceI-mlaFEDCB	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ mlaFEDCB	Aquest treball
pGPI-SceI-mlaA	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ mlaA	Aquest treball
pGPI-SceI-smlt2053	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt2053	Aquest treball
pGPI-SceI-smoR	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smoR	Aquest treball
pGPI-SceI-smlt0264-smlt0268	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt0264-smlt0268	Aquest treball
pGPI-SceI-smlt2944	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt2944	Aquest treball
pBBR1-MCS1-mlaFEDCB	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ mlaFEDCB	Aquest treball
pBBR1-MCS1-BAD-mlaA	Plasmidi replicatiu amb el promotor de l'arabina per a la complementació del mutant K279a Δ mlaA	Aquest treball
pBBR1-MCS1-smlt2053	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ smlt2053	Aquest treball
pBBR1-MCS1-smoR	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ smoR	Aquest treball
pBBR1-MCS1-smlt0264-smlt0268	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ smlt0264-smlt0268	Aquest treball
pBBR1-MCS1-smlt2944	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ smlt2944	Aquest treball
pET28b-mlaC	Plasmidi d'expressió de la proteïna MlaC (Smlt4673)	Aquest treball
pET28b-smlt2053	Plasmidi d'expressió de la proteïna Smlt2053	Aquest treball
pUC18T-mini-Tn7T-Gm-Pc-sfGFP_opt	Plasmidi pel marcatge fluorescent amb GFP	Dr. Uwe Mamat
pUC18T-mini-Tn7T-Gm-Pc-tdTomato_opt	Plasmidi pel marcatge fluorescent amb tdTomato	Dr. Uwe Mamat

ANNEX

Taula Annex C. Llistat d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

Nom	Seqüència 5'-3'	Diana restricció	Objectiu
Oligonucleòtids mutant <i>smoR</i>			
smoR_Upstream_Up	TCAGaattcATGCCGAGTGTTTCATCC	EcoRI	Amplificar regió US del gen <i>smoR</i>
smoR_Upstream_Low	CTATTgctagcCGATCCAGTACACGCGTT	NheI	
smoR_Downstream_Up	TTAATgctagcACGGTGAGAAACCATCTG	NheI	Amplificar regió DS del gen <i>smoR</i>
smoR_Downstream_Low	GGTCagatctCCACGGCAAACATCAGTG	BglII	
smoR_Comp_Up	CAATTtctagaCAACGCCACATCATCACC	XbaI	Amplificar gen <i>smoR</i> per a la complementació del mutant
smoR_Comp_Low	ATATTaagcttCTCTCTCGGGACCCCTGT	HindIII	
smoR_Ext_Up	CTGCCGTTGGATGAGGTGGTC	-	Comprovació del mutant i complementat
smoR_Ext_Low	GTTCGTGTTCTCCGACCACC	-	
smoR_Int_Up	GATGGCAGCGATACCGACCTTG	-	
smoR_Int_Low	GCAACCCAGCGCAGCACTTC	-	
Oligonucleòtids mutant <i>smlt2053</i>			
smlt2053_Upstream_Up	GTTgaattcATTACTCTCAGCGCAAAC	EcoRI	Amplificar regió US del gen <i>smlt2053</i>
smlt2053_Upstream_Low	ATGATgctagcCTTGTCGAGAAGTG	NheI	
smlt2053_Downstream_Up	CCGCTgctagcTGATTCCACCCAGTAACTG	NheI	Amplificar regió DS del gen <i>smlt2053</i>
smlt2053_Downstream_Low	TAGagatctCGGTAGTCCTGCTTCTCCA	BglII	
smlt2053_Comp_Up	CATtctagaATAACGTAGGCGAATTG	XbaI	Amplificar gen <i>smlt2053</i> per a la complementació del mutant
smlt2053_Comp_Low	TTTaagcttGCAGTACTGGGTGGAATC	HindIII	
smlt2053_Ext_Up	TCGACGAAGAACTTCTCCA	-	Comprovació del mutant i complementat
smlt2053_Ext_Low	GATCTTCGAGCTGCTGGAG	-	
smlt2053_Int_Up	AGTAACTGCTGACCAACAA	-	
smlt2053_Int_Low	TCTTGTACAGGTCTGCT	-	
smlt2053_Seq1	CGACGAAGAACTTCTCCAG	-	Comprovació del complementat <i>smlt2053</i>
smlt2053_Seq2	GGGTTCTTGATCTTCAGGA	-	
Oligonucleòtids mutant <i>smlt0264-smlt0268</i>			
smlt0264-0268_Upstream_Up	CACgaattcGAAACGCATGTACGGCATCAC	EcoRI	Amplificar regió US <i>smlt0264-smlt0268</i>
smlt0264-0268_Upstream_Low	TACgctagcCTGCAACAGTCATGACGACAA	NheI	
smlt0264-0268_Downstream_Up	TTACgctagcATGAGCCACTCGATGACG	NheI	Amplificar regió DS <i>smlt0264-smlt0268</i>
smlt0264-0268_Downstream_Low	GGTAagatctATCAGCATCCACAACG	BglII	
smlt0264-0268_Comp_Up	AAAtctagaATGAATCGTCTGGCGTGTT	XbaI	Amplificar <i>smlt0264-smlt0268</i> per a la complementació del mutant
smlt0264-0268_Comp_Low	TTCaagcttACCTTCGTTGTCCACAA	HindIII	
smlt0264-0268_Ext_Up	GTCGAACAGTGAGGAAACATC	-	Comprovació del mutant i complementat
smlt0264-0268_Ext_Low	GTGGAAGAACTGGTGCAAG	-	
smlt0264-0268_Int_Up	TGGCAGGACGTGATCAATCCG	-	
smlt0264-0268_Int_Low	AACAACGTGGCCAATGGCGTG	-	
Oligonucleòtids mutant <i>smlt2944</i>			
smlt2944_Upstream_Up	ACGgaattcAGGTGTTGATGCTGGA	EcoRI	Amplificar regió US del gen <i>smlt2944</i>
smlt2944_Upstream_Low	TACTTgctagcATGCCAGACTCAGTA	NheI	
smlt2944_Downstream_Up	TTCATgctagcCTGTAATACAACCTTC	NheI	Amplificar regió DS del gen <i>smlt2944</i>

ANNEX

smlt2944_Downstream_Low	CGCagatctGGTGGTGACGGTCT	BglII	
smlt2944_Comp_Up	CATtctagaCACTCTCACTCTGTGCT	XbaI	Amplificar gen <i>smlt2944</i> per a la complementació del mutant
smlt2944_Comp_Low	TCTaagcttCTGCCATGACGATCT	HindIII	
smlt2944_Ext_Up	ATCCTCTCCGCACGTGATC	-	Comprovació del mutant i complementat
smlt2944_Ext_Low	AGAAGAACCAGCCGAAGAT	-	
smlt2944_Int_Up	GTACGCTCAACAGGGTGAT	-	
smlt2944_Int_Low	CAAAGAACCCCTTCAGATC	-	
Oligonucleòtids mutants sistema Mla			
mIaFEDCB_Upstream_Up	CCAgcgccgcACTTTTCAAATAC	NotI	Amplificar regió US dels gens <i>mIaFEDCB</i>
mIaFEDCB_Upstream_Low	GGGgtaccTAACGTTTTCTAGACATCGA	KpnI	
mIaFEDCB_Downstream_Up	CGAggtaccATGAACGTAGTGCGCAC	KpnI	Amplificar regió DS dels gens <i>mIaFEDCB</i>
mIaFEDCB_Downstream_Low	GCActtagaGTCTGGCCGAAGTCTCAT	XbaI	
mIaFEDCB_Comp_Up	AATTtctagaCCAGTGTGCGTGCAGCCAGC	XbaI	Amplificar gens <i>mIaFEDCB</i> per a la complementació del mutant
mIaFEDCB_Comp_Low	GGGaaagcttGCGCACGACGTTTCATGTCA	HindIII	
mIaFEDCB_Ext_Up	CGCAACCATGAAGATGAAACT	-	Comprovació del mutant <i>mIaFEDCB</i>
mIaFEDCB_Ext_Low	CTCAGTTCGTTGTAGCCAGCC	-	
mIaFEDCB_Seq1	GCCAAGCAGGGTGCACAAC	-	Comprovació complementat <i>mIaFEDCB</i>
mIaFEDCB_Seq2	CCAGCTGGATCAGGTCAACC	-	
mIaFEDCB_Seq3	CAGTGCCTACTTGCCATTGC	-	
mIaFEDCB_Seq4	GGTGGAGATGAAGCTGCATGC	-	
mIaFEDCB_Seq5	GCCGAGCCGACCATTGAAG	-	
mIaFEDCB_Seq6	TGCCGACATCAAGCTGTTCG	-	
mIaA_Upstream_Up	ATTgcgccgcTCGACCTGCTCAACATCCAG	NotI	Amplificar regió US del gen <i>mIaA</i>
mIaA_Upstream_Low	GCTggtaccGGAGAGTGCACGACGTTCA	KpnI	
mIaA_Downstream_Up	CTGggtaccTACAGCGACGCATGAAAAACC	KpnI	Amplificar regió DS del gen <i>mIaA</i>
mIaA_Downstream_Low	GAGtctagaCGTGAGCACTTCGATCCAGGA	XbaI	
mIaA_Comp_Up	TGGtctagaTGGATCTGGCTGAGGTGCAAC	XbaI	Amplificar el gen <i>mIaA</i> per a la complementació del mutant
mIaA_Comp_Low	TGCaagcttGAAAGACTCAGTGCGTC	HindIII	
mIaA_Ext_Up	AATGGCAAGTAACGCACTGGC	-	Comprovació del mutant <i>mIaA</i>
mIaA_Ext_Low	GCTATGCTGGTGGCCATTC	-	
MIaFEDCB_Seq5	GCCGAGCCGACCATTGAAG	-	Comprovació complementat <i>mIaA</i>
MIaFEDCB_Seq6	TGCCGACATCAAGCTGTTCG	-	
Oligonucleòtids expressió de proteïnes			
smlt2053_Protein_Up	ATTcatatGCCAAGCCCGCCACTTC	NdeI	Clonatge smlt2053 en pET28b
smlt2053_Protein_Low	TCAaagcttTCAAAGGAAGCGGGCAG	HindIII	
mIaC_Protein_Up	CGGtcatgaGCCATCATCATCATCATGCCGCCGCCCGCT	PagI	Clonatge mIaC en pET28b
mIaC_Protein_Low	GAGctcgagTACTTGCCATTGCCCGGGCCCGGCCTGCAT	XhoI	
T7_promoter	TTAATACGACTCACTATAGGG	-	Comprovació inserció gen clonat en pET28
T7_terminator	ACCGCTGAGCAATAACTAGC	-	
Oligonucleòtids generals			
MCS-Up	CACAGGAACACTTAACG	-	Comprovació construcció plasmidi pGPI-Scel-XCm de deleció
MCS-Low	GAGCCGATGATTAATTG	-	
M13-Up	GTAAAACGACGGCCAGT	-	Comprovació construcció plasmidi de complementació de la sèrie pBBR1-MCS1
M13-Low	CATGGTCATAGCTGTTTCCT	-	

ANNEX

Oligonucleòtids qRT-PCR			
rt_smlt2052_Up	TGGAGAAGCAGGACTACC	-	Expressió <i>smlt2052</i> qRT-PCR
rt_smlt2052_Low	AGT GGT AGG CGC TGT AGT	-	
rt_smlt2944_Up	TCTCCAACCTTCAACATCCA	-	Expressió <i>smlt2944</i> qRT-PCR
rt_smlt2944_Low	ATTGCCGAGCTGTCCATA	-	
rt_smlt2053_Up	CAAGTTCCTGTCCGACCA	-	Expressió <i>smlt2053</i> qRT-PCR
rt_smlt2053_Low	CTTGATCAGCCCGAAGTC	-	
rt_smlt0264_Up	GAGAACATGAGCGAGCTGG	-	Expressió <i>smlt0264</i> qRT-PCR
rt_smlt0264_Low	TAGGTGTCCACGCCATTG	-	
rt_rpoD_Up	AAGGGCCTGGAACAGGGCTA	-	Gen <i>housekeeping</i> per a
rt_rpoD_Low	CCACATCCGGCGCAACTTCA	-	normalitzar l'expressió
Oligonucleòtids amplificació sondes EMSA			
smlt2944_EMSA_Up	CGCTTGCGCATTGTCTGT	-	EMSA <i>smlt2944</i>
smlt2944_EMSA_Low	TGCATCTCCCCTGACGA	-	
smlt2053_EMSA_Up	GGGATGTCTCCAATGGAATC	-	EMSA <i>smlt2053</i>
smlt2053_EMSA_Low	GGTGGGCGGACCTTAATC	-	
smlt0198_EMSA_Up	GCCTTCGAGCGCGGCATG	-	EMSA <i>smlt0198</i>
smlt0198_EMSA_Low	AGGTCGCCATCGGCTACG	-	
smlt1974_EMSA_Up	ACATGGCTTCGACCTGGTGTC	-	EMSA <i>smlt1974</i>
smlt1974_EMSA_Low	CGTCGGCTCCACCACACTG	-	
smlt0608_EMSA_Up	CGACGGCAGTGCTACCTGC	-	EMSA <i>smlt0608</i>
smlt0608_EMSA_Low	GGATGTGCTGCTGCGCAAC	-	
smlt0297_EMSA_Up	CCTTACCTACTGCTCTATTACAGG	-	EMSA <i>smlt0297</i>
smlt0297_EMSA_Low	TGTTTTCCCCTCAGTGACAGT	-	

Taula Annex D. Top 50 DEGs sobreexpressats en la comparativa STAT vs LOG.

