



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Caracterización del sistema de percepción de quórum en *Rhodobacter sphaeroides* y su conexión con el sistema CckA/ChpT/CtrA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

José de Jesús Hernández Valle

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

Dr. Rodolfo García Contreras  
[Facultad de Medicina, UNAM.](#)

Dr. Fidel Alejandro Sanchez Flores  
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

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

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

**Caracterización del sistema de percepción de quórum en *Rhodobacter sphaeroides* y su conexión con el sistema CckA/ChpT/CtrA.**

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

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

Atentamente

**José de Jesús Hernández Valle**  
412011696

## Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Rosa Laura Camarena.

El proyecto fue parcialmente financiado en diferentes momentos por los donativos IN215023 e IG200420 otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (PAPIIT-DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su desarrollo el presente trabajo contó con el apoyo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO) de la UNAM y de la Unidad de Microscopia del IIBO.

Agradezco el apoyo técnico y las enseñanzas de las QFB Aurora Osorio, Teresa Ballado y Abigail González, así como la valiosa mentoría del Dr. Sebastián Poggio y de la Dra. Gloria Soberón, quien además me facilitó el sistema reportero de *E. coli* utilizado en este trabajo. También agradezco a mi comité tutor, conformado por el Dr. Alejandro Sánchez y el Dr. Rodolfo García Contreras, así como a la Lic. Lucía Brito por el apoyo bibliográfico.

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Durante la realización de mi doctorado, fui financiado por una beca del CONAHCYT (749450). Agradezco el apoyo económico brindado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para mi asistencia y participación en el congreso 'Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting', celebrado del 7 al 11 de agosto de 2023 en la Universidad de Wisconsin-Madison, en Madison, Wisconsin, EE. UU.

## **Agradecimientos Personales**

Nada de esto habría sido posible sin el respaldo y apoyo de grandes personas que he encontrado en mi camino, así como de las enseñanzas que me han brindado, en lo académico y personal.

A mi mentora, la Dra. Laura Camarena, por abrirme las puertas de su laboratorio para iniciar y desarrollar mi carrera profesional. Por todas las lecciones aprendidas, la paciencia, confianza y apoyo brindados durante todos estos años. Siempre le estaré muy agradecido.

Al Dr. Georges Dreyfus, que aunque nunca fue mi tutor oficial, siempre fungió como tal, apoyándome más de lo que era necesario. Gracias por esos valiosos consejos y por creer en mí.

A Tere, Laura y Mariana, quienes son grandes maestras y amigas e hicieron de mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular una experiencia inolvidable.

A Auro y al Dr. Sebastián, por su mentoría y consejos.

A mis compañeros del laboratorio, por brindarme su amistad y compartir sus conocimientos, su tiempo y tan buenos momentos: Jimena, Clelia, Benja, Mariana, Betsy, Dana, Ana Pau, Andrea, Lalo, Luis David y a todos los integrantes del Rhodolab y Caulolab.

A mis papás, Irma y Chuy, por su amor, soporte, ánimos y por haberme apoyado más de lo que señala el deber, sin ustedes no lo habría logrado. Este logro es nuestro.

A Camila, mi compañera. Gracias por tu amor y por caminar conmigo en esta aventura.

Gracias Alice, por tu linda presencia.

Gracias José del pasado, por no rendirte.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
El sistema de percepción de quórum (SPQ)	11
Los SPQ están presentes en bacterias gram positivas y gram negativas	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Aliivibrio fischeri</i>	14
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
<i>Erwinia carotovora</i>	22
El SPQ regula al TCS CckA/ChpT/CtrA.	22
El SPQ en <i>Cereibacter sphaeroides</i>	27
El nado mediado por el flagelo Fla2 es controlado por CtrA en <i>C. sphaeroides</i>	29
El regulón CtrA en <i>C. sphaeroides</i>	31
<b>Objetivo general</b>	<b>34</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>34</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>35</b>
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	35
Cepas mutantes y plásmidos contruidos para este trabajo	36
Ensayos de motilidad	39
Sobreexpresión y purificación de proteínas	39
Anticuerpos e inmunodetección (Western blot)	41
Experimento de Pull-Down	41
Concentración de AHL a partir de sobrenadantes de cultivos celulares	42
Ensayo de detección de AHL	42
RT-PCR	43
Determinación in vivo de la capacidad de unión de CerM al ADN	43
Ensayos de $\beta$ -glucuronidasa	44
Ensayos de $\beta$ -galactosidasa	44
Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)	44
RNA-seq	45
Análisis in silico	46
Búsqueda in silico del sitio de unión de CerM	47
<b>Resultados</b>	<b>50</b>
Identificación in silico de nuevos componentes del SPQ de <i>C. sphaeroides</i> y sus relaciones filogenéticas	50
Los componentes del SPQ están involucrados en el control del TCS CckA/ChpT/CtrA	54
Producción de autoinductor y detección de CerM en cepas mutantes del SPQ	59
CerN interactúa con CerM en presencia de autoinductor	60
La proteína CerM no se une a la región de control de <i>cckA</i> , <i>chpT</i> o <i>ctrA</i>	61
Perfil transcriptómico de la cepa $\Delta cerN$	62
Identificación del sitio de unión de CerM	64

Mapeo del sitio de unión de CerM	66
CerN, en presencia de AHL, interfiere con la capacidad de CerM para unirse al ADN	68
Papel de RSWS8N_14710 en el control de la expresión de <i>ctrA</i>	71
<b>Discusión</b>	<b>73</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>Anexo</b>	<b>82</b>
Figuras suplementarias	82
Procedimientos para obtener los plásmidos utilizados en este trabajo	89
Tabla S1. Oligonucleótidos usados en este trabajo	95
Tabla S2. Regulón CerN-CerM	98
Tabla S3. Reguladores transcripcionales que forman parte del regulón de CerN	104
Tabla S4. Regiones regulatorias con sitios de unión similares a GtaR	105
<b>Referencias</b>	<b>107</b>



## Resumen

El sistema de percepción de quórum (SPQ) permite a las bacterias regular la expresión génica en función de la densidad celular. En la  $\gamma$ -proteobacteria *Allivibrio fischeri*, la sintasa LuxI cataliza la producción de una acil-homoserina lactona (AHL), que se libera continuamente al espacio extracelular. A medida que aumenta la densidad celular, la concentración de AHL incrementa y, al alcanzar un umbral específico, se une al regulador transcripcional LuxR, activando la expresión de genes que modulan comportamientos colectivos como la bioluminiscencia y la motilidad. En las  $\alpha$ -proteobacterias, la motilidad mediada por flagelo es principalmente controlada por CtrA, un regulador transcripcional, parte del sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA. Dentro de este grupo, las Rhodobacterales presentan SPQ que incluyen homólogos de LuxRI y en algunos casos se ha visto la conexión de este sistema con CtrA. Por ejemplo, en *Ruegeria sp. KLH11*, *Dinoroseobacter shibae* y *Rhodobacter capsulatus*, los SPQ regulan a CtrA, aunque parece que lo hacen de forma indirecta.

En la Rhodobacterial *Cereibacter sphaeroides*, CtrA regula la expresión de 321 genes, controlando procesos como la motilidad flagelar. Además, se reportó que presenta un SPQ compuesto por CerI y CerR, homólogos de LuxI y LuxR, respectivamente, lo que sugiere que el SPQ también podría modular la actividad del sistema CckA/ChpT/CtrA en esta bacteria.

En este estudio, identificamos que el SPQ de *C. sphaeroides* está conformado por seis homólogos de LuxR, incluyendo los nuevos reguladores CerM y CerN, y un homólogo de LuxI, que controlan la expresión de CtrA. En ausencia de AHL, CerM

se asocia al ADN y reprime la expresión de CtrA; en presencia de AHL, CerN interactúa con CerM, neutralizando su actividad. Finalmente, observamos que CerM regula indirectamente la expresión de CtrA, de manera similar a lo reportado en otras Rhodobacterales como *Ruegeria* sp. KLH11. El regulador transcripcional codificado por el ORF RSWS8N\_14710, controlado directamente por CerM, podría ser el vínculo entre estos dos sistemas.

## Summary

The quorum sensing (QS) system enables bacteria to regulate gene expression based on cell density. In the  $\gamma$ -proteobacterium *Aliivibrio fischeri*, the synthase LuxI catalyzes the production of an acyl-homoserine lactone (AHL), which is released into the extracellular environment. As cell density increases, AHL concentration rises, and upon reaching a specific threshold, AHL binds to the transcriptional regulator LuxR, activating the expression of genes that control collective behaviors like bioluminescence and motility.

In  $\alpha$ -proteobacteria, flagella-mediated motility is primarily controlled by CtrA, a transcriptional regulator that is part of the two-component system CckA/ChpT/CtrA. Within this group, members of the Rhodobacterales order possess QS systems that include LuxRI homologs, with evidence showing a connection between QS and CtrA. For instance, in *Ruegeria sp. KLH11*, *Dinoroseobacter shibae*, and *Rhodobacter capsulatus*, the QS systems regulate CtrA, seemingly through an indirect mechanism.

In the Rhodobacterial *Cereibacter sphaeroides*, CtrA controls the expression of 321 genes, including those involved in flagellar motility. It was reported that this bacterium possesses a QS system composed of CerI and CerR, which are LuxI and LuxR homologs, respectively, suggesting that the QS system could also modulate the activity of the CckA/ChpT/CtrA system.

In this study, we identified that the QS system of *C. sphaeroides* consists of six LuxR homologs and one LuxI homolog, including the novel regulators CerM and CerN,

which control CtrA expression. In the absence of AHL, CerM binds to DNA and represses CtrA expression, but in the presence of AHL, CerN interacts with CerM, neutralizing its activity. Finally, we observed that CerM indirectly regulates CtrA expression, similar to what has been reported in other Rhodobacterales such as *Ruegeria* sp. KLH11. The transcriptional regulator encoded by ORF RSWS8N\_14710, which is directly controlled by CerM, may act as a link between these two regulatory systems.

## Introducción

### El sistema de percepción de quórum (SPQ)

El SPQ es un sistema de comunicación celular que permite a las bacterias modular la expresión génica en función de la densidad celular, coordinando de esta forma comportamientos colectivos como la motilidad, la formación de biopelículas, la transferencia horizontal de genes y la expresión de factores de virulencia.<sup>1</sup>

En este sistema existe una molécula señal denominada autoinductor, que se produce y libera continuamente al espacio extracelular. Típicamente, cuando la población bacteriana es baja, la concentración de autoinductor en el medio es insuficiente para desencadenar una respuesta. Sin embargo, a medida que la población bacteriana crece, hay un aumento correspondiente en la concentración de esta señal. Una vez que se alcanza un umbral crítico de concentración, los autoinductores interactúan con receptores específicos en las células bacterianas, activando vías de señalización intracelular que regulan la expresión de genes asociados con funciones colectivas.<sup>1,2</sup>

Este sistema permite a las bacterias comportarse como una comunidad organizada, facilitando su adaptación a las condiciones ambientales presentes y las interacciones con sus simbioses.<sup>1,2</sup>

El fenómeno de autoinducción fue reportado por primera vez en la bacteria bioluminiscente *Aliivibrio fischeri*, simbiote del pequeño calamar hawaiano *Euprymna scolopes*. Al observarse que el fenómeno de luminiscencia ocurría sin

ninguna intervención externa bajo condiciones controladas de laboratorio, se pensó que este debía ser causado por un "condicionamiento" del medio de cultivo generado por las propias células bacterianas. Por esta razón, el proceso fue denominado autoinducción.<sup>3,4</sup> Posteriormente se identificó que dicho medio condicionado contenía una molécula activadora capaz de inducir la luminiscencia,<sup>5</sup> la cual fue llamada autoinductor <sup>6</sup> y caracterizada como una acil homoserina lactona.<sup>7</sup> Posterior a esta serie de descubrimientos, múltiples SPQ han sido descritos en otras bacterias.

### **Los SPQ están presentes en bacterias gram positivas y gram negativas**

Los SPQ están distribuidos tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas; sin embargo, en ambos grupos, la naturaleza de las moléculas señal, así como sus mecanismos de síntesis y detección varían.

En bacterias gram positivas, se ha observado que la molécula señal de sus SPQ son predominantemente pequeños oligopéptidos cíclicos (Figura 1A), los cuales pueden ser detectados por cinasas transmembranales, que forman parte de sistemas de dos componentes, o también pueden ser internalizadas por sistemas transportadores, interactuando con reguladores transcripcionales y modulando en ambos casos la expresión de genes.<sup>8</sup>

En el caso de los SPQ de bacterias gram negativas, existen diversas moléculas señal, siendo las predominantes las acil-homoserina lactonas (AHL) <sup>1</sup> (Figura 1B), sintetizadas por enzimas sintetas de autoinductor que toman como sustratos a

S-adenosil metionina y a acarreadores de grupos acilo como acil-ACP.<sup>9</sup> Estos pueden ser detectados de forma directa por reguladores transcripcionales o por cinasas de histidina transmembranales, parte de sistemas de dos componentes, llevando a la regulación transcripcional de genes.<sup>1</sup>

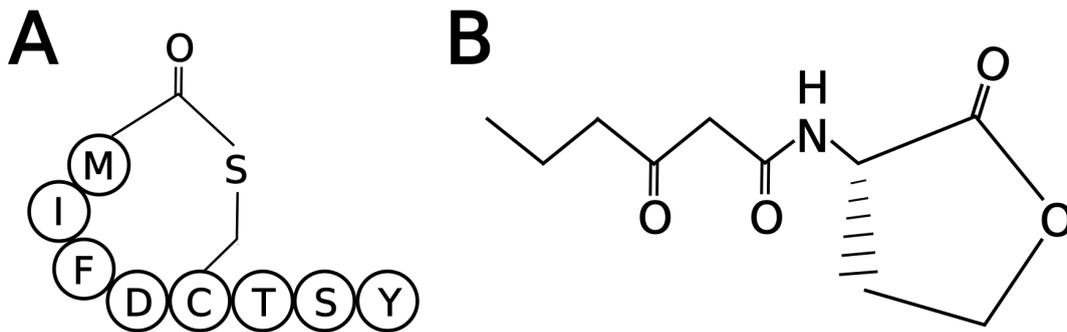


Figura 1. **Estructuras de los autoinductores representativos encontrados en bacterias Gram positivas y Gram negativas.** (A) Péptido autoinductor de *Staphylococcus aureus*, que contiene un anillo de tiolactona formado entre el grupo tiol de una cisteína y el grupo carboxilo del péptido. Este autoinductor es esencial para la regulación de factores de virulencia a través del sistema de dos componentes AgrC-AgrA. (B) Molécula de N-acil homoserina lactona (AHL) 3-oxo-hexanoil homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), producida por *Aliivibrio fischeri* para regular la bioluminiscencia mediante el sistema LuxI-LuxR.

Un sistema de dos componentes (TCS) es un mecanismo de transducción de señales, que le permite a las bacterias detectar y responder a cambios ambientales e intracelulares. Estos sistemas están formados por dos proteínas clave: una cinasa de histidina, que percibe un estímulo externo o interno, y un regulador de respuesta, que desencadena la respuesta celular. El proceso comienza con la autofosforilación de la cinasa de histidina en un residuo de histidina conservado, seguida de la transferencia del grupo fosforilo a un residuo de aspartato en el regulador de respuesta. Esta fosforilación activa al regulador, que a menudo actúa como un factor

transcripcional, modulando la expresión de genes. Existen cinasas de histidina híbridas, que transfieren el grupo fosforilo a su propio dominio receptor; por lo que para fosforilar a su regulador de respuesta, estas cinasas requieren de una proteína fosfotransferasa.<sup>10,11</sup>

A continuación, se describen los SPQ de algunas bacterias en las cuales el sistema ha sido caracterizado y que contextualizan los resultados obtenidos en este trabajo.

### ***Staphylococcus aureus***

En la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus*, la molécula señal de su SPQ consiste en un pequeño péptido de 7 a 9 aminoácidos que contiene un característico anillo de tiolactona entre una cisteína central y el grupo carboxilo del péptido. Este péptido es sintetizado a partir del gen *agrD*, que codifica un péptido precursor que es procesado y exportado por la endopeptidasa transmembranal AgrB. Una vez en el espacio extracelular, el péptido autoinductor es detectado por la cinasa de histidina AgrC, la cual en este estado fosforila a su regulador de respuesta AgrA; ambos corresponden a un sistema de dos componentes. Una vez fosforilado, AgrA activa la transcripción de las toxinas peptídicas PSM $\alpha$  y PSM $\beta$ , así como del RNAlII, el cual a su vez modula la traducción de adhesinas, toxinas, proteasas, lipasas y coagulasas.<sup>12</sup>

### ***Aliivibrio fischeri***

En *Aliivibrio fischeri* se identificó que la sintasa de autoinductor LuxI cataliza la producción del autoinductor 3-oxo-hexanoil homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL).<sup>7,13</sup>

Una vez que el AHL alcanza una concentración en el rango nanomolar (a partir de 100 nM),<sup>14</sup> interacciona con el regulador transcripcional LuxR, que en este estado se une a la caja lux (ACCTGTAGGATCGTACAGGT) para regular la expresión del operón *lux/CDABEG*, en el que están contenidos la propia sintasa de autoinductor *luxI*, así como los genes de bioluminiscencia (Figura 2).

Hoy en día, sabemos que el SPQ en *Aliivibrio fischeri* es más complejo. De hecho, puede entenderse como una red regulatoria conformada por tres sistemas de percepción de quórum. Además del sistema LuxI-LuxR, están los sistemas AinS-AinR y LuxS-LuxP/Q<sup>15</sup> (Figura 2).