Locus ID	Anotació	Fold-change	p-adj
Smlt2713	Hypothetical protein	60,23	4,71E-120
Smlt2852	Hypothetical protein	41,19	1,10E-42
Smlt2851	Multidrug efflux SMR transporter	36,05	4,27E-87
Smlt2712	DUF560 domain-containing protein	26,40	8,93E-70
SMLT_RS23020	Hypothetical protein	25,63	2,16E-16
Smlt2841	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	24,23	2,43E-73
Smlt0050	Hypothetical protein	22,91	1,18E-03
SMLT_RS22880	Hypothetical protein	22,82	7,43E-09
Smlt2842	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	22,33	3,30E-262
Smlt3109	N-formylglutamate deformylase	21,11	1,94E-40
Smlt3446	TonB-dependent receptor	19,67	1,95E-183
Smlt0431	Cytochrome c oxidase assembly protein	19,64	2,53E-13
Smlt2839	Thioredoxin family protein	19,06	1,34E-59
Smlt2180	Glycoside hydrolase family 92 protein	18,26	1,90E-157
Smlt4574	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	17,75	3,03E-126
Smlt0430	Hypothetical protein	17,70	8,91E-09
Smlt2703	Thioredoxin family protein	16,40	2,71E-08
Smlt0685	Cell surface protein	15,31	6,50E-110
Smlt2840	Flavodoxin	15,02	6,86E-95

ANNEX

Smlt0686	S8 family serine peptidase	14,28	4,99E-156
Smlt1745	Pseudo	13,78	7,79E-03
Smlt1750	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	13,37	7,60E-20
SMLT_RS23240	Hypothetical protein	12,87	4,63E-02
Smlt4575	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	12,51	6,58E-93
Smlt2714	TonB-dependent receptor	12,27	3,63E-65
Smlt2428	Helix-turn-helix transcriptional regulator	12,27	5,30E-07
Smlt0385	DUF1428 domain-containing protein	11,91	1,71E-16
Smlt2511	Carboxymuconolactone decarboxylase family protein	11,63	1,56E-03
Smlt0432	Cytochrome c oxidase subunit 3	11,47	3,42E-32
Smlt3891	Sodium-translocating pyrophosphatase	11,11	2,41E-137
Smlt1837	Hypothetical protein	10,91	4,54E-04
Smlt2870	Flp pilus assembly protein CpaB	10,88	3,47E-15
Smlt2500	Hypothetical protein	10,66	8,99E-03
Smlt2482	Hypothetical protein	10,26	3,63E-49
Smlt3110	Urocanate hydratase	10,13	3,88E-70
Smlt2723	Hypothetical protein	10,08	1,24E-02
Smlt0429	Cytochrome c oxidase subunit I	9,99	4,01E-66
SMLT_RS07855	Hypothetical protein	9,89	1,06E-07
Smlt3570	Phosphatase PAP2 family protein	9,70	3,67E-87
Smlt2581	Hypothetical protein	9,62	8,96E-03
Smlt2732	Type II secretion system minor pseudopilin Gspl	9,61	3,41E-04
Smlt2501	Nucleotidyltransferase family protein	9,16	1,34E-12
Smlt4211	Serine hydrolase	9,14	1,08E-56
Smlt2134	GNAT family N-acetyltransferase	8,81	2,40E-13
Smlt1313	AAA family ATPase	8,80	3,77E-02
Smlt0362	ABC transporter ATP-binding protein	8,64	1,13E-36
Smlt1332	Pseudo	8,61	1,17E-25
Smlt1217	Redoxin domain-containing protein	8,46	1,19E-12
Smlt4688	TerC family protein	8,34	8,67E-75
Smlt0226	Signal peptidase I	8,24	4,56E-36

Taula Annex E. Top 50 DEGs infraexpressats en la comparativa STAT vs LOG.

Locus ID	Anotació	Fold-change	p-adj
Smlt2305	Flagellin	-44,38	6,90E-16
Smlt2306	Flagellin	-43,60	2,91E-16
Smlt2255	Hypothetical protein	-27,00	8,39E-09
Smlt2262	STAS domain-containing protein	-26,54	4,13E-13
Smlt3905	TonB-dependent receptor	-21,89	9,90E-193
Smlt2304	Flagellin	-21,29	3,80E-11
Smlt2646	HAMP domain-containing histidine kinase	-20,29	2,74E-62
Smlt2645	Response regulator transcription factor	-20,07	1,74E-74
Smlt_r05	5S ribosomal RNA	-19,97	6,67E-04
Smlt_r04	5S ribosomal RNA	-19,97	6,67E-04
Smlt_r11	5S ribosomal RNA	-19,97	6,67E-04
Smlt_r07	5S ribosomal RNA	-19,97	6,67E-04

ANNEX

Smlt1826	OmpA family lipoprotein	-19,77	5,36E-160
Smlt3758	Pilin	-18,87	4,10E-56
Smlt3588	Methyl-accepting chemotaxis protein	-17,86	2,13E-11
Smlt2644	Hypothetical protein	-17,52	1,11E-52
Smlt4123	Outer membrane beta-barrel protein	-16,71	4,12E-67
Smlt2256	Chemotaxis protein CheW	-15,03	5,13E-06
Smlt1385	Catalase	-14,98	1,58E-175
Smlt0598	Asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	-13,54	1,25E-95
Smlt2647	Membrane protein	-13,47	9,04E-32
Smlt2301	Hypothetical protein	-12,49	2,07E-04
Smlt1415	Aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent	-12,31	4,44E-71
Smlt2261	Response regulator	-11,55	5,23E-08
Smlt2928	Error-prone DNA polymerase	-11,32	8,47E-166
Smlt1740	Transcriptional repressor LexA	-11,24	3,11E-137
Smlt2302	Flagellar export chaperone FliS	-11,18	2,69E-05
Smlt1417	Nucleotide sugar aminotransferase	-11,15	1,06E-71
Smlt2201	Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	-11,11	1,97E-33
Smlt0387	Ax21 family protein	-10,90	1,19E-63
Smlt2926	Translesion DNA synthesis-associated protein ImuA	-10,72	1,18E-25
Smlt1414	GNAT family N-acetyltransferase	-10,40	1,40E-87
Smlt2264	ParA family protein	-10,16	4,83E-19
Smlt1418	DMT family transporter	-10,13	5,51E-56
Smlt1413	Hypothetical protein	-9,85	3,88E-48
Smlt1416	MtnX-like HAD-IB family phosphatase	-9,80	2,96E-72
Smlt2254	HAMP domain-containing protein	-9,55	1,72E-05
Smlt3358	DUF3011 domain-containing protein	-9,54	1,09E-128
Smlt2263	Chemotaxis protein CheW	-9,51	7,32E-19
Smlt2260	Chemotaxis protein CheA	-9,34	2,13E-08
Smlt0706	Fimbrial protein	-9,30	2,75E-252
Smlt0758	Cell division protein FtsQ/DivIB	-9,18	4,07E-67
Smlt3559	Aquaporin Z	-9,04	2,18E-120
Smlt0759	Cell division protein FtsA	-8,86	7,04E-133
Smlt3757	Pilin	-8,85	1,12E-27
Smlt3210	Glycine zipper 2TM domain-containing protein	-8,68	4,17E-167
Smlt0841	Peroxiredoxin	-8,64	3,04E-84
Smlt0540	Hypothetical protein	-8,28	4,57E-139
Smlt2318	Chemotaxis protein CheV	-8,25	1,02E-04
Smlt1419	EamA family transporter	-8,23	3,11E-48

ANNEX

Taula Annex F. Llistat de DEGs en la comparativa AHL vs DMSO (p-valor ajustat < 0,05 i |fold-change ≥ 1,5|).

Locus ID	Anotació	Fold-change	p-adj
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	7,33	2,65E-09
Smlt0077	Phenylalanine 4-monooxygenase	7,17	2,54E-09
Smlt2944	Hypothetical protein	4,29	6,33E-22
Smlt4591	Universal stress protein	4,03	3,68E-10
Smlt1690	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	3,93	5,54E-19
Smlt1687	4Fe-4S binding protein	3,84	7,76E-19
Smlt1758	Cytochrome c	3,51	1,91E-16
Smlt2744	General secretion pathway protein GspL	3,19	9,81E-03
Smlt2297	RNA polymerase factor sigma-54	3,17	4,40E-02
Smlt3600	Peroxisredoxin	3,13	3,25E-15
Smlt1757	C-type cytochrome	3,08	6,74E-10
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	2,84	3,48E-07
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	2,81	5,97E-03
Smlt0855	RNA polymerase sigma factor	2,77	2,82E-03
Smlt0265	Acyl-CoA dehydrogenase	2,73	2,06E-09
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	2,72	1,88E-36
Smlt3527	Hypothetical protein	2,69	4,18E-03
Smlt3647	Alpha/beta hydrolase	2,68	4,39E-05
Smlt3601	Bacterioferritin	2,66	3,84E-07
Smlt2180	Glycoside hydrolase family 92 protein	2,62	8,42E-17
SMLT_RS23010	Pseudo	2,59	7,32E-05
Smlt2272	Flagellar biosynthesis protein FlhF	2,56	9,31E-03
Smlt0281	Hypothetical protein	2,54	1,59E-03
Smlt2137	Universal stress protein	2,51	7,09E-08
Smlt3214	Hypothetical protein	2,43	1,61E-03
Smlt3010	HD domain-containing protein	2,42	1,91E-03
Smlt4268	Bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	2,40	1,21E-10
Smlt2029	LysR family transcriptional regulator	2,35	2,76E-03
Smlt4674	STAS domain-containing protein	2,29	1,20E-03
Smlt1318	DUF2958 domain-containing protein	2,29	1,89E-02
Smlt1083	MFS transporter	2,29	5,74E-11
Smlt0554	Dioxygenase	2,28	1,22E-02
Smlt1597	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	2,26	1,23E-04
Smlt0789	LysR family transcriptional regulator	2,24	1,67E-03
Smlt1582	NAD(P)-binding domain-containing protein	2,24	3,98E-02
Smlt3722	L2 family class A beta-lactamase	2,24	3,16E-09
Smlt3805	OmpW family protein	2,21	3,35E-07
SMLT_RS03975	DUF2007 domain-containing protein	2,20	4,38E-05
Smlt3614	Hypothetical protein	2,20	5,13E-07
Smlt0158	Two-component sensor histidine kinase	2,19	2,37E-08
Smlt3989	VIT family protein	2,18	2,20E-05
Smlt0690	General secretion pathway protein GspH	2,14	7,36E-03
Smlt0076	Hypothetical protein	2,14	7,86E-04
Smlt0266	Enoyl-CoA hydratase	2,14	9,96E-04
Smlt0788	Hypothetical protein	2,14	8,21E-04
Smlt3848	Formate dehydrogenase accessory protein FdhE	2,10	1,75E-11

ANNEX

Smlt0886	Cyanophycinase	2,10	2,47E-06
Smlt3621	WGR domain-containing protein	2,08	9,14E-03
Smlt2829	Flavin reductase family protein	2,07	8,37E-05
Smlt3420	LysR family transcriptional regulator	2,07	2,64E-03
SMLT_RS19700	NAD(P)-dependent oxidoreductase	2,06	9,31E-08
Smlt4085	Hypothetical protein	2,06	4,65E-02
Smlt3477	Energy transducer TonB	2,04	3,98E-03
Smlt4192	DUF3106 domain-containing protein	2,04	5,11E-04
Smlt1688	Hypothetical protein	2,03	3,48E-07
Smlt3294	Glutamate 5-kinase	2,02	2,45E-08
Smlt0435	Hypothetical protein	2,01	2,93E-05
Smlt0109	Glutamate synthase large subunit	2,01	3,57E-14
Smlt4560	DUF3261 domain-containing protein	1,99	3,54E-03
Smlt1105	HPr family phosphocarrier protein	1,99	1,17E-07
Smlt3849	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase	1,98	4,29E-11
Smlt2181	Lacl family DNA-binding transcriptional regulator	1,97	7,32E-05
Smlt2295	Sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	1,97	1,55E-03
Smlt1429	Deoxyribonuclease V	1,96	4,58E-02
Smlt0063	Toprim domain-containing protein	1,96	2,11E-02
Smlt3865	Cell division protein ZapA	1,95	5,53E-04
SMLT_RS08235	Hypothetical protein	1,95	1,20E-05
SMLT_RS02465	Metal/formaldehyde-sensitive transcriptional repressor	1,95	2,67E-02
Smlt0799	ATP-binding cassette domain-containing protein	1,94	1,83E-02
Smlt4237	Isocitrate lyase/phosphoenolpyruvate mutase family protein	1,94	2,33E-03
Smlt0078	Lrp/AsnC family transcriptional regulator	1,93	8,54E-04
Smlt4500	Hypothetical protein	1,93	4,65E-05
Smlt1602	WYL domain-containing protein	1,91	1,08E-03
Smlt3790	DUF2946 domain-containing protein	1,91	1,77E-03
Smlt2003	Hypothetical protein	1,91	2,85E-03
Smlt3719	DUF3011 domain-containing protein	1,90	1,31E-02
Smlt3985	TetR/AcrR family transcriptional regulator	1,90	5,86E-05
Smlt1092	LysR family transcriptional regulator	1,90	6,85E-05
Smlt3108	Histidine ammonia-lyase	1,89	4,13E-04
Smlt1599	ABC transporter permease	1,88	6,22E-04
Smlt0742	ABC transporter substrate-binding protein	1,88	3,92E-05
Smlt2197	DUF2388 domain-containing protein	1,87	5,97E-03
Smlt1459	5-demethoxyubiquinol-8 5-hydroxylase UbiM	1,87	4,62E-05
Smlt1785	HAMP domain-containing histidine kinase	1,87	1,60E-05
Smlt3360	Hypothetical protein	1,85	3,55E-02
Smlt0197	C-type cytochrome	1,85	3,17E-05
Smlt1452	DNA-3-methyladenine glycosylase 2 family protein	1,85	1,41E-04
Smlt0852	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,84	1,36E-06
Smlt1230	Biotin-independent malonate decarboxylase subunit beta	1,83	1,92E-02
Smlt0140	Histidine phosphatase family protein	1,83	1,37E-08
Smlt2504	Xanthine dehydrogenase family protein subunit M	1,83	3,55E-02
Smlt0581	NAD(P)H-binding protein	1,82	7,92E-07
Smlt4461	Pimeloyl-ACP methyl ester esterase BioH	1,82	1,20E-03
Smlt3091	Hypothetical protein	1,81	3,09E-02

ANNEX

Smlt4492	Dihydroxy-acid dehydratase	1,81	1,78E-12
Smlt0613	DUF4398 domain-containing protein	1,80	3,33E-04
Smlt4553	Ankyrin repeat domain-containing protein	1,80	1,68E-05
Smlt4289	Regulatory signaling modulator protein AmpE	1,80	1,27E-07
Smlt2708	Hypothetical protein	1,80	3,82E-04
Smlt0853	DUF3106 domain-containing protein	1,80	4,41E-03
Smlt2149	Hypothetical protein	1,80	1,25E-02
Smlt1570	Aspartate aminotransferase family protein	1,79	9,46E-03
Smlt1691	BLUF domain-containing protein	1,79	5,19E-03
Smlt2217	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	1,78	4,50E-05
Smlt2962	Hypothetical protein	1,78	2,35E-02
Smlt4689	Rhomboid family intramembrane serine protease	1,78	1,75E-02
Smlt3998	M23 family metallopeptidase	1,78	3,29E-02
Smlt0227	MFS transporter	1,78	7,57E-03
Smlt2693	Heavy metal response regulator transcription factor	1,77	7,17E-03
Smlt3980	LysR family transcriptional regulator	1,77	7,77E-08
Smlt3534	FAD-dependent monooxygenase	1,77	4,65E-05
Smlt0165	Porphyrin biosynthesis protein	1,77	2,41E-06
Smlt0117	BlaR protein	1,77	2,19E-05
Smlt4650	Lytic murein transglycosylase	1,77	6,51E-05
Smlt3793	LysR family transcriptional regulator	1,77	1,05E-04
SMLT_RS13815	Hypothetical protein	1,76	4,94E-05
Smlt3872	Thiamine phosphate synthase	1,76	7,62E-05
Smlt0679	RDD family protein	1,76	6,30E-03
Smlt0746	NRDE family protein	1,75	5,98E-03
Smlt1204	DUF2867 domain-containing protein	1,75	1,45E-03
Smlt4402	PLP-dependent aminotransferase family protein	1,75	6,78E-06
Smlt1274	Copper chaperone PCu(A)C	1,75	4,18E-05
Smlt1637	DNA internalization-related competence protein ComEC/Rec2	1,74	1,74E-03
Smlt4228	ABC transporter substrate-binding protein	1,74	2,64E-02
Smlt3239	Ribonuclease	1,74	7,44E-03
Smlt1099	Holliday junction resolvase RuvX	1,74	2,28E-04
SMLT_RS20100	Arylamine N-acetyltransferase	1,74	1,16E-03
Smlt2463	Helix-turn-helix domain-containing protein	1,74	8,43E-08
Smlt0723	Riboflavin biosynthesis protein RibD	1,74	2,16E-04
Smlt0244	Membrane protein	1,73	2,76E-03
Smlt0296	XRE family transcriptional regulator	1,73	3,75E-06
Smlt4294	DUF4126 domain-containing protein	1,73	1,48E-02
Smlt0185	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,73	1,01E-02
Smlt2167	Imidazole-4-carboxamide isomerase HisA	1,72	6,49E-04
Smlt4607	Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1,72	1,86E-02
Smlt0535	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	1,72	1,19E-04
Smlt3636	M23 family metallopeptidase	1,72	9,99E-04
Smlt2615	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,72	3,68E-03
Smlt0082	TIGR00266 family protein	1,72	1,08E-06
Smlt4681	LysR family transcriptional regulator	1,71	1,95E-02
Smlt0668	DUF4124 domain-containing protein	1,71	2,89E-03
Smlt1792	Glucokinase	1,71	3,50E-12

ANNEX

Smlt4207	MarR family transcriptional regulator	1,71	1,02E-02
Smlt1087	Pyrraline-5-carboxylate reductase	1,70	1,14E-04
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	1,70	1,56E-04
Smlt0159	Nitrogen regulation protein NR(I)	1,70	9,73E-06
Smlt2825	TIGR03571 family LLM class oxidoreductase	1,70	7,62E-05
Smlt3732	ATP-dependent chaperone ClpB	1,70	2,21E-09
Smlt0778	Phosphoenolpyruvate carboxylase	1,69	7,28E-13
Smlt4462	SDR family oxidoreductase	1,69	4,73E-03
Smlt4574	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,69	3,33E-04
Smlt3965	Amidohydrolase family protein	1,69	1,39E-04
Smlt3984	Hypothetical protein	1,69	4,08E-02
Smlt0167	Uroporphyrinogen-III synthase	1,69	1,63E-03
Smlt2152	Hypothetical protein	1,68	1,18E-02
Smlt3099	FHA domain-containing protein	1,68	5,83E-04
Smlt4413	Prolyl oligopeptidase family serine peptidase	1,68	1,98E-02
Smlt4303	2-polyprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone monooxygenase	1,68	1,41E-07
Smlt3324	tRNA glutamyl-Q(34) synthetase GluQRS	1,68	2,17E-03
Smlt3237	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	1,68	3,01E-04
Smlt0484	Hypothetical protein	1,67	1,91E-02
Smlt3617	Hypothetical protein	1,67	3,15E-04
Smlt0276	Hypothetical protein	1,67	3,56E-04
Smlt0590	PLP-dependent aminotransferase family protein	1,67	3,96E-05
Smlt0505	Hypothetical protein	1,66	1,28E-03
Smlt3506	Hypothetical protein	1,66	2,77E-03
Smlt0857	NAD(P)(+) transhydrogenase (Re/Si-specific) subunit beta	1,65	3,98E-05
Smlt3619	Shikimate kinase	1,65	1,32E-06
Smlt0192	Glycine zipper 2TM domain-containing protein	1,65	2,48E-03
Smlt0800	Arylesterase	1,65	4,66E-03
Smlt3925	Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1,65	6,23E-03
Smlt3818	DUF4381 family protein	1,65	3,23E-02
Smlt2209	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	1,65	1,85E-03
Smlt0268	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1,64	2,37E-02
Smlt3684	Hypothetical protein	1,64	5,26E-04
Smlt1458	Membrane protein	1,64	7,17E-03
Smlt2138	Transcriptional regulator	1,64	2,83E-04
Smlt3465	tRNA lysidine(34) synthetase TilS	1,63	3,16E-05
Smlt1004	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid kinase	1,63	8,73E-06
Smlt4007	Transglycosylase SLT domain-containing protein	1,63	1,71E-04
Smlt1508	Hypothetical protein	1,63	1,48E-02
Smlt1084	Redox-sensitive transcriptional activator SoxR	1,63	3,11E-02
Smlt4522	Epimerase	1,63	2,72E-04
Smlt1422	Response regulator	1,63	3,57E-03
Smlt1372	Nitronate monooxygenase	1,63	1,47E-03
Smlt1162	Hypothetical protein	1,63	3,82E-03
Smlt4386	Hypothetical protein	1,63	7,64E-03
Smlt4637	Glutamine amidotransferase	1,62	8,26E-03
Smlt0682	Chitinase	1,62	7,76E-03
SMLT_RS06100	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	1,62	3,91E-04

ANNEX

Smlt0575	HAD family phosphatase	1,62	4,64E-05
Smlt1177	Six-hairpin glycosidase-like protein	1,61	1,19E-04
Smlt3212	TatD family hydrolase	1,61	1,30E-03
Smlt2913	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,61	1,05E-03
Smlt4521	2-dehydropantoate 2-reductase	1,61	5,12E-05
Smlt3723	LysR family transcriptional regulator	1,61	2,79E-02
Smlt2174	Copper homeostasis protein CutC	1,61	5,33E-03
Smlt0108	FAD-dependent oxidoreductase	1,61	1,86E-03
Smlt1540	Response regulator	1,61	1,56E-04
Smlt0615	YdcH family protein	1,61	5,47E-03
Smlt0087	ATP-binding cassette domain-containing protein	1,60	2,53E-03
Smlt0094	SEL1-like repeat protein	1,60	2,26E-04
Smlt1563	Alpha/beta hydrolase	1,60	2,50E-02
Smlt0670	Hypothetical protein	1,60	2,46E-03
Smlt1561	Sulfurtransferase	1,60	1,40E-04
Smlt3720	Hypothetical protein	1,60	3,03E-05
Smlt3196	GNAT family N-acetyltransferase	1,60	7,20E-04
Smlt4167	Lauroyl acyltransferase	1,59	1,96E-03
Smlt3280	Thiol reductant ABC exporter subunit CydD	1,59	9,22E-06
Smlt4062	HAD family hydrolase	1,59	3,86E-04
Smlt4261	ABC transporter permease	1,59	1,02E-03
Smlt0580	MBL fold metallo-hydrolase	1,59	4,63E-06
Smlt2150	Membrane protein	1,58	8,30E-03
Smlt3677	tRNA threonylcarbamoyltransferase dimerization subunit 1 TsaB	1,58	8,54E-05
Smlt0567	D-amino acid dehydrogenase	1,58	2,35E-08
Smlt0166	Hypothetical protein	1,58	1,05E-03
Smlt2007	Aminotransferase class III-fold pyridoxal enzyme	1,58	7,77E-08
Smlt1654	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	1,57	4,96E-03
Smlt2896	LysR family transcriptional regulator	1,57	4,37E-03
Smlt4575	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	1,57	1,82E-03
Smlt0113	Hypothetical protein	1,57	2,63E-04
Smlt0569	DUF3016 domain-containing protein	1,56	2,80E-03
Smlt2299	Response regulator transcription factor	1,56	1,05E-03
Smlt1117	KpsF/GutQ family sugar-phosphate isomerase	1,56	4,53E-03
Smlt4360	Response regulator transcription factor	1,56	1,41E-02
Smlt3783	M28 family peptidase	1,56	7,21E-05
Smlt1129	DnaA regulatory inactivator Hda	1,56	6,92E-05
Smlt0701	Glycosyltransferase	1,56	3,50E-02
Smlt0766	DUF4124 domain-containing protein	1,55	3,55E-02
Smlt0849	Nitroreductase	1,55	1,30E-03
Smlt3293	Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	1,55	4,61E-05
Smlt3615	Aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Iz	1,55	8,33E-04
Smlt3991	MBL fold metallo-hydrolase	1,55	3,50E-02
Smlt4371	Accessory factor UbiK family protein	1,54	5,00E-02
Smlt4395	S8 family serine peptidase	1,54	1,45E-02
Smlt2967	Class I SAM-dependent methyltransferase	1,54	2,35E-02
Smlt0551	EAL domain-containing protein	1,54	1,77E-07
Smlt0105	M48 family metallopeptidase	1,54	6,21E-04

ANNEX

Smlt3851	Selenide, water dikinase Seld	1,54	4,02E-04
Smlt2175	TonB-dependent receptor	1,54	4,76E-04
Smlt4186	DUF4124 domain-containing protein	1,54	2,14E-02
Smlt3644	Hypothetical protein	1,54	7,05E-04
Smlt1784	Response regulator transcription factor	1,53	2,13E-03
Smlt3794	Cysteine synthase A	1,53	1,31E-02
Smlt3611	Propionate catabolism operon regulatory protein PrpR	1,53	5,53E-04
Smlt0391	Hypothetical protein	1,53	3,90E-02
Smlt1273	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	1,53	2,07E-04
Smlt4438	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1,53	2,01E-03
Smlt3819	DUF58 domain-containing protein	1,53	1,10E-03
Smlt3279	Thiol reductant ABC exporter subunit CydC	1,52	3,85E-02
Smlt4209	Response regulator transcription factor	1,52	2,37E-03
Smlt3526	Hypothetical protein	1,52	3,62E-03
Smlt1269	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	1,52	2,05E-02
Smlt1110	PTS sugar transporter subunit IIA	1,52	2,64E-03
Smlt1766	Alpha/beta fold hydrolase	1,52	1,42E-03
Smlt4691	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl synthesis GTPase MnmE	1,52	3,12E-04
Smlt0887	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	1,52	2,68E-03
Smlt4326	Sodium:calcium antiporter	1,52	4,71E-03
Smlt2341	Hypothetical protein	1,52	1,94E-03
Smlt1756	TonB-dependent receptor	1,52	4,62E-02
Smlt1598	ABC transporter ATP-binding protein	1,51	2,51E-02
Smlt3486	DUF998 domain-containing protein	1,51	3,67E-03
Smlt4197	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	1,51	2,51E-04
Smlt0080	Patatin-like phospholipase family protein	1,51	4,76E-04
Smlt0825	2-octaprenyl-6-methoxyphenyl hydroxylase	1,51	4,34E-03
Smlt3972	LysR family transcriptional regulator	1,51	9,24E-03
Smlt0269	Organic hydroperoxide resistance protein	1,51	4,34E-03
Smlt4100	Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	1,51	3,41E-02
Smlt4495A	Hypothetical protein	1,50	1,23E-02
Smlt1020	DUF58 domain-containing protein	1,50	1,57E-02
Smlt2709	Type II toxin-antitoxin system Phd/YefM family antitoxin	1,50	1,05E-02
Smlt4365	Polyamine aminopropyltransferase	-1,50	4,31E-06
Smlt1555	Porin	-1,50	9,01E-03
Smlt3402	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	-1,50	1,06E-06
Smlt4038	Response regulator	-1,50	1,05E-04
Smlt3523	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	-1,51	5,67E-10
SMLT_RS14445	Pseudo	-1,51	2,24E-03
Smlt0958	Hypothetical protein	-1,51	1,54E-03
Smlt2010	Preprotein translocase subunit YajC	-1,51	1,80E-04
Smlt2075	Hypothetical protein	-1,51	1,15E-02
Smlt2349	DUF805 domain-containing protein	-1,51	1,03E-03
SMLT_RS22590	Pseudo	-1,51	7,36E-03
Smlt2419	Helix-turn-helix transcriptional regulator	-1,51	4,31E-03
Smlt2055	23S rRNA (adenine(2503)-C(2))-methyltransferase RlmN	-1,51	3,26E-06
Smlt1716	Cell division protein FtsB	-1,51	6,99E-05
SMLT_RS22465	IS3 family transposase	-1,52	3,60E-05

ANNEX

Smlt1335	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin	-1,52	6,88E-04
Smlt1762	TonB-dependent siderophore receptor	-1,52	2,15E-03
Smlt4369	IS481-like element ISStma12 family transposase	-1,52	1,85E-06
Smlt1730	Hypothetical protein	-1,52	1,87E-02
SMLT_RS23250	Hypothetical protein	-1,52	4,30E-02
Smlt4256	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin	-1,52	2,67E-04
Smlt0901	30S ribosomal protein S12	-1,52	5,07E-04
Smlt3302	N-acetylornithine carbamoyltransferase	-1,52	4,94E-05
Smlt0859	Putative Fe-S cluster assembly protein SuFT	-1,52	1,21E-08
Smlt0831	Membrane protein	-1,52	5,67E-10
Smlt3508	Alkylphosphonate utilization protein	-1,53	7,32E-05
Smlt1305	MerR family transcriptional regulator	-1,53	2,76E-03
Smlt2425	ACR3 family arsenite efflux transporter	-1,53	6,89E-04
Smlt3369	Hypothetical protein	-1,53	1,99E-03
Smlt0496	DUF3427 domain-containing protein	-1,53	2,70E-06
Smlt1132	GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein	-1,53	2,44E-03
Smlt3034	AAA family ATPase	-1,53	2,07E-03
Smlt3867	EVE domain-containing protein	-1,53	1,19E-04
Smlt0631	Class I SAM-dependent methyltransferase	-1,53	1,46E-04
Smlt1101	Hypothetical protein	-1,53	4,33E-02
Smlt1400	DUF2628 domain-containing protein	-1,53	6,66E-04
Smlt3385	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	-1,53	1,34E-07
Smlt0066	Phage portal protein	-1,53	4,38E-05
Smlt1815	MBL fold metallo-hydrolase	-1,54	1,03E-04
Smlt1799	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-1,54	6,51E-05
Smlt2334	Hypothetical protein	-1,54	5,92E-07
Smlt3836	Type B 50S ribosomal protein L31	-1,54	1,09E-03
Smlt3910	BCCT family transporter	-1,54	5,26E-04
SMLT_RS06020	Pseudo	-1,54	1,15E-03
Smlt3316	Elongation factor P	-1,54	1,56E-08
Smlt1333	Hypothetical protein	-1,54	3,19E-03
Smlt3000	Hypothetical protein	-1,54	1,65E-03
Smlt1362	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	-1,54	6,38E-05
Smlt0716	Energy-dependent translational throttle protein EttA	-1,54	3,45E-10
Smlt1796	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	-1,54	6,24E-06
Smlt1047	Tail fiber domain-containing protein	-1,54	7,24E-04
Smlt0753	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	-1,54	2,33E-09
Smlt0910	30S ribosomal protein S19	-1,55	1,40E-03
Smlt0248	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-1,55	1,20E-05
Smlt3040	Hypothetical protein	-1,55	1,01E-02
Smlt0032	MFS transporter	-1,55	1,35E-03
Smlt1334	DNA-binding transcriptional regulator	-1,55	2,28E-04
Smlt3236	MFS transporter	-1,55	2,31E-06
Smlt1432	HD domain-containing protein	-1,55	8,11E-05
Smlt3468	DUF4870 domain-containing protein	-1,55	7,23E-07
Smlt2841	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-1,55	3,37E-02
Smlt0754	Putative lipid II flippase FtsW	-1,55	2,21E-09
Smlt1992	Molecular chaperone DnaK	-1,55	1,67E-05