El sistema LuxS-LuxP/Q utiliza como molécula señalizadora al autoinductor-2 (AI-2) en lugar de acil-homoserina lactonas. El AI-2 es sintetizado por la enzima LuxS y es detectado por el complejo LuxP/LuxQ. LuxP es un receptor periplásmico que se une al AI-2, mientras que LuxQ es una cinasa de histidina híbrida. Tras la unión del complejo LuxP-AI-2 a LuxQ, su actividad cinasa se inhibe y su actividad fosfatasa se activa. Por lo que en ausencia de AI-2, LuxQ se autofosforila en su dominio receptor y transfiere el grupo fosforilo a su regulador de respuesta LuxO, a través de la fosfotransferasa LuxU.<sup>10,16,17</sup>

Se considera que el AI-2 es una molécula señal intra e inter especie, ya que puede ser producida y sensada por diversas bacterias gram positivas y gram negativas.<sup>18</sup>

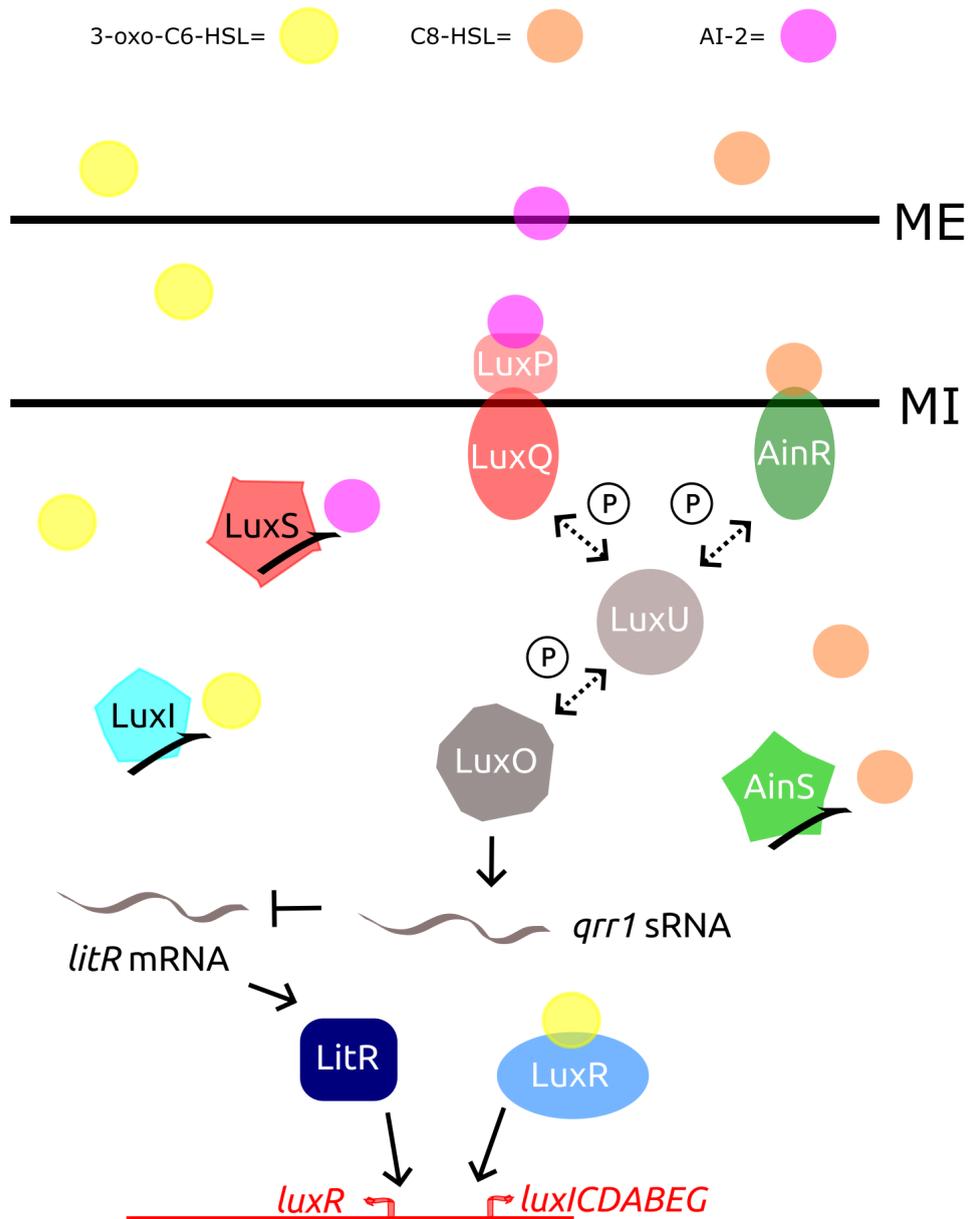


Figura 2. Esquema de los tres sistemas de percepción de quórum de *Aliivibrio fischeri*. La imagen muestra la interacción de los sistemas LuxI/LuxR, AinS/AinR y LuxS/LuxP/Q para la regulación de la bioluminiscencia. En el sistema LuxI/LuxR, la acil-homoserina lactona 3-oxo-C6-HSL (amarillo) es sintetizada por LuxI y detectada por LuxR, lo que activa la transcripción del operón *lux/CDABEG*. En el sistema AinS/AinR, la C8-HSL (naranja) es sintetizada por AinS y detectada por AinR, parte de un sistema de dos componentes. El sistema LuxS/LuxP/Q utiliza AI-2 (violeta), sintetizado por LuxS y detectado por LuxP/LuxQ. A bajas densidades celulares LuxQ y AinR pueden fosforilar a LuxU, que a su vez fosforila a LuxO, activando la transcripción del pequeño ARN no codificante *qrr1*, el cual degrada el mRNA de *litR*. A altas densidades celulares (a altas

concentraciones de autoinductores) *litR* se estabiliza. Entonces LitR activa la transcripción de LuxR, promoviendo la bioluminiscencia, además de la autoinducción del propio sistema LuxR-LuxI.

El sistema AinS-AinR es otro SPQ que utiliza una acil-homoserina lactona (C8-HSL) como molécula señal. Esta molécula es detectada por la cinasa de histidina AinR, que forma parte de un sistema de señalización de dos componentes.<sup>10,18</sup>

Los sistemas AinS-AinR y LuxS-LuxP/Q modulan indirectamente la bioluminiscencia a través del control transcripcional de LuxR. Tanto LuxP/Q como AinR tienen la capacidad de fosforilar a LuxO a través de LuxU. A bajas densidades celulares, y por lo tanto a bajas concentraciones de autoinductores, las cinasas de histidina AinR y LuxQ fosforilan a LuxO, lo que activa la transcripción del pequeño ARN no codificante (sRNA) *qrr1*, el cual degrada al mensajero del regulador *litR* mediante la chaperona de ARN Hfq. A altas densidades celulares, la actividad cinasa de AinR y LuxQ se inhibe y su actividad fosfatasa se activa, lo que permite la estabilización de *litR*. A su vez, LitR incrementa la expresión de *luxR*, contribuyendo así a la producción de bioluminiscencia.<sup>10,17,19-21</sup>

Otros comportamientos colectivos como la motilidad por flagelo y la formación de biopelícula, indispensables para establecer una adecuada relación con su simbiote, son controlados por el SPQ en *A. fischeri*. Mientras la motilidad mediada por el flagelo es reprimida por el regulador LitR,<sup>10</sup> la formación de biopelícula es promovida por LuxQ y LuxU.<sup>16</sup>

De esta forma, a baja densidad celular, los sistemas AinS-AinR y LuxS-LuxP/Q, que se encuentran activos, pueden promover la motilidad de *A. fischeri* a través del regulador LitR, facilitando la colonización efectiva del órgano luminiscente del calamar. Una vez que *A. fischeri* ha colonizado dicho órgano y se incrementa la densidad poblacional junto con la concentración de autoinductores, los sistemas AinS-AinR y LuxS-LuxP/Q se inactivan, lo que reprime la motilidad a través de la acción de LitR. LitR, a su vez, potencia la expresión de LuxR. La unión de LuxR con el autoinductor producido por LuxI activa la expresión de los genes de bioluminiscencia, proceso esencial para que la simbiosis entre estos organismos persista.<sup>15</sup>

### ***Agrobacterium tumefaciens***

El SPQ de *A. tumefaciens* se basa en el par de homólogos de LuxR/LuxI, TraR y TraI. TraI produce el autoinductor N-3-oxo-octanoil homoserina lactona (OC8-HSL). Una vez unido a dicho autoinductor, TraR activa la transcripción de genes involucrados con la replicación y conjugación del plásmido Ti.<sup>22</sup>

La estructura cristalográfica de TraR en complejo con su autoinductor y la caja Tra (ATGTGCAGATCTGCACAT) (Figura 3), permitió determinar aquellos aminoácidos y estructuras secundarias relevantes para la funcionalidad de los dominios de unión a autoinductor y de unión a ADN de este regulador. Además se determinó que un dímero de TraR es la versión funcional de esta proteína.<sup>23</sup>