ANNEX

Smlt0639	NAD(P)-dependent oxidoreductase	-1,55	5,91E-06
Smlt1295	LysR family transcriptional regulator	-1,55	9,09E-03
Smlt0918	50S ribosomal protein L5	-1,55	2,53E-03
SMLT_RS11925	Pseudo	-1,56	3,60E-02
Smlt4178	Peptide deformylase	-1,56	1,34E-06
Smlt1044	Phage major tail tube protein	-1,56	2,05E-02
Smlt0387	Ax21 family protein	-1,56	6,91E-03
Smlt1581	Polyamine ABC transporter substrate-binding protein	-1,56	3,69E-08
Smlt2435	DUF4198 domain-containing protein	-1,56	1,23E-03
Smlt4693	Membrane protein insertase YidC	-1,56	4,21E-05
Smlt4564	Acyl-CoA thioesterase	-1,56	1,53E-04
Smlt1067	TonB-dependent receptor	-1,56	1,17E-04
Smlt0351	ABC transporter permease	-1,56	2,44E-03
Smlt0644	Sulfatase-like hydrolase/transferase	-1,56	5,08E-06
Smlt1515	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	-1,56	3,07E-06
Smlt2706	Glycine betaine/L-proline transporter ProP	-1,56	5,32E-05
Smlt0892	Transcription termination/antitermination protein NusG	-1,57	1,44E-05
Smlt0023	Tyrosine-type recombinase/integrase	-1,57	8,84E-03
Smlt2999	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase	-1,57	1,91E-03
Smlt0926	Preprotein translocase subunit SecY	-1,57	4,71E-06
Smlt0727	Riboflavin synthase	-1,57	2,57E-02
Smlt1361	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	-1,57	2,78E-06
Smlt2441	Copper homeostasis membrane protein CopD	-1,57	3,16E-02
Smlt0046	2OG-Fe(II) oxygenase	-1,57	1,68E-05
Smlt0151	Type I glutamate--ammonia ligase	-1,57	8,63E-06
Smlt0897	50S ribosomal protein L7/L12	-1,58	2,82E-04
Smlt0037	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	-1,58	3,80E-03
Smlt1250	Cell division topological specificity factor MinE	-1,58	9,60E-04
SMLT_RS22405	AAA family ATPase	-1,58	1,20E-03
Smlt3235	Rhomboid family intramembrane serine protease	-1,58	4,24E-06
Smlt0629	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	-1,58	1,08E-06
Smlt3814	Dicarboxylate/amino acid:cation symporter	-1,58	5,29E-09
Smlt2185	Glycoside hydrolase family 2 protein	-1,58	5,28E-04
Smlt2800	Nuclear transport factor 2 family protein	-1,58	2,18E-05
Smlt1980	Hypothetical protein	-1,58	1,30E-04
Smlt1741	Recombinase RecA	-1,58	9,67E-06
Smlt0710	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)	-1,58	6,71E-04
Smlt2762	PAS sensor domain-containing protein	-1,59	6,46E-03
Smlt0298	DUF4935 domain-containing protein	-1,59	3,23E-03
Smlt1736	RNA chaperone Hfq	-1,59	1,80E-04
Smlt2335	ATP-dependent Clp protease adapter ClpS	-1,59	2,28E-04
Smlt2422	Arsenical resistance protein ArsH	-1,59	5,40E-04
Smlt0974	TonB-dependent receptor	-1,59	4,69E-03
Smlt1655	Hypothetical protein	-1,60	2,43E-02
Smlt1498	Outer membrane protein assembly factor BamA	-1,60	3,73E-09
SMLT_RS22615	DUF1674 domain-containing protein	-1,61	1,83E-04
Smlt3405	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	-1,61	2,51E-04
Smlt2438	DUF305 domain-containing protein	-1,61	2,29E-03

ANNEX

Smlt2791	Hypothetical protein	-1,61	5,87E-03
Smlt0249	Hypothetical protein	-1,61	2,28E-04
Smlt0921	50S ribosomal protein L6	-1,61	1,07E-05
Smlt4332	DUF1016 domain-containing protein	-1,61	4,32E-03
Smlt3375	50S ribosomal protein L20	-1,61	7,83E-06
Smlt0497	McrC family protein	-1,61	1,39E-06
Smlt0915	30S ribosomal protein S17	-1,61	1,35E-03
SMLT_RS22550	Hypothetical protein	-1,61	2,50E-03
Smlt4246	DNA-binding transcriptional regulator Fis	-1,61	6,28E-06
Smlt2786	Hypothetical protein	-1,62	4,84E-02
Smlt0619	ABC transporter ATP-binding protein	-1,62	2,72E-04
SMLT_RS23085	Hypothetical protein	-1,62	5,14E-03
Smlt3586	Hypothetical protein	-1,62	2,37E-04
Smlt2589	Serine hydrolase	-1,62	1,60E-05
Smlt4165	RNA polymerase sigma factor RpoD	-1,62	1,28E-09
Smlt0773	Hypothetical protein	-1,62	3,04E-04
Smlt1030	Acyl carrier protein	-1,62	1,13E-04
SMLT_RS22165	Hypothetical protein	-1,62	1,21E-08
Smlt0036	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter	-1,62	6,28E-06
Smlt4610	Membrane protein	-1,63	1,75E-05
Smlt0648	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase RfbA	-1,63	7,69E-07
Smlt4599	50S ribosomal protein L28	-1,63	1,16E-04
SMLT_RS06685	Hypothetical protein	-1,63	1,09E-03
Smlt0903	Elongation factor G	-1,63	1,74E-05
Smlt0724	Hypothetical protein	-1,63	2,37E-08
Smlt1585	ABC transporter permease subunit	-1,64	8,75E-07
Smlt3688	DNA starvation/stationary phase protection protein	-1,64	3,46E-05
Smlt3481	Ribosome silencing factor	-1,64	3,30E-10
SMLT_RS23055	Pseudo	-1,64	1,63E-04
Smlt1809	Molecular chaperone HtpG	-1,64	4,49E-07
Smlt1323	IS630-like element ISShma10 family transposase	-1,65	1,55E-03
Smlt3372	Integration host factor subunit alpha	-1,65	9,56E-05
Smlt4112	F0F1 ATP synthase subunit gamma	-1,65	7,39E-06
Smlt0841	Peroxisredoxin	-1,65	6,72E-05
Smlt0908	50S ribosomal protein L23	-1,66	1,67E-03
Smlt0636	Glycosyltransferase family 2 protein	-1,66	4,24E-09
SMLT_RS23270	Hypothetical protein	-1,66	6,15E-03
Smlt1656	Hypothetical protein	-1,66	1,07E-02
Smlt1332	Pseudo	-1,66	2,43E-02
Smlt2950	GNAT family N-acetyltransferase	-1,67	8,74E-05
Smlt0618	ABC transporter permease	-1,67	6,42E-05
Smlt4305	Adenosylmethionine decarboxylase	-1,67	3,79E-06
Smlt0352	ATP-binding cassette domain-containing protein	-1,67	7,81E-03
Smlt0383	Hypothetical protein	-1,67	1,66E-05
Smlt1503	Ribosome recycling factor	-1,68	9,44E-12
Smlt2339	Translation initiation factor IF-1	-1,68	6,33E-04
Smlt0329	NYN domain-containing protein	-1,68	2,10E-03
Smlt4119	Hypothetical protein	-1,68	3,53E-02

ANNEX

Smlt2338	Hypothetical protein	-1,68	3,89E-02
SMLT_RS22625	Ribbon-helix-helix protein, CopG family	-1,68	4,56E-04
SMLT_RS22650	MiscRNA	-1,68	2,37E-07
SMLT_RS23090	Pseudo	-1,68	5,68E-05
Smlt2237	Choline dehydrogenase	-1,68	1,92E-03
Smlt1065	Hypothetical protein	-1,68	1,10E-02
Smlt1360	Ubiquinol oxidase subunit II	-1,68	1,21E-08
SMLT_RS14430	Ankyrin repeat domain-containing protein	-1,69	1,45E-03
SMLT_RS22400	NcRNA	-1,69	6,49E-04
Smlt1399	Hypothetical protein	-1,69	4,75E-04
Smlt1336	Integrase arm-type DNA-binding domain-containing protein	-1,69	3,25E-05
Smlt0504	Hypothetical protein	-1,69	1,32E-06
Smlt4069	Low affinity iron permease family protein	-1,70	1,14E-02
Smlt0894	50S ribosomal protein L11	-1,70	6,27E-07
Smlt0628	GtrA family protein	-1,70	3,79E-07
Smlt3550	DUF4845 domain-containing protein	-1,70	9,80E-06
SMLT_RS06705	Hypothetical protein	-1,71	1,18E-02
Smlt0635	Hypothetical protein	-1,71	5,98E-11
Smlt0444	30S ribosomal protein S21	-1,71	1,11E-03
SMLT_RS23190	Hypothetical protein	-1,71	1,09E-02
Smlt2424	Arsenate reductase ArsC	-1,71	2,05E-04
Smlt0414	Hypothetical protein	-1,71	1,33E-02
Smlt0942	Translational GTPase TypA	-1,71	6,85E-08
Smlt1275	Hypothetical protein	-1,72	8,43E-08
SMLT_RS11705	DUF411 domain-containing protein	-1,72	2,37E-02
Smlt1961	N4-gp56 family major capsid protein	-1,72	4,82E-02
Smlt0020	Hypothetical protein	-1,72	7,20E-05
Smlt1276	Acyl-CoA thioesterase	-1,72	3,29E-08
Smlt2044	Integration host factor subunit beta	-1,72	7,13E-06
Smlt1024	Hypothetical protein	-1,72	4,52E-06
Smlt4447A	Hypothetical protein	-1,72	2,22E-03
Smlt0621	Class I SAM-dependent methyltransferase	-1,72	1,79E-09
Smlt4117	F0F1 ATP synthase subunit A	-1,73	1,21E-08
Smlt3570	Phosphatase PAP2 family protein	-1,73	2,38E-07
Smlt4068	Hypothetical protein	-1,73	4,96E-04
Smlt0024	Hypothetical protein	-1,73	1,04E-03
Smlt0905	30S ribosomal protein S10	-1,73	1,88E-05
Smlt0152	P-II family nitrogen regulator	-1,74	2,62E-04
Smlt2450	Helix-turn-helix transcriptional regulator	-1,74	8,87E-08
Smlt1460	RNA-binding S4 domain-containing protein	-1,74	1,96E-02
Smlt1329	Nucleoid-associated protein	-1,74	4,94E-05
Smlt2961	Hypothetical protein	-1,74	1,15E-04
Smlt1278	50S ribosomal protein L21	-1,74	2,37E-07
Smlt0622	Glycosyl hydrolase	-1,74	4,09E-11
Smlt2711	Response regulator	-1,75	2,50E-03
Smlt3900	RNA polymerase sigma factor	-1,75	1,83E-02
Smlt1849A	Hypothetical protein	-1,75	1,23E-03
Smlt1322	Hypothetical protein	-1,76	1,35E-03

ANNEX

Smlt0924	50S ribosomal protein L30	-1,76	6,42E-05
Smlt1396A	DUF596 domain-containing protein	-1,76	7,18E-03
Smlt0035	HupE/UreJ family protein	-1,77	2,51E-03
Smlt0930	30S ribosomal protein S4	-1,77	1,23E-09
Smlt0627	GtrA family protein	-1,77	2,55E-06
Smlt2421	Arsenate reductase (glutaredoxin)	-1,77	6,49E-04
Smlt0709	Type 1 fimbrial protein	-1,77	5,67E-10
Smlt2022	Cold-shock protein	-1,77	2,91E-06
Smlt1800	Succinate dehydrogenase assembly factor 2	-1,78	3,61E-05
Smlt2104	Amidohydrolase	-1,78	2,06E-02
Smlt2307	Flagellar hook-associated protein FlgL	-1,78	2,73E-03
Smlt2560	Aromatic alcohol reductase	-1,78	7,62E-07
SMLT_RS22735	DUF1508 domain-containing protein	-1,79	1,81E-03
Smlt0706	Fimbrial protein	-1,80	1,79E-16
Smlt3022	TonB-dependent receptor	-1,80	4,99E-03
Smlt2986	Hypothetical protein	-1,80	5,96E-03
Smlt1844	Modification methylase	-1,81	2,70E-06
SMLT_RS12550	AprI/Inh family metalloprotease inhibitor	-1,81	4,98E-02
Smlt1331	Hypothetical protein	-1,81	9,92E-06
Smlt1744	Carbon storage regulator CsrA	-1,81	1,50E-04
Smlt4147	Hypothetical protein	-1,81	1,55E-03
SMLT_RS00075	Hypothetical protein	-1,82	6,06E-06
Smlt4115	FOF1 ATP synthase subunit B	-1,83	2,75E-10
Smlt1740	Transcriptional repressor LexA	-1,83	1,37E-08
Smlt0797	Hypothetical protein	-1,83	6,19E-03
Smlt3039	Y-family DNA polymerase	-1,83	3,77E-05
Smlt0920	30S ribosomal protein S8	-1,84	2,17E-06
SMLT_RS22865	50S ribosomal protein L35	-1,84	2,97E-05
Smlt0019	PA0069 family radical SAM protein	-1,84	3,20E-06
Smlt4123	Outer membrane beta-barrel protein	-1,85	9,96E-04
Smlt3386	30S ribosomal protein S15	-1,85	8,43E-08
Smlt2434	Efflux RND transporter permease subunit	-1,86	2,71E-04
Smlt3377	Translation initiation factor IF-3	-1,87	5,67E-07
SMLT_RS11665	TonB-dependent receptor	-1,87	7,32E-05
Smlt0021	Hypothetical protein	-1,88	3,73E-05
Smlt1064	Hypothetical protein	-1,88	2,65E-06
Smlt1011	Pseudo	-1,89	1,70E-07
Smlt1012	Hypothetical protein	-1,89	3,48E-07
Smlt1844A	Modification methylase	-1,89	3,04E-07
Smlt3150	30S ribosomal protein S6	-1,90	1,45E-08
SMLT_RS13285	Hypothetical protein	-1,90	2,84E-02
Smlt3149	30S ribosomal protein S18	-1,90	4,29E-07
Smlt1911	Hypothetical protein	-1,91	1,04E-02
Smlt2045	DUF1049 domain-containing protein	-1,91	2,82E-08
SMLT_RS06670	Ribonuclease inhibitor	-1,92	4,27E-02
Smlt2475	WYL domain-containing protein	-1,93	4,68E-06
Smlt1846A	Hypothetical protein	-1,95	7,12E-08
Smlt1912	Hypothetical protein	-1,95	2,07E-03