Figura 3. **Estructura cristalográfica de TraR en complejo con su autoinductor y el ADN.** El regulador TraR, homólogo de LuxR en *Agrobacterium tumefaciens*, forma un homodímero funcional al unirse a la acil-homoserina lactona OC8-HSL (N-3-oxo-octanoil homoserina lactona) y a la secuencia de ADN denominada caja Tra (ATGTGCAGATCTGCACAT). Un monómero de TraR se muestra en verde y otro en naranja, mientras que el ADN correspondiente a la caja Tra se muestra en azul. El dominio de unión a autoinductor está compuesto por láminas  $\beta$  antiparalelas y hélices  $\alpha$ . El autoinductor se une a una cavidad hidrofóbica formada entre tres hélices  $\alpha$  y tres láminas beta. La hélice  $\alpha 6$  permite la dimerización del dominio de unión a autoinductor. El dominio de unión a ADN tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) interactúa con el ADN a través de las hélices  $\alpha 8$  (soporte) y  $\alpha 9$  (reconocimiento), que interactúan con la secuencia específica del ADN en el surco mayor. La hélice  $\alpha 10$  contribuye a la dimerización de los dominios de unión a ADN.<sup>23</sup> Dicho modelo corresponde al PDB 1h0m visualizado en PyMOL y editado en Inkscape.

El dominio de unión a ligando o de unión a autoinductor está formado por 5 láminas beta antiparalelas flanqueadas por 3 alfa hélices de cada lado ( $\alpha$  1-6). El autoinductor se empaqueta en una cavidad hidrofóbica formada entre 3 láminas beta y 3 alfa hélices, en la cual los residuos Asp70 y Trp57 estabilizan al autoinductor mediante puentes de hidrógeno. La dimerización de este dominio se da a través de interacciones hidrofóbicas entre el alfa hélice 6 de ambos monómeros, así como de interacciones entre la alfa hélice 1 y el giro que conecta a las láminas beta 4 y 5 entre ambos monómeros. El área de interacción entre los dominios de ambos monómeros es de alrededor de 2000 Å.<sup>23</sup>

El dominio de unión a ADN es un dominio tipo hélice vuelta hélice (HTH) formado por 4 alfa hélices ( $\alpha$  7-10). Las dos alfa hélices indispensables para la unión al ADN son la  $\alpha$  8 (soporte) y la  $\alpha$  9 (reconocimiento). Mientras que el  $\alpha$  9 interacciona con las bases en el surco mayor del ADN, la  $\alpha$  8 permite un adecuado estructuramiento del  $\alpha$  9. Las interacciones entre las cadenas laterales de residuos del HTH y los nucleótidos ( a nivel de bases nitrogenadas, fosfatos y esqueletos de las pentosas) ocurren mediante puentes de hidrógeno, contactos polares e interacciones hidrofóbicas. Este dominio dimeriza de forma independiente al dominio de unión a ligando, a través de interacciones hidrofóbicas de los residuos de la hélice  $\alpha$  10. El área de interacción entre los dominios de ambos monómeros es de alrededor de 600 Å.<sup>23</sup>

Se ha observado que el autoinductor es crítico para el correcto plegamiento del péptido de TraR naciente en su estructura terciaria madura, así como para su dimerización. De hecho, TraR en su forma apo, no puede unirse eficazmente al

AHL, lo que provoca su rápida degradación proteolítica.<sup>24</sup> Durante dicho plegamiento, se expone la cara hidrofóbica de la  $\alpha 6$ , lo que permite la dimerización del dominio de unión a ligando entre dos monómeros. Finalmente, se da la dimerización del dominio de unión a ADN, lo que le permite interactuar con el ADN.<sup>23</sup>

La actividad y estabilidad de TraR está influenciada por otras proteínas, además del autoinductor. Tal es el caso de TraM, una proteína de alrededor de 100 aminoácidos que forma un complejo estable con TraR (2:2), inhibiendo su capacidad de unirse al ADN<sup>25</sup> y facilitando su proteólisis.<sup>26</sup>

Por otro lado está TrIR, un homólogo trunco de TraR que no presenta el dominio de unión a ADN. Este regulador LuxR trunco es capaz de formar heterodímeros con TraR, los cuales son incapaces de interactuar con el ADN.<sup>27</sup>

### ***Pseudomonas aeruginosa***

En *Pseudomonas aeruginosa*, existen tres SPQ interconectados. Dos de ellos son homólogos del sistema LuxR-LuxI: LasR-LasI y RhlR-RhlI, cuyos autoinductores son las acil-homoserina lactonas (AHL) 3OC12-HSL y C4-HSL, respectivamente. Por otro lado, está el sistema Pqs, que utiliza moléculas de tipo alquil-quinolonas como moléculas señal, las cuales son sintetizadas por el operón *pqsABCDE* y detectadas por el regulador transcripcional PqsR. Estos tres sistemas regulan la expresión de proteasas, toxinas, componentes de la biopelícula y otros factores de virulencia. Mientras que algunos genes son regulados por más de un SPQ, otros son regulados de forma exclusiva por uno de ellos.<sup>28</sup>

Adicionalmente, en *P. aeruginosa*, existe un regulador LuxR huérfano denominado QscR, el cual en presencia del AHL 3OC12-HSL, producido por LasI, regula a un único operón PA1895-PA1897, cuyos genes podrían estar implicados en la síntesis de ácidos grasos.<sup>29</sup>

QscR tiene la capacidad de formar heterodímeros con LasR y RhIR en ausencia de sus respectivos autoinductores. Esto sugiere que en la fase temprana del crecimiento, QscR podría formar heterodímeros inactivos con LasR o RhIR, lo que inhibiría la activación de genes dependientes del SPQ cuando las concentraciones de AHL aún son bajas.<sup>30</sup>

### ***Erwinia carotovora***

Los ejemplos anteriores referentes a reguladores LuxR corresponden a holoproteínas, que en presencia de sus respectivos autoinductores son capaces de asociarse al ADN para regular la expresión de sus genes blanco. Sin embargo, también existen reguladores LuxR que, en ausencia de su respectivo autoinductor (forma apo), pueden unirse al ADN. Tal es el caso de ExpR de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, que en ausencia de su autoinductor 3OC6-HSL, puede unirse al ADN para activar o reprimir la expresión de genes.<sup>31</sup>

### **El SPQ regula al TCS CckA/ChpT/CtrA.**

CtrA es un regulador de respuesta ampliamente distribuido en  $\alpha$ -proteobacterias, que junto con la cinasa de histidina CckA y la fosfotransferasa ChpT, forma un sistema de dos componentes. CtrA pertenece a la familia OmpR y contiene un dominio REC fosforilable en su extremo N-terminal, que activa a la proteína mediante la fosforilación de un residuo de aspartato conservado.<sup>32</sup> La activación de CtrA depende de la cinasa híbrida CckA, que se autofosforila en un residuo de histidina y transfiere el grupo fosforilo a ChpT, que a su vez fosforila a CtrA. Cuando CckA no está activa como cinasa, puede actuar como fosfatasa, desfosforilando a CtrA-P.<sup>33</sup> Una vez activado, CtrA se une a secuencias específicas de ADN (TTAA-N7-TTAAC y TTAAC) para regular la transcripción de genes.<sup>34</sup>

En *Caulobacter crescentus*, CtrA regula la expresión de los genes flagelares. Además, modula la progresión del ciclo celular al unirse directamente al origen de replicación y controla la expresión de genes implicados en la división celular, lo que lo convierte en un regulador esencial para la viabilidad celular.<sup>35,36</sup> En otras bacterias como *Rhodobacter capsulatus*, CtrA regula la transferencia horizontal de genes y la biogénesis flagelar, pero no es esencial.<sup>37</sup> Independientemente de si es esencial o no, el control de CtrA sobre los genes flagelares es prevalente.<sup>32</sup>

Dentro de la clase alfa-proteobacteria, en las familias Roseobacteraceae y Paracoccaceae (orden Rhodobacterales) los SPQ que incluyen homólogos de LuxRI son comunes <sup>38</sup> y se ha descrito en algunas de ellas que el SPQ controla la expresión del regulador maestro CtrA, tal es el caso de las Roseobacteraceae *Ruegeria* sp. KLH11 y *Dinoroseobacter shibae*, y de la Rhodobacteraceae *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 <sup>39-41</sup> (Figura 4).