ANNEX

Smlt2269	Chemotaxis protein CheY	-1,95	3,89E-02
Smlt1324	Hypothetical protein	-1,96	6,22E-04
Smlt0623	Glycosyl transferase	-1,97	7,52E-13
Smlt0018	Hypothetical protein	-1,98	2,17E-06
Smlt1844B	Hypothetical protein	-1,99	1,97E-08
Smlt3942	Dicarboxylate/amino acid:cation symporter	-2,00	1,64E-03
Smlt1880	Hypothetical protein	-2,00	2,36E-06
Smlt1013	Restriction-modification system methyltransferase	-2,00	4,06E-09
Smlt4298	Bacterioferritin-associated ferredoxin	-2,01	6,38E-05
Smlt3023	Hypothetical protein	-2,02	5,12E-03
SMLT_RS23110	Hypothetical protein	-2,03	8,26E-09
Smlt2803	Diacylglycerol kinase	-2,03	4,04E-03
Smlt1846B	AAA domain-containing protein	-2,04	2,51E-12
Smlt4661	DUF1656 domain-containing protein	-2,08	3,13E-06
Smlt3898	TonB-dependent receptor	-2,12	8,30E-05
Smlt2477	Hypothetical protein	-2,14	2,43E-04
Smlt2647	Membrane protein	-2,15	2,01E-03
Smlt4363	Hypothetical protein	-2,15	1,26E-06
Smlt2942	Lysine decarboxylase	-2,41	2,48E-03
Smlt_r10	16S ribosomal RNA	-2,41	4,68E-02
Smlt0794	Hemin uptake protein HemP	-2,45	4,61E-05
SMLT_RS23155	Hypothetical protein	-2,51	9,43E-05
Smlt1935	DUF1064 domain-containing protein	-2,63	1,47E-02
Smlt2941	Cation diffusion facilitator family transporter	-2,81	2,91E-03
Smlt2816	Hypothetical protein	-3,10	3,39E-05
Smlt2773	Nitrate reductase subunit beta	-3,64	5,20E-04
Smlt2770	Rotamase	-4,10	2,75E-02
Smlt2771	Respiratory nitrate reductase subunit gamma	-5,73	1,35E-03
Smlt2769	NarK/NasA family nitrate transporter	-6,03	8,04E-04

Taula Annex G. Llistat de DEGs en la comparativa DSF vs DMSO (p-valor ajustat < 0,05 i |fold-change ≥ 1,5|).

Locus ID	Anotació	Fold-change	p-adj
Smlt0077	Phenylalanine 4-monooxygenase	7,77	8,97E-08
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	6,52	8,49E-07
Smlt4591	Universal stress protein	5,33	2,10E-11
Smlt2944	Hypothetical protein	4,88	6,53E-21
Smlt1690	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	4,73	1,05E-19
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	4,12	7,88E-10
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	3,79	1,23E-02
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	3,54	1,13E-48
SMLT_RS23010	Pseudo	3,51	4,46E-06
Smlt1757	C-type cytochrome	3,24	2,11E-08
Smlt3601	Bacterioferritin	3,11	2,63E-07

ANNEX

Smlt0615	YdcH family protein	3,06	7,47E-10
Smlt3647	Alpha/beta hydrolase	3,05	1,51E-04
Smlt3600	Peroxiredoxin	2,98	2,10E-11
Smlt1687	4Fe-4S binding protein	2,89	2,83E-09
Smlt0076	Hypothetical protein	2,82	1,73E-04
Smlt3805	OmpW family protein	2,79	5,87E-09
Smlt0265	Acyl-CoA dehydrogenase	2,71	3,24E-07
Smlt2180	Glycoside hydrolase family 92 protein	2,70	2,20E-14
Smlt1758	Cytochrome c	2,65	8,97E-08
Smlt0266	Enoyl-CoA hydratase	2,60	1,27E-03
Smlt1688	Hypothetical protein	2,35	3,70E-08
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	2,30	1,47E-07
Smlt1995	MFS transporter	2,22	2,98E-02
Smlt2052	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase	2,06	3,46E-04
Smlt2137	Universal stress protein	2,05	1,86E-03
Smlt3732	ATP-dependent chaperone ClpB	2,04	2,40E-13
Smlt4268	Bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	2,03	2,15E-05
Smlt3648	Acyl-CoA dehydrogenase	1,99	3,14E-07
Smlt1691	BLUF domain-containing protein	1,97	2,98E-02
Smlt4574	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,95	1,58E-04
Smlt4575	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	1,94	1,51E-04
Smlt0109	Glutamate synthase large subunit	1,94	7,12E-10
Smlt2093	Oleate hydratase	1,91	8,49E-07
Smlt2842	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	1,86	3,70E-08
Smlt0569	DUF3016 domain-containing protein	1,84	1,50E-03
Smlt2089	Polyketide cyclase	1,80	1,64E-02
SMLT_RS13815	Hypothetical protein	1,80	1,11E-03
Smlt3283	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,75	1,25E-02
Smlt4492	Dihydroxy-acid dehydratase	1,75	6,48E-09
Smlt3497	DUF2147 domain-containing protein	1,74	5,85E-03
Smlt3614	Hypothetical protein	1,71	2,67E-02
Smlt4330	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	1,71	1,51E-04
Smlt3446	TonB-dependent receptor	1,69	1,61E-04
Smlt1459	5-demethoxyubiquinol-8 5-hydroxylase UbiM	1,69	2,45E-02
Smlt3725	TonB-dependent receptor	1,66	3,17E-09
Smlt1083	MFS transporter	1,66	5,14E-03
Smlt2175	TonB-dependent receptor	1,64	1,86E-03
Smlt3352	Acyl-CoA dehydrogenase	1,64	1,15E-08
Smlt0183	Lytic murein transglycosylase	1,60	2,40E-02
Smlt0581	NAD(P)H-binding protein	1,58	8,25E-03
Smlt3891	Sodium-translocating pyrophosphatase	1,56	2,74E-03
Smlt3848	Formate dehydrogenase accessory protein FdhE	1,55	5,85E-03
Smlt3849	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase	1,55	2,36E-03
Smlt1792	Glucokinase	1,53	5,56E-06
Smlt2007	Aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent	1,52	7,00E-05
Smlt0605	DEAD/DEAH box helicase	-1,54	1,11E-04
Smlt2502	XshC-Cox1-family protein	-1,84	2,98E-02

ANNEX

Taula Annex H. Llistat dels DEGS comuns en els tractaments amb AHL i DSF.

Locus ID	Anotació	Fold-change	
		AHL	DSF
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	7,33	6,52
Smlt0077	Phenylalanine 4-monooxygenase	7,17	7,77
Smlt2944	Hypothetical protein	4,29	4,88
Smlt4591	Universal stress protein	4,03	5,33
Smlt1690	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	3,93	4,73
Smlt1687	4Fe-4S binding protein	3,84	2,89
Smlt1758	Cytochrome c	3,51	2,65
Smlt3600	Peroxiredoxin	3,13	2,98
Smlt1757	C-type cytochrome	3,08	3,24
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	2,84	4,12
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	2,81	3,79
Smlt0265	Acyl-CoA dehydrogenase	2,73	2,71
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	2,72	3,54
Smlt3647	Alpha/beta hydrolase	2,68	3,05
Smlt3601	Bacterioferritin	2,66	3,11
Smlt2180	Glycoside hydrolase family 92 protein	2,62	2,70
SMLT_RS23010	Pseudo	2,59	3,51
Smlt2137	Universal stress protein	2,51	2,05
Smlt4268	Bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	2,40	2,03
Smlt1083	MFS transporter	2,29	1,66
Smlt3805	OmpW family protein	2,21	2,79
Smlt3614	Hypothetical protein	2,20	1,71
Smlt0076	Hypothetical protein	2,14	2,82
Smlt0266	Enoyl-CoA hydratase	2,14	2,60
Smlt3848	Formate dehydrogenase accessory protein FdhE	2,10	1,55
Smlt1688	Hypothetical protein	2,03	2,35
Smlt0109	Glutamate synthase large subunit	2,01	1,94
Smlt3849	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase	1,98	1,55
Smlt1459	5-demethoxyubiquinol-8 5-hydroxylase UbiM	1,87	1,69
Smlt0581	NAD(P)H-binding protein	1,82	1,58
Smlt4492	Dihydroxy-acid dehydratase	1,81	1,75
Smlt1691	BLUF domain-containing protein	1,79	1,97
SMLT_RS13815	Hypothetical protein	1,76	1,80
Smlt1792	Glucokinase	1,71	1,53
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	1,70	2,30
Smlt3732	ATP-dependent chaperone ClpB	1,70	2,04
Smlt4574	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,69	1,95
Smlt0615	YdcH family protein	1,61	3,06
Smlt2007	Aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent	1,58	1,52
Smlt4575	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	1,57	1,94
Smlt0569	DUF3016 domain-containing protein	1,56	1,84
Smlt2175	TonB-dependent receptor	1,54	1,64

ANNEX

Taula Annex I. Llistat de DEGs en la comparativa $\Delta smoR$ vs WT (p -valor ajustat $< 0,05$ i $|fold-change| \geq 1,5$).

Locus ID	Anotació	Fold-change	p-adj
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	-8,44	8,36E-15
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	-6,36	1,46E-03
Smlt1758	Cytochrome c	-6,10	1,94E-11
Smlt1839	Hypothetical protein	-5,60	2,77E-06
Smlt1688	Hypothetical protein	-5,48	1,61E-05
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	-5,13	5,60E-07
Smlt1690	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	-4,84	1,32E-07
Smlt3805	OmpW family protein	-4,21	1,78E-09
Smlt1524	Bacterioferritin	-4,00	4,65E-08
Smlt1054	Glycoside hydrolase family 104 protein	-3,72	2,13E-04
Smlt1049	Baseplate assembly protein	-3,37	1,43E-06
Smlt1045	Tail protein	-3,35	1,90E-27
Smlt1687	4Fe-4S binding protein	-3,28	1,02E-04
SMLT_RS05120	Helix-turn-helix domain-containing protein	-3,18	1,19E-07
Smlt1050	Phage baseplate protein	-3,18	5,58E-05
Smlt1047	Tail fiber domain-containing protein	-3,15	8,46E-26
Smlt1048	Phage tail protein I	-3,15	1,10E-08
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	-3,10	3,04E-02
Smlt0077	Phenylalanine 4-monooxygenase	-3,09	9,69E-04
Smlt1051	Phage baseplate assembly protein V	-3,09	2,98E-05
Smlt1046	Hypothetical protein	-3,08	4,05E-09
Smlt1044	Phage major tail tube protein	-3,00	4,23E-15
Smlt3647	Alpha/beta hydrolase	-2,92	2,29E-06
Smlt1043	Phage tail assembly protein	-2,84	1,39E-11
Smlt1041	Phage tail protein	-2,79	1,82E-10
Smlt1042	Phage tail tape measure protein	-2,74	9,48E-25
Smlt1055	Hypothetical protein	-2,50	4,86E-03
Smlt1060	Hypothetical protein	-2,48	2,71E-02
Smlt1757	C-type cytochrome	-2,48	1,45E-03
Smlt1065	Hypothetical protein	-2,46	2,30E-07
Smlt0499	Hypothetical protein	-2,35	2,49E-05
Smlt1039	Phage tail protein	-2,33	5,99E-11
Smlt0108	FAD-dependent oxidoreductase	-2,32	8,83E-04
Smlt1052	Hypothetical protein	-2,30	3,26E-03
Smlt0268	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-2,22	4,74E-04
Smlt1058	Hypothetical protein	-2,17	8,96E-07
Smlt1064	Hypothetical protein	-2,16	1,19E-08
Smlt2431	Hypothetical protein	-2,16	1,35E-05
Smlt2944	Hypothetical protein	-2,14	3,00E-02
SMLT_RS00245	Hypothetical protein	-2,14	2,77E-06
Smlt2950	GNAT family N-acetyltransferase	-2,14	4,37E-06
Smlt0281	Hypothetical protein	-2,09	2,46E-02
Smlt1850	Hypothetical protein	-2,08	3,57E-02
Smlt0262	Hypothetical protein	-1,99	3,27E-07
Smlt1059	Hypothetical protein	-1,99	8,06E-03
Smlt2783	Hypothetical protein	-1,98	1,60E-03

ANNEX

Smlt2261	Response regulator	-1,98	6,48E-04
Smlt4020	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	-1,97	2,07E-03
Smlt1664	Hypothetical protein	-1,95	3,59E-03
Smlt1366	DNA repair protein RadA	-1,92	1,69E-05
Smlt1789	Bifunctional 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	-1,92	1,79E-02
Smlt1266	Arginyltransferase	-1,91	2,41E-04
Smlt4019	DUF1624 domain-containing protein	-1,89	7,33E-03
Smlt3497	DUF2147 domain-containing protein	-1,88	5,41E-05
Smlt1873	Phage terminase large subunit family protein	-1,87	2,71E-05
Smlt1790	Phosphogluconate dehydratase	-1,87	6,43E-04
Smlt2304	Flagellin	-1,86	1,04E-02
Smlt3107	Imidazolonepropionase	-1,85	1,98E-03
Smlt1601	Glutathione S-transferase	-1,85	1,28E-02
Smlt0152	P-II family nitrogen regulator	-1,84	2,96E-02
Smlt0611	Putative DNA modification/repair radical SAM protein	-1,83	8,32E-04
SMLT_RS14635	Hypothetical protein	-1,82	3,88E-04
Smlt0109	Glutamate synthase large subunit	-1,82	1,34E-06
Smlt1179	Cyclomaltodextrin glucanotransferase	-1,81	3,13E-06
Smlt4492	Dihydroxy-acid dehydratase	-1,80	1,51E-04
Smlt1891	ATP-binding protein	-1,79	2,27E-03
Smlt2270	RNA polymerase sigma factor FliA	-1,79	2,93E-02
SMLT_RS00075	Hypothetical protein	-1,79	1,04E-07
Smlt3444	TonB-dependent receptor	-1,79	7,03E-04
Smlt1888	Isoleucyl-tRNA synthetase	-1,79	1,35E-02
Smlt4368	Kinase	-1,79	4,22E-03
Smlt1874	Hypothetical protein	-1,74	2,62E-02
Smlt1867	Head decoration protein	-1,74	9,53E-03
Smlt2254	HAMP domain-containing protein	-1,73	1,31E-02
Smlt1061	Toprim domain-containing protein	-1,73	8,39E-08
Smlt1872	Hypothetical protein	-1,73	1,71E-02
Smlt4678	DNA recombination protein RmuC	-1,72	3,71E-05
Smlt2305	Flagellin	-1,71	3,60E-02
SMLT_RS22775	Hypothetical protein	-1,71	3,50E-02
SMLT_RS08030	Hypothetical protein	-1,71	5,83E-03
Smlt0615	YdcH family protein	-1,69	1,55E-02
Smlt4023	Sugar MFS transporter	-1,67	1,12E-02
Smlt3789	TonB-dependent copper receptor	-1,67	7,31E-11
Smlt1742	Recombination regulator RecX	-1,67	1,60E-08
Smlt1893	Hypothetical protein	-1,66	2,42E-02
SMLT_RS00910	Hypothetical protein	-1,65	1,68E-06
Smlt1892	Hypothetical protein	-1,65	5,45E-03
Smlt3916	Threonine dehydratase	-1,65	2,09E-02
Smlt2255	Hypothetical protein	-1,65	1,88E-02
Smlt3352	Acyl-CoA dehydrogenase	-1,65	5,92E-06
Smlt2669	Hypothetical protein	-1,64	1,89E-02
Smlt0018	Hypothetical protein	-1,63	2,23E-06
Smlt3279	Thiol reductant ABC exporter subunit CydC	-1,63	1,93E-02
Smlt1868	S49 family peptidase	-1,63	1,96E-04