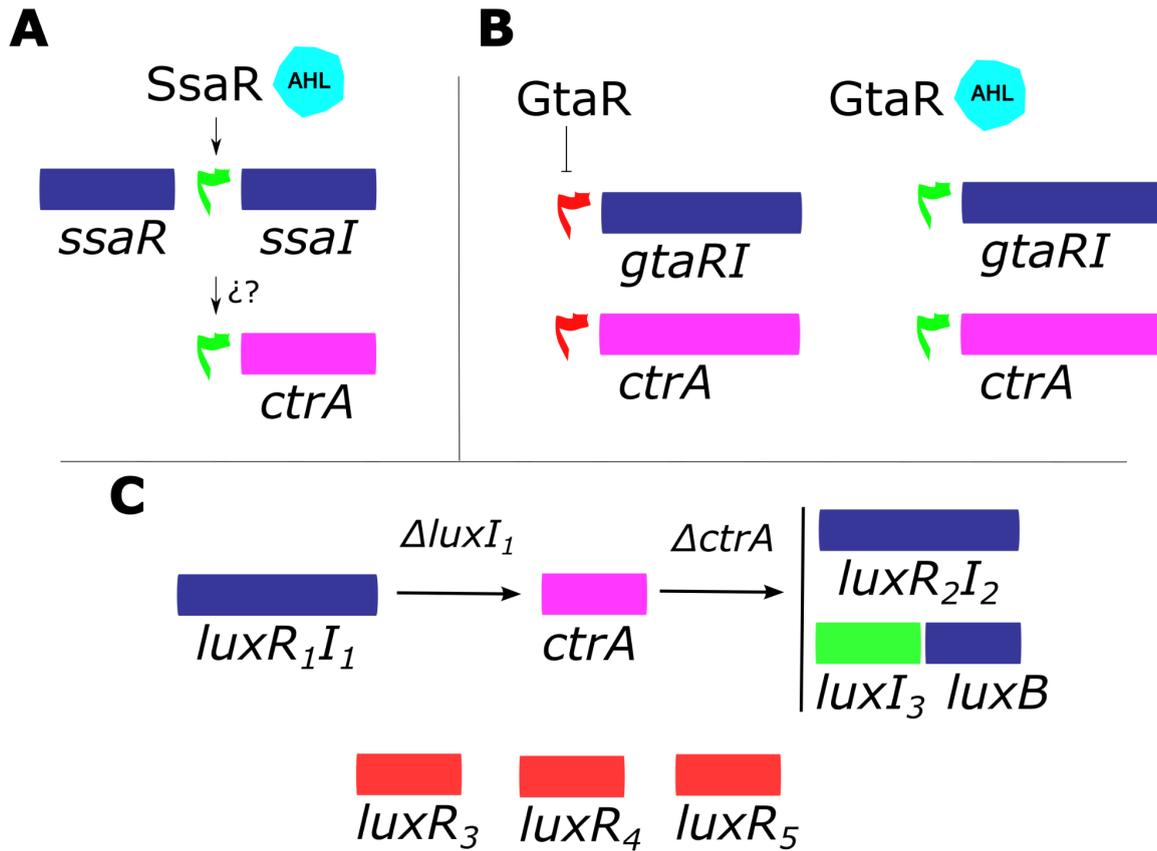


Figura 4. Los SPQ controlan a CtrA en *Ruegeria sp.* KLH11, *Dinoroseobacter shibae* y *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. (A) En *Ruegeria sp.* KLH11, el homólogo de LuxR, SsaR, activa directamente la transcripción de *ssaI*, pero regula de manera indirecta la expresión de *ctrA*. (B) En *Rhodobacter capsulatus* SB 1003, GtaR (homólogo de LuxR) reprime la transcripción de su propio promotor y de *ctrA*. Aunque se ha demostrado que GtaR regula directamente su propio promotor, el mecanismo mediante el cual controla *ctrA* se desconoce. (C) En *Dinoroseobacter shibae*, su SPQ incluye tres sintasas de autoinductor asociadas a homólogos de LuxR: Lux11-LuxR1, LuxI2-LuxR2 y LuxI3-LuxB. En esta bacteria, el SPQ y CtrA están interconectados. La delección de *luxI1* reduce la expresión de *ctrA*, mientras que la delección de *ctrA* disminuye la expresión de *luxR2*, *luxI2*, y *luxI3*.

La bacteria marina *Ruegeria sp.* KLH11, simbionte de la esponja *Mycale laxissima*, cuenta con dos pares de homólogos de LuxR y LuxI (*ssaR-ssaI* y *ssbR-ssbI*) y un

homólogo de LuxI huérfano (*sscI*). Se ha demostrado que SsaR y SsaI activan la motilidad por nado y suprimen la formación de biopelícula.<sup>42</sup> Además, se sabe que el control de la motilidad está mediado por CtrA, cuya transcripción es regulada por SsaR y SsaI. Aunque SsaR activa directamente a *ssaI* en presencia del autoinductor 3-oxo-C16-HSL en un sistema heterólogo, no puede activar a *ctrA* en dicho sistema, lo que sugiere que dicho control es indirecto<sup>41</sup> (Figura 4A).

La presencia de autoinductores y la expresión de *ssaI* en extractos de la esponja *Mycale laxissima* indican que el SPQ de *Ruegeria sp.* KLH11 está activo durante la interacción con su hospedero. Además, el hecho de que SsaR y SsaI regulen positivamente la motilidad y repriman la formación de biopelículas sugiere que el SPQ dirige la transición entre un estilo de vida libre y uno sésil, y que, en su estado activo, este sistema podría limitar la agregación de *Ruegeria sp.* KLH11 dentro de su simbionte.<sup>42</sup>

En *Dinoroseobacter shibae*, un simbionte del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima*,<sup>43,44</sup> el SPQ incluye tres sintasas de autoinductor asociadas a homólogos de LuxR: LuxI1-LuxR1, LuxI2-LuxR2 y LuxI3-LuxB (un regulador tipo LuxR solo con dominio de unión a autoinductor)<sup>44,45</sup> y tres homólogos adicionales de LuxR (LuxR3-5) distribuidos en su genoma.<sup>44</sup> *D. shibae* produce autoinductores con acilos insaturados, como C18en-HSL y C18dien-HSL.<sup>45,46</sup> En esta bacteria el SPQ y CtrA están interconectados (Figura 4C). La delección de *luxI1* reduce la expresión de CtrA,<sup>45</sup> mientras que la delección de CtrA disminuye la expresión de *luxR2*, *luxI2*, y *luxI3*.<sup>47</sup> A su vez, la adición de autoinductores exógenos como C18en-HSL,

C18dien-HSL o 3-oxo-C14-HSL restablece la expresión de CtrA en la mutante *luxI1*.<sup>39,45</sup>

En esta bacteria, el SPQ parece influir en varios procesos celulares. Por ejemplo, una mutante en *luxI* exhibe una tasa de crecimiento mayor en comparación con la cepa silvestre. También afecta el tamaño y la forma celular: mientras la cepa silvestre presenta una morfología celular heterogénea (bacilos y cocos), la mutante en *luxI* muestra una morfología homogénea, exclusivamente de cocos. Además, influye en la división celular, ya que la cepa silvestre presenta tanto división simétrica como asimétrica, mientras que la mutante en *luxI* solo muestra división simétrica (fisión binaria). A través de CtrA, el SPQ regula genes relacionados con la motilidad flagelar, el agente de transferencia de genes (GTA), el metabolismo de c-di-GMP y la respuesta SOS mediante LexA.<sup>39,45</sup>

Por otro lado, en *Rhodobacter capsulatus* SB 1003, miembro de la familia Rhodobacteraceae, el SPQ consiste en los homólogos de LuxR y LuxI, GtaR y GtaI, respectivamente.<sup>40,48</sup> Se propone que GtaR funciona como un represor transcripcional en ausencia de su autoinductor C16-HSL, reprimiendo su propia transcripción<sup>49</sup> y la de *ctrA*<sup>40</sup> (Figura 4B). Mientras que se ha demostrado que GtaR controla directamente su propio promotor<sup>49</sup> y el promotor de *gafA*.<sup>50</sup> El mecanismo por el cual modula CtrA sigue sin estar claro.

GtaR también modula la expresión de los polisacáridos capsulares<sup>51</sup> y el agente de transferencia de genes (RcGTA).<sup>40</sup> Además, los genes centrales del GTA son

regulados directamente por el regulador transcripcional GafA, que a su vez es controlado tanto por GtaR como por CtrA.<sup>50</sup>

A pesar de que es evidente el control de los SPQ sobre CtrA en *Ruegeria sp.* KLH11, *Dinoroseobacter shibae* y *Rhodobacter capsulatus*, parece ser que en los tres casos dicho control es indirecto, como se ha demostrado en *Ruegeria sp.* KLH11.<sup>41</sup>

### **El SPQ en *Cereibacter sphaeroides***

*Rhodobacter sphaeroides*, ahora renombrada como *C. sphaeroides*, es un miembro de la familia *Paracoccaceae* que posee un SPQ. Hasta ahora se han identificado dos componentes de este sistema: la sintasa de autoinductor CerI, un homólogo de LuxI que produce el autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecanoyl) homoserina lactona (C14-HSL), y el regulador CerR, un homólogo de LuxR (Figura 5A-B). En la cepa de *C. sphaeroides*, 2.4.1, la ausencia de *cerI* conduce a la agregación celular, tanto en placas de agar como en medio de cultivo líquido, de ahí el nombre dado a estos genes, que significa 'respuesta de escape comunitario' (community escape response: cer). El fenotipo parental, puede ser restaurado tras la adición de autoinductor C14-HSL y tras la expresión en trans de *cerI*<sup>52</sup> (Figuras 5C-D).

Estudios recientes han demostrado que en *C. sphaeroides* 2.4.1, CerR controla positivamente la transcripción de *cerI*, con picos de producción de AHL y transcripción de *cerI* durante la fase de crecimiento exponencial, los cuales decaen hacia la fase estacionaria<sup>53</sup> (Figura 5D).

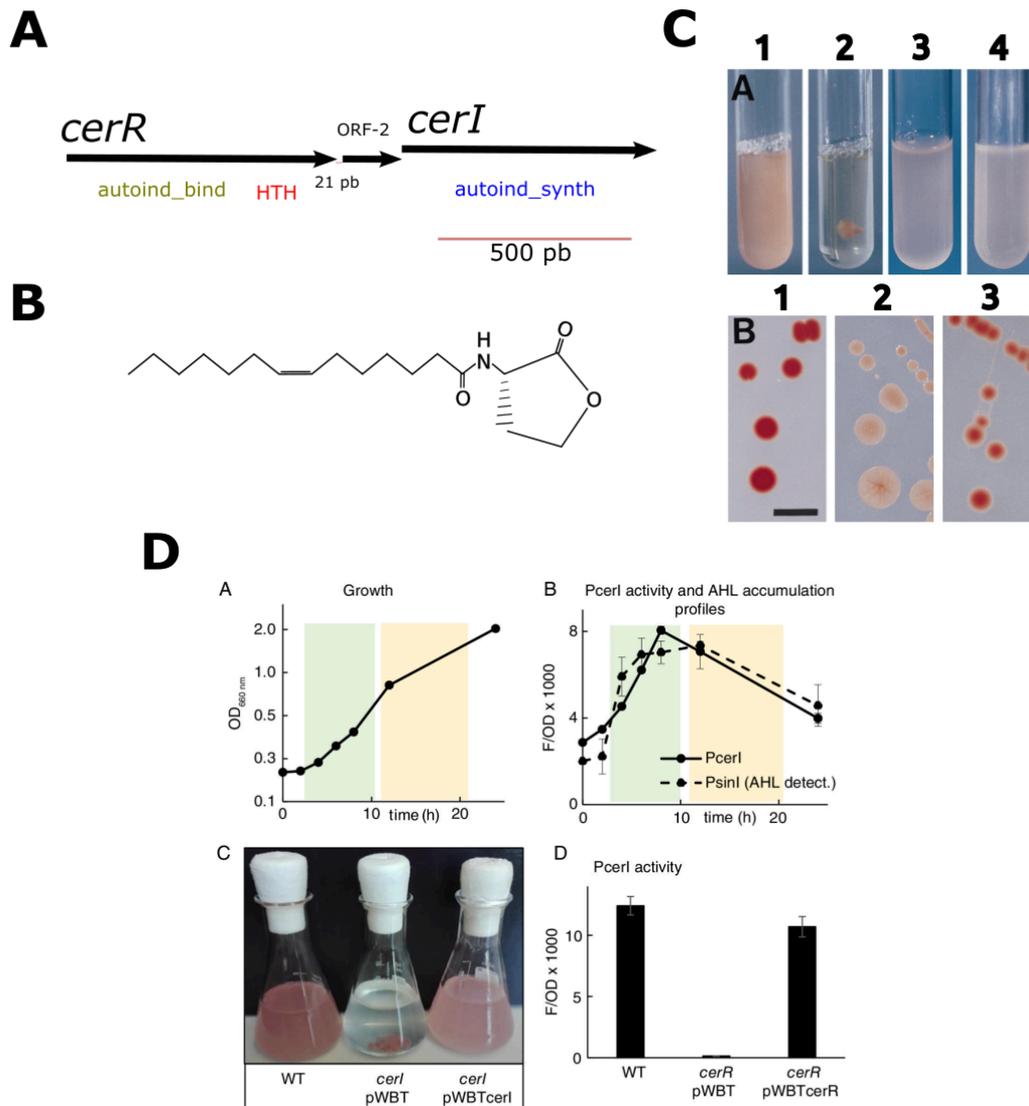


Figura 5. **El sistema de percepción de quórum en *C. sphaeroides* 2.4.1.** En esta figura se resumen los principales hallazgos sobre el SPQ de *C. sphaeroides* 2.4.1 reportados por los grupos de Kaplan y Klug, las figuras A-D fueron tomadas de dichos trabajos.<sup>52,53</sup> (A) Organización del operón *cerR-cerI*. *cerR* codifica un homólogo de LuxR mientras que *cerI* codifica una sintasa de autoinductor (HSL).<sup>52</sup> (B) Estructura química del autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecanoyl) homoserina lactona (C14-HSL), sintetizado por CerI.<sup>52</sup> (C) Efecto de la delección de *cerI* en la agregación celular y en la morfología de colonias en *C. sphaeroides*. (panel A) Las imágenes muestran la formación de agregados celulares en ausencia de *cerI* (2), y la restauración del fenotipo parental (1) tras la adición de C14-HSL (3) o la expresión en trans de *cerI* (4) en medio líquido. (panel B) La delección en *cerI* genera

una morfología de colonias arrugada y un cambio en la coloración (2) en comparación a la cepa silvestre (1). El fenotipo parental puede ser restaurado tras la expresión de *cerI* en trans (3). (D) (panel A) Se muestra la fase exponencial de crecimiento (verde) y la fase de transición hacia la estacionaria (amarillo) de *C. sphaeroides*. (panel B) La actividad del promotor P*cerI* y la mayor producción de AHL se dan en la fase exponencial de crecimiento. (panel C) Las imágenes muestran la formación de agregados celulares en ausencia de *cerI* y la restauración del fenotipo parental tras la expresión en trans de *cerI*. (panel D) La actividad transcripcional del promotor P*cerI* decae en ausencia de *cerR* y se recupera tras su expresión en trans.<sup>53</sup>

*C. sphaeroides*, es una bacteria metabólicamente versátil, capaz de producir polihidroxibutirato (PHB) e hidrógeno molecular, productos de gran importancia biotecnológica. Se ha observado que mutantes en *cerI* y *cerR* presentan un incremento de dos veces en la producción de PHB, así como en la expresión de *phbC*, la sintasa de PHB.<sup>54</sup> Además, la adición de AHL a la cepa silvestre de *C. sphaeroides* 2.4.1 resulta en un incremento en la producción de hidrógeno gaseoso y una disminución en la producción de PHB.<sup>55</sup>

Es importante enfatizar que los hallazgos anteriores se han llevado a cabo en *C. sphaeroides* 2.4.1.<sup>52-55</sup>

### **El nado mediado por el flagelo Fla2 es controlado por CtrA en *C. sphaeroides***

Esta bacteria tiene dos sistemas flagelares, los cuales le permiten desplazarse por medio del nado.<sup>56</sup> El primer sistema flagelar descrito (Fla1) corresponde a un único flagelo subpolar,<sup>57</sup> mientras que el segundo sistema (Fla2) corresponde a múltiples flagelos polares. Un análisis filogenético sugiere que el primer sistema fue adquirido

a través de un evento de transferencia horizontal de un gama-proteobacteria ancestral, mientras que el sistema Fla2 representa el sistema endógeno. En las condiciones de crecimiento comúnmente utilizadas en laboratorio, se expresan los genes *fla1*, mientras que la expresión de los genes *fla2* es mínima.<sup>56</sup> De hecho, las células que expresan los genes *fla1* no producen el flagelo Fla2, lo que indica un posible mecanismo de regulación entre los dos sistemas flagelares.<sup>58</sup>

El sistema flagelar Fla1 es activado transcripcionalmente por el regulador transcripcional FleQ.<sup>59</sup> A partir de una mutante en dicho factor, se aislaron supresoras espontáneas capaces de ensamblar y nadar con el sistema flagelar Fla2, tal es el caso de la cepa AM1.<sup>60</sup> Esta capacidad se atribuyó a una mutación puntual en la cinasa de histidina híbrida CckA (L391F), que fosforila al regulador de respuesta CtrA a través de la proteína fosfotransferasa ChpT. Dicha mutación promueve la autofosforilación de CckA, lo que lleva a la fosforilación y activación de CtrA.<sup>58</sup> La forma fosforilada de CtrA (CtrA-P) se une a los promotores de los genes *fla2*, activando su transcripción.<sup>61</sup> Además, la expresión de los genes que codifican al sistema quimiotáctico que controla la rotación del Fla2 también está gobernada por CtrA.<sup>62</sup>