ANNEX

Smlt0193	Peptidoglycan-binding protein	-1,63	6,68E-10
Smlt2181	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	-1,62	2,52E-02
Smlt2262	STAS domain-containing protein	-1,61	9,44E-03
Smlt3463	Alkaline phosphatase	-1,61	4,41E-07
Smlt0151	Type I glutamate--ammonia ligase	-1,60	2,28E-02
Smlt0019	PA0069 family radical SAM protein	-1,59	1,33E-04
Smlt3845	Formate dehydrogenase subunit beta	-1,59	2,62E-02
Smlt1857	DUF2163 domain-containing protein	-1,59	1,51E-02
Smlt1067	TonB-dependent receptor	-1,58	6,62E-07
Smlt0328	Hypothetical protein	-1,58	3,46E-02
Smlt1849A	Hypothetical protein	-1,58	6,87E-03
Smlt0267	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	-1,57	8,12E-03
Smlt1057	Hypothetical protein	-1,57	1,00E-03
Smlt0610	UdgX family uracil-DNA binding protein	-1,56	2,91E-02
Smlt0498	Hypothetical protein	-1,56	2,98E-02
Smlt1466	AAA family ATPase	-1,55	9,31E-04
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-1,54	4,64E-04
Smlt2320	Flagellar biosynthesis anti-sigma factor FlgM	-1,54	7,69E-04
Smlt1001	Autotransporter domain-containing protein	-1,54	1,44E-03
Smlt2031	Cytochrome c	-1,53	9,16E-04
Smlt1170	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine--D-glutamate ligase	-1,53	1,93E-03
Smlt0960	Hypothetical protein	-1,52	9,25E-07
Smlt3790	DUF2946 domain-containing protein	-1,52	2,57E-02
Smlt3598	Response regulator	-1,52	3,43E-03
Smlt1854	Tail assembly protein	-1,52	1,03E-03
Smlt3795	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase	-1,51	3,81E-03
Smlt2409	Hg(II)-responsive transcriptional regulator	-1,51	1,95E-02
Smlt1858	Hypothetical protein	-1,51	1,23E-02
Smlt2260	Chemotaxis protein CheA	-1,51	1,86E-02
Smlt1741	Recombinase RecA	-1,50	1,95E-06
Smlt3976	S-formylglutathione hydrolase	-1,50	5,83E-03
Smlt2784	Hypothetical protein	-1,50	1,62E-02
Smlt4552	Potassium transporter	1,50	3,21E-03
Smlt4610	Membrane protein	1,50	1,38E-04
Smlt3419	Tryptophan synthase subunit beta	1,51	2,71E-02
Smlt2450	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,51	1,45E-03
Smlt0277	Response regulator transcription factor	1,51	4,48E-05
Smlt3896	Heme oxygenase	1,51	4,92E-02
SMLT_RS06020	Hypothetical protein	1,51	3,40E-02
Smlt0707	Molecular chaperone	1,51	3,88E-04
Smlt3589	Murein L,D-transpeptidase	1,51	4,09E-02
Smlt2834	Autotransporter outer membrane beta-barrel protein	1,52	2,91E-02
Smlt0620	CatB-related O-acetyltransferase	1,52	1,05E-02
Smlt1024	Hypothetical protein	1,52	4,99E-05
Smlt0708	Fimbrial biogenesis outer membrane usher protein	1,52	1,72E-04
Smlt1379	DUF1801 domain-containing protein	1,52	2,14E-03
Smlt0821	LPS-assembly protein LptD	1,52	5,36E-03
Smlt2561	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,52	1,41E-02

ANNEX

Smlt4532	Slipin family protein	1,52	2,52E-02
Smlt0249	Hypothetical protein	1,52	4,98E-03
Smlt3635	Homoserine O-succinyltransferase	1,53	5,78E-03
Smlt2992	Hypothetical protein	1,53	9,82E-04
Smlt0714	DUF4434 domain-containing protein	1,53	5,83E-03
Smlt3311	M23 family metallopeptidase	1,53	1,11E-03
Smlt0377	AI-2E family transporter	1,54	3,58E-02
Smlt1404	ABC transporter permease	1,54	9,59E-03
Smlt0709	Type 1 fimbrial protein	1,54	2,13E-04
Smlt1147	Sel1 repeat family protein	1,54	2,92E-02
Smlt4039	PAS domain-containing protein	1,54	1,35E-02
Smlt1578	FAD-binding oxidoreductase	1,54	2,43E-03
Smlt3218	Phospholipase A	1,54	9,72E-03
Smlt1700	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	1,54	2,20E-02
Smlt2817	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	1,54	2,21E-02
Smlt1759	Alpha/beta fold hydrolase	1,54	5,85E-04
Smlt0623	Glycosyl transferase	1,54	1,25E-02
Smlt2049	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase GalU	1,55	2,57E-02
Smlt2694	Heavy metal sensor histidine kinase	1,55	4,36E-02
Smlt0407	Potassium-transporting ATPase subunit KdpB	1,55	4,56E-02
Smlt4297	Bacterioferritin	1,55	4,27E-05
Smlt2167	Imidazole-4-carboxamide isomerase	1,56	2,08E-02
Smlt3008	Type IV secretory system conjugative DNA transfer family protein	1,56	2,39E-02
Smlt4255	DNA-binding transcriptional regulator	1,56	1,23E-02
Smlt4042	Decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase	1,56	4,24E-02
Smlt2577	Excinuclease ABC subunit UvrA	1,57	1,54E-02
Smlt2665	DUF4974 domain-containing protein	1,57	6,38E-03
Smlt4132	Alpha/beta hydrolase	1,57	1,53E-03
Smlt3418	Hypothetical protein	1,57	2,00E-02
Smlt2023	Glutathione S-transferase	1,57	1,31E-02
SMLT_RS22590	Hypothetical protein	1,57	1,98E-03
Smlt2449	Transcriptional regulator CopL	1,58	1,02E-04
Smlt2579	BLUF domain-containing protein	1,58	1,41E-02
Smlt2166	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	1,58	1,50E-02
Smlt0713	Hypothetical protein	1,58	2,03E-02
Smlt2801	Response regulator transcription factor	1,59	1,28E-09
SMLT_RS11705	DUF411 domain-containing protein	1,59	7,01E-03
Smlt1381	MATE family efflux transporter	1,59	4,87E-02
Smlt3639	AsmA family protein	1,60	1,49E-02
Smlt3766	Response regulator transcription factor	1,60	4,10E-02
Smlt3210	Glycine zipper 2TM domain-containing protein	1,60	2,80E-03
Smlt1160	Type 1 glutamine amidotransferase	1,61	2,52E-02
Smlt3231	Cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase	1,61	9,87E-03
Smlt0619	ABC transporter ATP-binding protein	1,61	2,35E-03
Smlt4348	Phosphoglycerol transferase I	1,61	2,26E-02
Smlt3232	DUF3298 and DUF4163 domain-containing protein	1,61	2,90E-04
Smlt4298	Bacterioferritin-associated ferredoxin	1,62	8,28E-04
Smlt4326	Sodium:calcium antiporter	1,62	6,82E-03

ANNEX

Smlt3289	Poly-beta-1,6 N-acetyl-D-glucosamine export porin PgaA	1,62	1,93E-03
Smlt2664	RNA polymerase sigma factor	1,62	1,00E-02
Smlt4256	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin	1,63	8,14E-03
Smlt4392	Sorbose dehydrogenase family protein	1,63	3,57E-02
Smlt0079	Hypothetical protein	1,64	2,56E-02
SMLT_RS17955	Hypothetical protein	1,64	2,74E-05
Smlt1146	Fe ²⁺ -dependent dioxygenase	1,64	1,57E-02
Smlt0622	Glycosyl hydrolase	1,64	6,62E-03
Smlt1142	Membrane protein	1,64	2,13E-02
Smlt1095	YitT family protein	1,64	1,88E-07
Smlt2858	TonB-dependent siderophore receptor	1,65	3,50E-02
Smlt3895	YbaN family protein	1,65	4,33E-02
SMLT_RS20090	Hypothetical protein	1,65	4,22E-03
Smlt2803	Diacylglycerol kinase	1,66	2,02E-02
Smlt1138	Oxidoreductase	1,66	4,20E-03
Smlt2991	Hypothetical protein	1,67	2,22E-05
Smlt3590	M23 family metalloproteinase	1,67	4,24E-02
Smlt3451	VOC family protein	1,67	4,22E-02
Smlt0527	Lytic transglycosylase domain-containing protein	1,67	8,75E-06
Smlt3309	Membrane protein insertion efficiency factor YidD	1,67	4,02E-02
Smlt3571	Phosphoethanolamine transferase	1,67	4,63E-03
Smlt1405	ABC transporter permease	1,68	4,59E-04
Smlt4588	DUF421 domain-containing protein	1,68	6,83E-08
Smlt3894	TonB-system energizer ExbB	1,68	7,13E-03
Smlt4350	DUF3772 domain-containing protein	1,69	2,49E-03
Smlt3023	Hypothetical protein	1,69	1,88E-02
Smlt2164	Histidinol-phosphate transaminase	1,69	1,22E-04
SMLT_RS12730	DUF411 domain-containing protein	1,69	1,45E-03
Smlt1406	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	1,69	3,93E-04
Smlt0837	Transaldolase	1,69	2,21E-03
Smlt4387	TonB-dependent receptor	1,69	6,81E-05
Smlt2621	Sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	1,69	4,93E-04
Smlt3899	DUF4880 domain-containing protein	1,69	1,42E-02
Smlt0838	Nucleoside diphosphate kinase regulator	1,70	5,96E-03
Smlt1156	Hypothetical protein	1,70	4,23E-04
Smlt1153	Cysteine desulfurase	1,70	1,00E-04
Smlt3889	Hypothetical protein	1,70	8,69E-04
Smlt1155	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	1,70	4,62E-04
Smlt2274	Flagellar biosynthesis protein FlhB	1,71	4,82E-02
SMLT_RS10320	Hypothetical protein	1,71	4,33E-02
Smlt1154	Fe-S cluster assembly protein SufD	1,72	2,17E-03
Smlt0711	Anchor protein	1,72	6,19E-03
Smlt0510	Hypothetical protein	1,72	4,03E-02
Smlt3417	Tryptophan synthase subunit alpha	1,72	5,60E-03
Smlt2523	Excinuclease ABC subunit UvrA	1,73	2,70E-03
Smlt3640	CBS domain-containing protein	1,73	3,12E-02
Smlt4266	Sensor domain-containing diguanylate cyclase	1,74	3,06E-03
Smlt0504	Hypothetical protein	1,74	1,11E-03

ANNEX

Smlt3479	Amino acid permease	1,74	6,59E-03
Smlt2358	Hypothetical protein	1,74	9,99E-03
Smlt1324	Hypothetical protein	1,74	5,37E-03
Smlt1762	TonB-dependent siderophore receptor	1,74	2,09E-02
Smlt2119	DUF2938 domain-containing protein	1,74	8,83E-04
Smlt1235	GNAT family N-acetyltransferase	1,74	3,60E-02
Smlt0114	Hypothetical protein	1,75	2,45E-02
Smlt0450	Hypothetical protein	1,75	4,56E-02
Smlt0113	Hypothetical protein	1,75	1,01E-02
Smlt1157	Fe-S cluster assembly protein SufB	1,75	3,60E-04
Smlt1407	TolC family protein	1,75	4,11E-04
Smlt3898	TonB-dependent receptor	1,76	6,31E-03
Smlt2679	Hypothetical protein	1,76	4,09E-02
Smlt3559	Aquaporin Z	1,76	1,03E-08
SMLT_RS02600	Hypothetical protein	1,76	6,68E-03
Smlt0712	Glycosyl transferase family protein	1,76	2,13E-04
Smlt3136	Membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase	1,76	1,44E-04
Smlt0278	Sensor histidine kinase	1,77	5,52E-10
Smlt3570	Phosphatase PAP2 family protein	1,77	1,73E-04
Smlt0598	Asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	1,77	5,42E-05
Smlt0220	DUF2059 domain-containing protein	1,77	3,23E-02
Smlt0123	Hypothetical protein	1,78	8,93E-03
Smlt3560	Hypothetical protein	1,78	2,72E-06
Smlt3893	TonB system transport protein ExbD	1,79	1,89E-02
Smlt2667	L1 family subclass B3 metallo-beta-lactamase	1,79	2,22E-03
SMLT_RS14125	PspC domain-containing protein	1,79	3,83E-02
Smlt2715	DUF4880 domain-containing protein	1,79	1,77E-02
Smlt3215	Glycine zipper 2TM domain-containing protein	1,81	1,00E-04
Smlt2756	Glycogen debranching protein GlgX	1,81	2,39E-02
Smlt1323	IS630-like element ISStma10 family transposase	1,81	6,60E-03
Smlt1121	DUF3108 domain-containing protein	1,82	1,61E-02
Smlt1135	L,D-transpeptidase	1,82	4,20E-02
Smlt4003	TonB-dependent receptor	1,82	1,35E-02
Smlt4409	Aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	1,82	9,46E-03
Smlt1380	DUF1801 domain-containing protein	1,83	7,56E-06
Smlt2800	Nuclear transport factor 2 family protein	1,84	4,46E-04
Smlt1158	SUF system Fe-S cluster assembly regulator	1,84	7,88E-05
Smlt2845	TonB-dependent receptor	1,84	5,41E-05
Smlt0467	EF-hand domain-containing protein	1,84	6,59E-03
Smlt3852	Helix-turn-helix domain-containing protein	1,84	7,31E-11
Smlt3226	ABC transporter ATP-binding protein	1,84	9,83E-03
Smlt2096	Chemotaxis protein CheW	1,84	1,41E-02
Smlt0391	Hypothetical protein	1,84	3,21E-05
Smlt1750	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	1,85	1,67E-02
Smlt0855	RNA polymerase sigma factor	1,85	4,02E-03
Smlt2818	Enterobactin synthase subunit F	1,85	6,93E-03
Smlt0618	ABC transporter permease	1,86	3,31E-04
Smlt2124	DUF1624 domain-containing protein	1,86	2,08E-08

ANNEX

Smlt2097	BLUF domain-containing protein	1,86	2,40E-02
Smlt2799	RcnB family protein	1,86	1,95E-04
Smlt2961	Hypothetical protein	1,87	1,23E-02
Smlt2859	Chloride channel protein	1,87	1,04E-05
Smlt1424	Hypothetical protein	1,88	3,70E-02
Smlt0185	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,88	1,35E-05
Smlt2706	Glycine betaine/L-proline transporter ProP	1,88	3,94E-02
Smlt0140	Histidine phosphatase family protein	1,88	3,75E-02
Smlt3623	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit	1,88	1,57E-02
Smlt1978	DUF159 family protein	1,88	8,35E-04
Smlt0868	Polyphosphate kinase 2	1,89	3,09E-02
Smlt3528	Acyl-CoA dehydrogenase	1,90	1,33E-02
Smlt2140	PAS domain-containing sensor histidine kinase	1,90	1,76E-02
Smlt3205	NAD(P)H-dependent oxidoreductase	1,91	3,48E-02
Smlt4123	Outer membrane beta-barrel protein	1,91	9,69E-04
Smlt3233	N-acetyltransferase	1,92	2,02E-02
Smlt2816	Hypothetical protein	1,92	2,36E-04
Smlt2123	TetR/AcrR family transcriptional regulator	1,93	1,49E-06
Smlt1587	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase	1,93	1,39E-02
Smlt0617	Cystathionine gamma-synthase	1,93	1,53E-04
Smlt3653	SDR family oxidoreductase	1,94	7,68E-04
Smlt2979	EcsC family protein	1,94	4,23E-04
Smlt3765	HAMP domain-containing histidine kinase	1,95	4,20E-03
Smlt1172	Dienelactone hydrolase family protein	1,95	2,03E-02
Smlt3737	Pyruvate oxidase	1,95	3,37E-02
Smlt2846	BCCT family transporter	1,95	4,48E-04
Smlt1007	Quaternary ammonium compound efflux SMR transporter SugE	1,96	4,41E-05
Smlt4158	DoxX family protein	1,96	2,04E-02
Smlt0882	Hybrid sensor histidine kinase/response regulator	1,97	2,34E-03
Smlt3209	GNAT family N-acetyltransferase	1,97	6,10E-08
Smlt3743	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	1,97	3,77E-02
Smlt1473	Polysaccharide lyase	1,97	1,07E-02
Smlt2353	Alpha/beta hydrolase	1,98	2,20E-02
Smlt2758	4-alpha-glucanotransferase	1,98	3,02E-02
Smlt3733	DUF3014 domain-containing protein	1,98	2,14E-08
Smlt4275	Hypothetical protein	1,98	3,34E-02
Smlt2151	Linear amide C-N hydrolase	1,98	1,99E-05
Smlt2757	Malto-oligosyltrehalose synthase	1,98	1,22E-02
Smlt2546	Hypothetical protein	1,99	4,55E-02
SMLT_RS12550	AprI/Inh family metalloprotease inhibitor	2,00	1,61E-02
Smlt0166	Hypothetical protein	2,01	5,41E-05
SMLT_RS22465	IS3 family transposase	2,01	5,60E-05
Smlt3580	VOC family protein	2,01	2,22E-02
Smlt0810	Hypothetical protein	2,01	2,22E-02
Smlt3968	Hypothetical protein	2,01	1,76E-02
Smlt2355	ABC transporter substrate-binding protein	2,02	4,09E-02
Smlt2378	Transcriptional regulator	2,02	1,11E-02
Smlt3880	Hypothetical protein	2,03	1,55E-02

ANNEX

Smlt1565	DUF3325 domain-containing protein	2,03	4,62E-02
Smlt3900	RNA polymerase sigma factor	2,03	1,35E-02
Smlt1144c	TonB-dependent receptor	2,04	5,37E-03
Smlt1145	Hypothetical protein	2,04	2,65E-03
Smlt1426	TonB-dependent siderophore receptor	2,05	2,23E-02
Smlt3009	Hypothetical protein	2,05	4,29E-02
Smlt0091	Glucan biosynthesis protein D	2,05	1,98E-03
Smlt2276	Bifunctional diguanylate cyclase/phosphodiesterase	2,05	5,41E-05
Smlt1384	DUF937 domain-containing protein	2,05	5,10E-03
Smlt4228	ABC transporter substrate-binding protein	2,06	1,49E-02
Smlt0075	Lacl family DNA-binding transcriptional regulator	2,06	1,16E-03
Smlt1826	OmpA family lipoprotein	2,07	3,06E-05
Smlt2356	Iron ABC transporter permease	2,07	3,98E-02
Smlt0181	L,D-transpeptidase	2,07	3,21E-03
Smlt3217	DUF456 domain-containing protein	2,07	6,21E-04
Smlt1825	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase	2,07	9,43E-03
Smlt2666	TonB-dependent receptor	2,08	3,00E-04
Smlt3719	DUF3011 domain-containing protein	2,09	6,74E-03
Smlt4135	TonB-dependent receptor	2,09	2,81E-02
Smlt3834	Membrane protein	2,09	1,73E-02
Smlt2977	Mechanosensitive ion channel	2,09	4,63E-03
Smlt3617	Hypothetical protein	2,10	3,06E-03
Smlt0939	Mechanosensitive ion channel family protein	2,11	9,44E-03
Smlt4392A	Hypothetical protein	2,12	4,11E-02
Smlt2761	Glycogen synthase GlgA	2,12	3,26E-02
Smlt3999	Ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE	2,13	2,45E-02
Smlt2385	Hypothetical protein	2,13	4,18E-03
Smlt1823	Inorganic diphosphatase	2,13	1,53E-03
Smlt3529	Ligase-associated DNA damage response exonuclease	2,14	2,62E-02
Smlt0227	MFS transporter	2,14	3,30E-04
Smlt0710	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)	2,15	1,08E-06
Smlt0274	DUF1311 domain-containing protein	2,15	9,53E-03
Smlt1462	EAL domain-containing protein	2,15	6,86E-05
Smlt1820	TonB-dependent receptor	2,15	7,66E-08
Smlt1446	TonB-dependent receptor	2,15	4,22E-06
Smlt4276	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	2,15	3,50E-02
Smlt0520	GTP-binding protein	2,16	1,93E-03
Smlt1122	DUF3108 domain-containing protein	2,16	9,31E-04
Smlt3022	TonB-dependent receptor	2,16	2,34E-02
Smlt2357	Heme ABC transporter ATP-binding protein	2,17	1,96E-02
Smlt0260	Nicotinate phosphoribosyltransferase	2,18	4,55E-16
Smlt0839	LysR family transcriptional regulator	2,19	4,81E-05
Smlt1203	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	2,19	1,89E-03
SMLT_RS07535	DUF3649 domain-containing protein	2,20	1,64E-02
Smlt2804	Phosphoethanolamine transferase EptA	2,21	3,59E-05
Smlt1571a	Aldehyde dehydrogenase	2,21	4,91E-03
Smlt1566	PepSY domain-containing protein	2,21	1,80E-02
Smlt2622	Hypothetical protein	2,21	2,84E-04

ANNEX

Smlt0801	Response regulator transcription factor	2,23	1,97E-02
Smlt0809	LemA family protein	2,23	1,33E-02
SMLT_RS14895	Hypothetical protein	2,23	6,01E-03
Smlt0840	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	2,24	2,51E-05
Smlt1233	TonB-dependent siderophore receptor	2,25	2,03E-02
Smlt2505	Aldehyde dehydrogenase iron-sulfur subunit	2,26	9,46E-03
Smlt4314	Lipid kinase YegS	2,28	7,06E-04
Smlt2937	TonB-dependent receptor	2,28	9,25E-03
Smlt0165	Porphyrin biosynthesis protein	2,28	3,66E-04
Smlt3742	Glycoside hydrolase family 15 protein	2,28	1,35E-02
Smlt3811	Flavin reductase family protein	2,29	1,05E-02
Smlt3527	Hypothetical protein	2,29	3,06E-03
Smlt0180	Hypothetical protein	2,30	3,26E-03
Smlt0273	Peptidoglycan-binding protein	2,30	1,79E-03
SMLT_RS22470	Hypothetical protein	2,31	4,67E-02
Smlt4652	Ergothioneine biosynthesis protein EgtB	2,32	1,69E-02
Smlt3908	Ion channel	2,33	3,06E-03
Smlt4651	L-histidine N(alpha)-methyltransferase	2,34	2,57E-02
Smlt2632	Cation diffusion facilitator family transporter	2,34	1,56E-02
Smlt0802	HAMP domain-containing histidine kinase	2,35	1,56E-03
Smlt3618	Dodecin domain-containing protein	2,36	3,92E-02
Smlt4032	Hypothetical protein	2,36	1,57E-02
Smlt2711	Response regulator	2,36	1,16E-02
Smlt4354	FAD-binding oxidoreductase	2,36	2,55E-02
Smlt3016	Hypothetical protein	2,36	2,12E-02
Smlt4347	AarF/ABC1/UbiB kinase family protein	2,37	1,54E-02
Smlt0571	DUF3247 family protein	2,37	1,56E-02
Smlt2939	Energy transducer TonB	2,37	1,35E-02
Smlt3019	PAS domain-containing hybrid sensor histidine kinase regulator	2,37	1,89E-03
Smlt1221	MFS transporter	2,39	1,92E-03
Smlt1429	Deoxyribonuclease V	2,40	2,65E-03
Smlt3910	BCCT family transporter	2,40	5,56E-03
Smlt2850	TonB-dependent receptor	2,41	8,42E-04
Smlt2938	ChaN family lipoprotein	2,42	5,37E-03
Smlt3265	Hypothetical protein	2,42	6,28E-03
Smlt2085	Membrane protein	2,43	9,69E-04
Smlt4525	Hypothetical protein	2,44	2,31E-03
Smlt2710	PAS domain-containing protein	2,45	6,96E-03
Smlt2819	Phosphopantetheine-binding protein	2,46	1,57E-02
SMLT_RS02725	Hypothetical protein	2,46	2,97E-03
Smlt4043	Hypothetical protein	2,47	2,08E-03
Smlt2383	Hypothetical protein	2,51	3,01E-02
Smlt2545	PIG-L family deacetylase	2,51	2,98E-02
Smlt3741	Trehalose-phosphatase	2,54	3,21E-03
Smlt1232	Malonate decarboxylase subunit alpha	2,54	5,37E-03
Smlt0051	Hypothetical protein	2,59	1,01E-02
Smlt4044	DUF2242 domain-containing protein	2,62	5,87E-03
Smlt4069	Low affinity iron permease family protein	2,66	6,29E-03

ANNEX

Smlt3853	Nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein	2,66	1,08E-20
SMLT_RS22420	DUF1328 domain-containing protein	2,68	3,53E-02
Smlt4327	Hypothetical protein	2,69	8,42E-04
Smlt4133	Glucans biosynthesis glucosyltransferase MdoH	2,69	5,71E-05
Smlt4124	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	2,70	2,09E-13
Smlt3094	Energy transducer TonB	2,70	2,45E-04
Smlt2936	DUF4880 domain-containing protein	2,71	5,10E-03
Smlt1403	Glycine zipper 2TM domain-containing protein	2,73	2,06E-03
Smlt2633	DNA-3-methyladenine glycosylase	2,80	9,31E-04
Smlt3018	Hypothetical protein	2,82	1,50E-02
Smlt4353	Lipocalin family protein	2,84	7,13E-03
Smlt2849	DUF4880 domain-containing protein	2,84	3,57E-02
Smlt2377	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	2,90	5,88E-04
Smlt1659	Hypothetical protein	2,91	2,84E-02
Smlt2538	Ferritin-like domain-containing protein	2,93	1,49E-02
Smlt1477	Hypothetical protein	2,94	4,85E-03
Smlt2823	MFS transporter	2,96	2,36E-02
Smlt2537	Manganese catalase family protein	2,97	3,15E-03
Smlt2848	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	2,97	3,39E-02
SMLT_RS12130	Hypothetical protein	2,99	2,02E-02
Smlt2820	Isochorismatase family protein	3,00	3,79E-02
Smlt2535	BLUF domain-containing protein	3,04	1,42E-02
Smlt2935	RNA polymerase sigma factor	3,09	2,60E-02
Smlt2821	AMP-binding protein	3,11	2,66E-02
Smlt2712	DUF560 domain-containing protein	3,15	2,35E-03
Smlt1242	DUF1624 domain-containing protein	3,15	1,04E-05
Smlt2540	Response regulator	3,20	6,75E-04
Smlt2714	TonB-dependent receptor	3,27	1,29E-02
Smlt3695	Response regulator	3,31	1,67E-02
SMLT_RS14375	Hypothetical protein	3,33	2,82E-03
Smlt1294	EexN family lipoprotein	3,36	6,35E-03
Smlt0343	CsbD family protein	3,36	2,81E-02
Smlt0342	Entericidin A/B family lipoprotein	3,91	1,98E-03
Smlt1447	MerC domain-containing protein	4,26	2,22E-05
Smlt2713	Hypothetical protein	6,30	2,19E-03

Taula Annex J. Anàlisi d'enriquiment de termes GO (categoria Processos Biològics) en la comparativa ΔsmoR vs WT.

Terme GO (BP)	ID GO	Input*	Background**	p-valor
Total ΔsmoR vs WT				
Cellular glucan metabolic process	0006073	6	7	3.5e-06
Siderophore transmembrane transport	0044718	7	10	4.5e-06
Iron ion transport	0006826	10	22	7.9e-06

ANNEX

DNA-templated transcription, initiation	0006352	8	23	0.0006
Transmembrane transport	0055085	43	326	0.0052
Sobreexpressats ΔsmoR				
Cellular glucan metabolic process	0006073	6	7	3.5e-06
Siderophore transmembrane transport	0044718	7	10	4.5e-06
Iron ion transport	0006826	10	22	7.9e-06
DNA-templated transcription, initiation	0006352	8	23	0.0006
Transmembrane transport	0055085	43	326	0.0052
Infraexpressats ΔsmoR				
Glutamate metabolic process	0006536	3	8	0.0006
Cellular catabolic process	0044248	7	73	0.0013
Organonitrogen compound catabolic proces...	1901565	5	46	0.0039
Carboxylic acid catabolic process	0046395	4	34	0.0075
Antibiotic metabolic process	0016999	3	20	0.0106

* Indica els DEGs en el conjunt de dades associats al terme GO corresponent

** Indica els gens de tot el genoma associats al terme GO corresponent

Taula Annex K. Anàlisi d'enriquiment de termes KEGG en la comparativa Δ smoR vs WT.