Se observó que el nado dependiente del sistema Fla2 se potencia bajo condiciones de crecimiento fotoheterotrófico con bajas concentraciones de ácidos dicarboxílicos C-4 o aminoácidos como fuente de carbono. Sin embargo, la expresión de *fla2* no ocurre simplemente cultivando la cepas silvestre o las cepas Fla1- en medio líquido bajo estas condiciones; una mutación de ganancia de función en CckA es necesaria para activar la expresión de *fla2* en condiciones de laboratorio.<sup>58</sup>

## **El regulón CtrA en *C. sphaeroides***

En un estudio reciente, demostramos que el regulador maestro CtrA controla la expresión de 321 genes en *C. sphaeroides*. CtrA no sólo activa la expresión de los genes *fla2* y su sistema quimiotáctico asociado, sino que también activa la expresión de genes que codifican a las vesículas de gas (Figura 6). Las vesículas de gas son estructuras proteicas rellenas de gases circundantes (oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, etc), formadas principalmente por la proteína estructural GvpA. En dicho trabajo demostramos que los genes que codifican para los componentes que forman las vesículas se expresan de forma dependiente de CtrA y dan lugar a la formación de estructuras cilíndricas en el citoplasma que le confieren a *C. sphaeroides* la capacidad de flotar. De esta forma CtrA controla la motilidad en esta bacteria, la cual está determinada por el nado y la flotabilidad. Además, CtrA activa genes involucrados en respuestas al estrés y varios factores de transcripción. Por el contrario, reduce la expresión de genes de fijación de CO<sub>2</sub> y fotosíntesis, lo que lleva a una reducción en los complejos antena.<sup>63</sup>

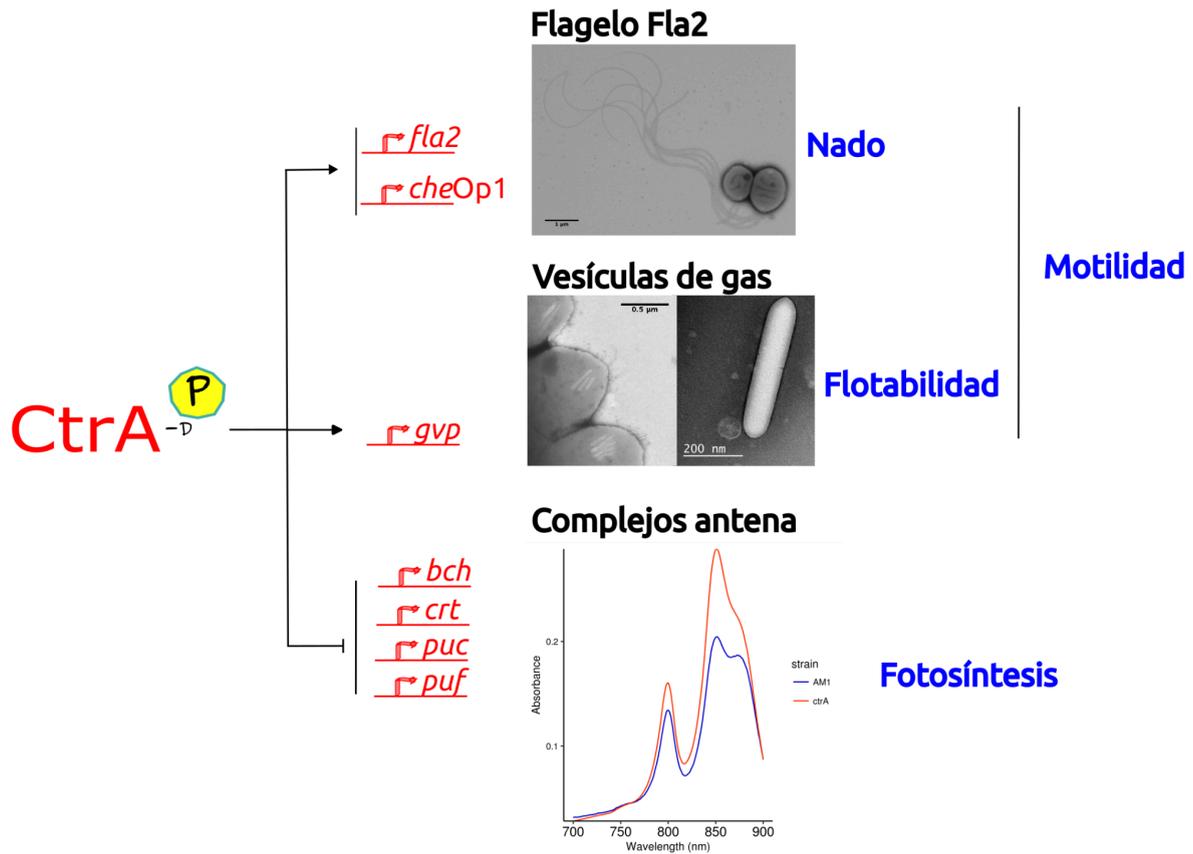


Figura 6. **El regulón CtrA en *C. sphaeroides*.** CtrA, en su forma fosforilada (CtrA~P), regula la expresión de 321 genes en *C. sphaeroides*. Entre ellos se encuentran los genes flagelares *fla2* y los genes del sistema quimiotáctico que los controlan (*cheOp1*), los genes que codifican las vesículas de gas (*gvp*), y los genes fotosintéticos (*bch*, *crt*, *puc* y *puf*), lo que impacta en el nado, la flotabilidad y la producción de complejos antena fotosintéticos. En la figura se muestran micrografías electrónicas correspondientes al flagelo Fla2, las vesículas de gas, y un espectro de absorbancia que refleja la abundancia de los complejos antena en la gráfica de la parte inferior. Se considera al nado mediado por flagelo y a la flotabilidad como parte del mecanismo de motilidad de esta bacteria.

Proponemos que la activación de CtrA permite a *C. sphaeroides* poblar eficazmente la capa superficial de un cuerpo de agua gracias al nado y la flotabilidad. Además, se mantiene en un estado competente para detectar estímulos a través de su sistema quimiotáctico, lo que le permite modular su nado en respuesta a estos. De manera paralela, CtrA reprime la expresión y formación de los complejos antena

fotosintéticos, posiblemente contribuyendo a evitar el daño foto-oxidativo causado por la fotosíntesis en presencia del oxígeno en este estrato. Adicionalmente, se activan genes relacionados con respuestas al estrés, lo que probablemente ayuda a reducir los daños causados por el aumento de la temperatura y la alta intensidad de luz en las capas superficiales del agua. Esto sugiere que en *C. sphaeroides*, CtrA ha evolucionado para controlar respuestas fisiológicas que permiten una rápida adaptación a condiciones ambientales específicas.<sup>63</sup>

Se desconoce si en *C. sphaeroides* el SPQ está interconectado con el TCS CckA/ChpT/CtrA. En el presente estudio nos propusimos evaluar esta posibilidad, ya que, de ser así, este organismo podría ofrecer un modelo ideal para estudiar los mecanismos moleculares que vinculan estos dos sistemas de regulación.

## **Objetivo general**

Caracterizar los componentes del SPQ en *C. sphaeroides* y su posible papel en la regulación del TCS CckA/ChpT/CtrA.

## **Objetivos particulares**

- Identificar a los componentes del SPQ de *C. sphaeroides*.
- Evaluar si el SPQ regula al TCS CckA/ChpT/CtrA, y si lo hace, determinar el mecanismo que rige dicho control.

## **Hipótesis**

El SPQ controla al TCS CckA/ChpT/CtrA en *C. sphaeroides*. El estudio de este modelo permitirá identificar el mecanismo por el cual el SPQ controla a dicho sistema en *C. sphaeroides*, el cual podría extrapolarse a otras Rhodobacterales.

## **Materiales y métodos**

### **Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento**

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 1 . Los oligonucleótidos se adquirieron de oligo T4 (Irapuato, Gto. México) y se listan en la Tabla S1\_Anejos. Las cepas de *C. sphaeroides* WS8N se cultivaron de forma rutinaria en medio mínimo de SistroM sin casaminoácidos. Este medio contiene 15 mM de ácido succínico como fuente de carbono.<sup>63,64</sup> Cuando se indicó, se utilizaron 0.2% de casaminoácidos como fuente de carbono, suplementando un medio mínimo modificado de SistroM que carecía de ácido succínico. Los cultivos líquidos crecidos heterotróficamente se incubaron en la oscuridad con agitación orbital a 200 rpm. Los cultivos líquidos fotoheterotróficos se cultivaron bajo iluminación continua en tubos con tapa de rosca llenos por completo. Los cultivos de *C. sphaeroides* se incubaron a 30 °C. *Escherichia coli* se cultivó en medio Luria-Bertani a 37 °C. Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones indicadas: para *C. sphaeroides*: espectinomicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml), tetraciclina (1 µg/ml), higromicina (20 µg/ml para cultivos líquidos y 150 µg/ml para placas), rifampicina (0.25 µg/ml para cultivos líquidos y 2 µg/ml para placas), ácido nalidíxico (20 µg/ml). Para *E. coli*: ampicilina (100 µg/ml), espectinomicina (50 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), higromicina (20 µg/ml para cultivos líquidos y 200 µg/ml para placas), rifampicina (25 µg/ml para cultivos líquidos y 50 µg/ml para placas). Para las placas, se añadió 15 g/l de agar Bacto.