Terme KEGG	ID KEGG	Input*	Background**	p-valor
Total ΔsmoR vs WT				
Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	sml01053	4	5	0,0058
Starch and sucrose metabolism	sml00500	7	22	0,013
Two-component system	sml02020	23	135	0,0149
Nitrogen metabolism	sml00910	4	12	0,0507
Pentose phosphate pathway	sml00030	5	21	0,0809
Sobreexpressats ΔsmoR				
Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	sml01053	4	5	0,0019
Starch and sucrose metabolism	sml00500	7	22	0,0026
Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance	sml01503	4	19	0,0661
Glycerolipid metabolism	sml00561	2	7	0,1204
Histidine metabolism	sml00340	3	16	0,1339
Infraexpressats ΔsmoR				
Nitrogen metabolism	sml00910	4	12	0,0007

ANNEX

Two-component system	sml02020	10	135	0,0046
Bacterial chemotaxis	sml02030	3	25	0,0365
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	sml00250	3	26	0,0399
Carbon metabolism	sml01200	6	92	0,0441

* Indica els DEGs en el conjunt de dades associats al terme KEGG corresponent

** Indica els gens de tot el genoma associats al terme KEGG corresponent

Taula Annex L. Overlap AHL, DSF i SmoR

Locus	Anotació	Fold-Change (FC)		
		AHL	Δ SmoR	DSF
Smlt2053	TetR/AcrR family transcriptional regulator	7,33	-5,13	6,52
Smlt0077	Phenylalanine 4-monooxygenase	7,17	-3,09	7,77
Smlt2944	Hypothetical protein	4,29	-2,14	4,88
Smlt1690	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	3,93	-4,84	4,73
Smlt1687	4Fe-4S binding protein	3,84	-3,28	2,89
Smlt1758	Cytochrome c	3,51	-6,10	2,65
Smlt1757	C-type cytochrome	3,08	-2,48	3,24
Smlt1574	Bacteriohemerythrin	2,84	-8,44	4,12
Smlt2775	NarK family nitrate/nitrite MFS transporter	2,81	-6,36	3,79
Smlt0855	RNA polymerase sigma factor	2,77	1,85	ns
Smlt0264	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	2,72	-1,54	3,54
Smlt3527	Hypothetical protein	2,69	2,29	ns
Smlt3647	Alpha/beta hydrolase	2,68	-2,92	3,05
Smlt0281	Hypothetical protein	2,54	-2,09	ns
Smlt3805	OmpW family protein	2,21	-4,21	2,79
Smlt1688	Hypothetical protein	2,03	-5,48	2,35
Smlt0109	Glutamate synthase large subunit	2,01	-1,82	1,94
Smlt2181	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	1,97	-1,62	ns
Smlt1429	Deoxyribonuclease V	1,96	2,40	ns
Smlt3790	DUF2946 domain-containing protein	1,91	-1,52	ns
Smlt3719	DUF3011 domain-containing protein	1,90	2,09	ns
Smlt0140	Histidine phosphatase family protein	1,83	1,88	ns
Smlt4492	Dihydroxy-acid dehydratase	1,81	-1,80	1,75
Smlt0227	MFS transporter	1,78	2,14	ns
Smlt0165	Porphyrin biosynthesis protein	1,77	2,28	ns

ANNEX

Smlt4228	ABC transporter substrate-binding protein	1,74	2,06	ns
Smlt0185	Helix-turn-helix transcriptional regulator	1,73	1,88	ns
Smlt2167	Imidazole-4-carboxamide isomerase	1,72	1,56	ns
Smlt3282	Cytochrome bd oxidase subunit I	1,70	-3,10	2,30
Smlt3617	Hypothetical protein	1,67	2,10	ns
Smlt0268	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1,64	-2,22	ns
Smlt0108	FAD-dependent oxidoreductase	1,61	-2,32	ns
Smlt0615	YdcH family protein	1,61	-1,69	3,06
Smlt0166	Hypothetical protein	1,58	2,01	ns
Smlt0113	Hypothetical protein	1,57	1,75	ns
Smlt0391	Hypothetical protein	1,53	1,84	ns
Smlt3279	Thiol reductant ABC exporter subunit CydC	1,52	-1,63	ns
Smlt4326	Sodium:calcium antiporter	1,52	1,62	ns
Smlt3023	Hypothetical protein	-1,51	1,69	ns
SMLT_RS22590	Pseudo	-1,51	1,57	ns
Smlt1762	TonB-dependent siderophore receptor	-1,52	1,74	ns
Smlt4256	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin	-1,52	1,63	ns
SMLT_RS22465	IS3 family transposase	-1,52	2,01	ns
Smlt1849A	Hypothetical protein	-1,54	-1,58	ns
Smlt3910	BCCT family transporter	-1,54	2,40	ns
SMLT_RS06020	Pseudo	-1,54	1,51	ns
Smlt1047	Tail fiber domain-containing protein	-1,54	-3,15	ns
Smlt1044	Phage major tail tube protein	-1,56	-3,00	ns
Smlt1067	TonB-dependent receptor	-1,56	-1,58	ns
Smlt2706	Glycine betaine/L-proline transporter ProP	-1,56	1,88	ns
Smlt0151	Type I glutamate--ammonia ligase	-1,57	-1,60	ns
Smlt2800	Nuclear transport factor 2 family protein	-1,58	1,84	ns
Smlt1741	Recombinase RecA	-1,58	-1,50	ns
Smlt0710	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)	-1,58	2,15	ns
Smlt0249	Hypothetical protein	-1,61	1,52	ns
Smlt0619	ABC transporter ATP-binding protein	-1,62	1,61	ns
Smlt4610	Membrane protein	-1,63	1,50	ns
Smlt1323	IS630-like element ISStma10 family transposase	-1,65	1,81	ns
Smlt2950	GNAT family N-acetyltransferase	-1,67	-2,14	ns
Smlt0618	ABC transporter permease	-1,67	1,86	ns
Smlt1065	Hypothetical protein	-1,68	-2,46	ns
Smlt0504	Hypothetical protein	-1,69	1,74	ns
Smlt4069	Low affinity iron permease family protein	-1,70	2,66	ns

ANNEX

SMLT_RS11705	DUF411 domain-containing protein	-1,72	1,59	ns
Smlt1024	Hypothetical protein	-1,72	1,52	ns
Smlt3570	Phosphatase PAP2 family protein	-1,73	1,77	ns
Smlt0152	P-II family nitrogen regulator	-1,74	-1,84	ns
Smlt2450	Helix-turn-helix transcriptional regulator	-1,74	1,51	ns
Smlt2961	Hypothetical protein	-1,74	1,87	ns
Smlt0622	Glycosyl hydrolase	-1,74	1,64	ns
Smlt2711	Response regulator	-1,75	2,36	ns
Smlt3900	RNA polymerase sigma factor	-1,75	2,03	ns
Smlt0709	Type 1 fimbrial protein	-1,77	1,54	ns
Smlt3022	TonB-dependent receptor	-1,80	2,16	ns
SMLT_RS12550	AprI/Inh family metalloprotease inhibitor	-1,81	2,00	ns
SMLT_RS00075	Hypothetical protein	-1,82	-1,79	ns
Smlt0019	PA0069 family radical SAM protein	-1,84	-1,59	ns
Smlt4123	Outer membrane beta-barrel protein	-1,85	1,91	ns
Smlt1064	Hypothetical protein	-1,88	-2,16	ns
Smlt1324	Hypothetical protein	-1,96	1,74	ns
Smlt0623	Glycosyl transferase	-1,97	1,54	ns
Smlt0018	Hypothetical protein	-1,98	-1,63	ns
Smlt4298	Bacterioferritin-associated ferredoxin	-2,01	1,62	ns
Smlt2803	Diacylglycerol kinase	-2,03	1,66	ns
Smlt3898	TonB-dependent receptor	-2,12	1,76	ns
Smlt2816	Hypothetical protein	-3,10	1,92	ns

ANNEX

Taula Annex M. Llistat d'àcids grassos detectats en cada soca i en cada punt del creixement.

Mostra	Àcid gras																			
	C11:0	C12:0	C13:0	3OH C11:0	C14:0	3OH C12:0	C15:1°	C15:0	C15:0	C15:0	3OH C13:0	C16:1	C16:0	Δ17:0	C17:0	C17:0	C17:0	C18:1	C18:0	C19:0
Temps de retenció (min)	5,506	7,471	8,578	8,84	11,067	11,386	11,82	12,295	12,546		12,447	14,436	17,218	15,656	16,115			18,153	18,619	19,735
								iso	ante iso	n					iso	ante	n			
Blanc		x			x								x		x			x	x	
wt DO ₆₀₀ =0,8	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
wt DO ₆₀₀ =1,5	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
wt DO ₆₀₀ =5	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
ΔmlaF-B DO ₆₀₀ =0,8	x	x	x		x		x	x	x	x		x		x	x ia			x	x	x
ΔmlaF-B DO ₆₀₀ =1,5	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
ΔmlaF-B DO ₆₀₀ =5	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
ΔmlaF-B / mlaF-B DO ₆₀₀ =0,8	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x ia			x	x	x
ΔmlaF-B / mlaF-B DO ₆₀₀ =1,5	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ΔmlaF-B / mlaF-B DO ₆₀₀ =5	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

°= probable nC15:0

x ia = no és possible diferenciar entre iso, ante iso o n C17:0

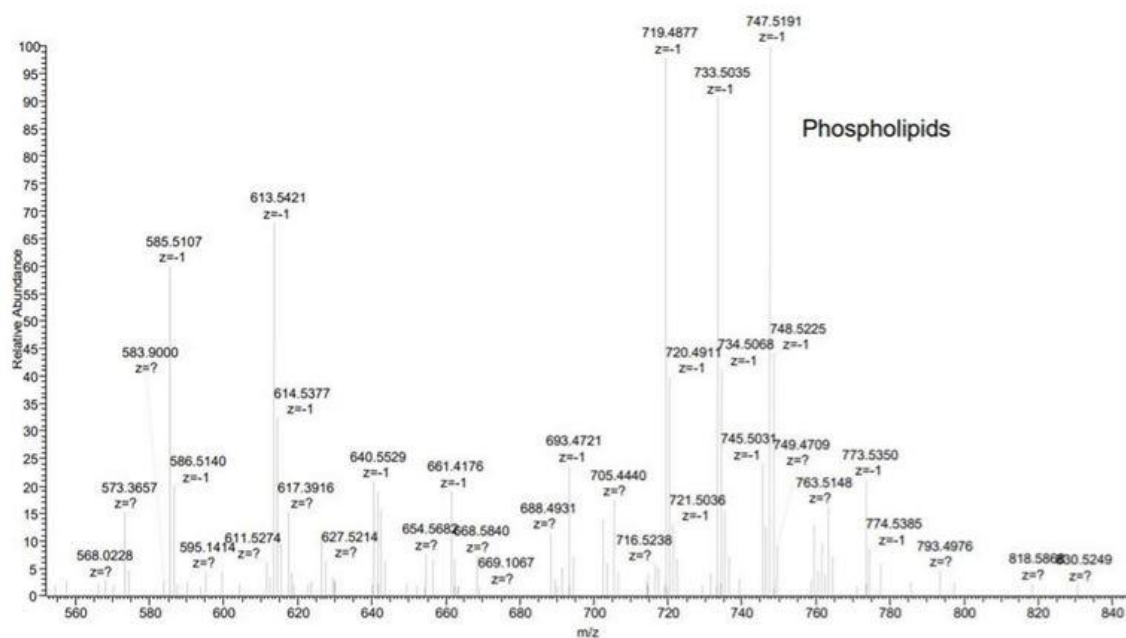
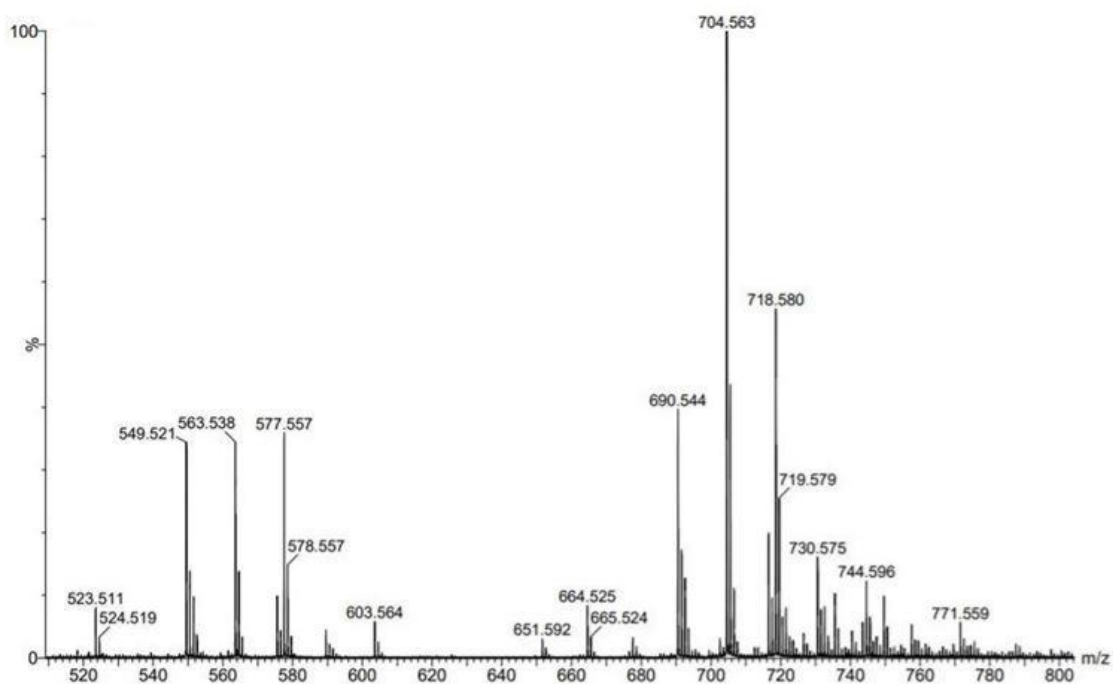
A**B**

Figura Annex 1. Anàlisi per MS en condicions desnaturalitzants dels PLs purificats amb la proteïna MlaC. (A) Mode negatiu LTQ-FT ($[M-H]^-$). (B) Mode positiu LTQ-Premier ($[M+H]^+$).