## Cepas mutantes y plásmidos contruidos para este trabajo

Los alelos mutantes aislados en este trabajo se clonaron en el plásmido suicida pJQ200mp18 (Tabla 1) y se introdujeron en la cepa apropiada de *C. sphaeroides* por conjugación. Se seleccionaron cepas mutantes en las que ocurrieron eventos de recombinación homóloga doble, resultando en el reemplazo del gen cromosómico de tipo salvaje por el alelo mutante. Los detalles del procedimiento para las construcciones de plásmidos se incluyen en Anexos.

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia o fuente
<b>Cepas</b>		
<i>C. sphaeroides</i>		
AM1	Derivado de WS8N; $\Delta fleQ::Kan$ $cckA_{L391F}$	Del Campo et al, 2007
EA1	Derivado de AM1; $\Delta ctrA::aadA$	Vega-Baray et al, 2015
JV14	Derivado de AM1; $\Delta cerI::aadA$	Este trabajo
JV15	Derivado de AM1; $\Delta cerI::Rif$	Este trabajo
JV16	Derivado de AM1; $\Delta cerR::aadA$	Este trabajo
JV17	Derivado de AM1; $\Delta cerN::aadA$	Este trabajo
JV18	Derivado de AM1; $\Delta cerN::Hyg$	Este trabajo
JV19	Derivado de AM1; $\Delta cerM::aadA$	Este trabajo
JV20	Derivado de AM1; $\Delta cerN::Hyg \Delta cerM$	Este trabajo
JV21	Derivado de AM1; $\Delta gtaR::aadA$	Este trabajo
JV22	Derivado de AM1; $\Delta gtaR::uidA-Hyg$	Este trabajo
JV23	Derivado de AM1; $\Delta RS15160::uidA-Hyg$	Este trabajo
JV24	Derivado de AM1; $\Delta 15394::uidA-Hyg$	Este trabajo
JV25	Derivado de AM1; $\Delta cerOp::aadA$	Este trabajo
JV26	Derivado de AM1; $\Delta cerI::Rif$ $\Delta cerM::aadA$	Este trabajo
JV27	Derivado de AM1; $\Delta cerI::Rif$ $\Delta cerN::aadA$	Este trabajo
JV28	Derivado de AM1; $\Delta cerI::Rif$ $\Delta ctrA::uidA-aadA$	Este trabajo
JV29	Derivado de AM1; $\Delta cerN::aadA$ $\Delta gtaR::uidA-Hyg$	Este trabajo
JV30	Derivado de AM1; $\Delta cerN::aadA$ $\Delta RS15160::uidA-Hyg$	Este trabajo

JV31	Derivado de AM1; $\Delta$ cerN::aadA $\Delta$ 15394::uidA-Hyg	Este trabajo
JV32	Derivado de AM1; $\Delta$ cerI::aadA cerM <sub>Q189amb</sub>	Este trabajo
JV33	Derivado de AM1, $\Delta$ cerN::Hyg 14710::aadA	Este trabajo
<b>E. coli</b>		
JV33	Derivado de MC4100; lleva cerMBS1::lacZ en el cromosoma	Este trabajo
TOP10	Cepa de clonación	Invitrogen
Rosetta	Cepa de expresión de proteínas	Novagen
TE2680	F- $\lambda$ IN(rrnD-rrnE)1 D(lac)X74 rpsL galk2 recD1903::Tn10d-Tet trpDC700: :putPA1303::[Kan <sup>s</sup> -Cam <sup>r</sup> -lac]	Elliot, 1992
MC4100	F-, [araD139] <sub>B/r</sub> , $\Delta$ (argF-lac)169, $\lambda$ e14-, flhD5301, $\Delta$ (fruK-yeiR)725(fruA25 ) , relA1, rpsL150(Str <sup>r</sup> ), rbsR22, $\Delta$ (fimB-fl mE)632(::IS1), deoC1	Casadaban, 1976
<b>A. tumefaciens</b>		
NTL4	Cepa reportera para la detección de AHL de cadena larga. Contiene el plásmido pZLR4, que lleva la fusión reportera traG::lacZ	Farrand et al, 1996
<b>Plásmidos</b>		
pTZ18R	Vector de clonación; Kan <sup>r</sup>	Amersham
pTZ_cerI	pTZ18R que lleva cerI	Este trabajo
pTZ_cerRuPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de cerR	Este trabajo
pTZ_cerNuPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de cerN	Este trabajo
pTZ_cerMuPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de cerM	Este trabajo
pTZ_ΔcerN::Hyg-ΔcerM	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la mutación de ΔcerN::Hyg-ΔcerM	Este trabajo
pTZ_gtaRuPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de gtaR	Este trabajo
pTZ_RS15160uPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de RS15160	Este trabajo
pTZ_15394uPdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de 15394	Este trabajo
pTZ_cerRuP-cerXdW	pTZ18R que lleva los fragmentos río arriba y río abajo para la delección de cerR-ORF2-cerI	Este trabajo
pTZ_cerM	pTZ18R que lleva cerM	Este trabajo
pTZ_cerR	pTZ18R que lleva cerR	Este trabajo
pTZ_cerN	pTZ18R que lleva cerN	Este trabajo

pTZ_14710mut	pTZ18R que lleva un fragmento de 1276 pb que incluye al ORF RSWS8N_14710	Este trabajo
pTZ_14710	pTZ18R que lleva un fragmento de 430 pb correspondiente a RSWS8N_14710	Este trabajo
pTZ_cerOp	pTZ18R que lleva <i>cerR-ORF2-cerI</i>	Este trabajo
pTZ_cerMpET	pTZ18R que lleva <i>cerM</i> para su fusión con el tag 6xHis	Este trabajo
pTZ_cerNpGEX	pTZ18R que lleva <i>cerN</i> para su fusión con el tag GST	Este trabajo
pJQ200mp18	Vector suicida movilizable para <i>C. sphaeroides</i> ; Gm <sup>r</sup>	Quandt & Hynes, 1993
pJQ_Δ <i>cerI</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerI</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerI</i> ::Rif	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerI</i> ::Rif	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerR</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerR</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerN</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerN</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerN</i> ::Hyg	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerI</i> ::Hyg	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerM</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerM</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerN</i> ::Hyg-Δ <i>cerM</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerN</i> ::Hyg-Δ <i>cerM</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>gtaR</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>gtaR</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>gtaR</i> :: <i>uidA</i> -Hyg	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>gtaR</i> :: <i>uidA</i> -Hyg	Este trabajo
pJQ_ΔRS15160:: <i>uidA</i> -Hyg	pJQ200mp18 que lleva ΔRS15160:: <i>uidA</i> -Hyg	Este trabajo
pJQ_Δ15394:: <i>uidA</i> -Hyg	pJQ200mp18 que lleva Δ15394:: <i>uidA</i> -Hyg	Este trabajo
pJQ_Δ <i>cerOp</i> :: <i>aadA</i>	pJQ200mp18 que lleva Δ <i>cerOp</i> :: <i>aadA</i>	Este trabajo
pJQ_Δ14710:: <i>aadA</i>	pJQ200 que lleva 14710:: <i>aadA</i>	Este trabajo
pRK415	Vector de expresión para <i>C. sphaeroides</i> ; Tc <sup>r</sup>	Keen et al, 1988
p <i>cerM</i>	Derivado de pRK415 que expresa <i>cerM</i>	Este trabajo
p <i>cerN</i>	Derivado de pRK415 que expresa <i>cerN</i>	Este trabajo
p <i>cerR</i>	Derivado de pRK415 que expresa <i>cerR</i>	Este trabajo
p14710	Derivado de pRK415 que expresa ORF RSWS8N_14710	Este trabajo
p <i>cerOp</i>	Derivado de pRK415 que expresa <i>cerR-ORF2-cerI</i>	Este trabajo
p <i>cerOp</i> Δ <i>cerR</i>	Derivado de p <i>cerOp</i> ; Δ <i>cerR</i>	Este trabajo
p <i>cerOp</i> Δorf-2	Derivado de p <i>cerOp</i> en el que la región -19 a +3 de la región codificante del ORF-2 fue deletada	Este trabajo
p <i>cerI</i>	Derivado de pRK415 que expresa <i>cerI</i>	Este trabajo
pET28a	Vector de expresión para proteínas con etiqueta His6x, Kan <sup>r</sup>	Novagen
pET_6xH- <i>cerM</i>	Derivado de pET28a que expresa CerM fusionado al tag His6x en su extremo N terminal	Este trabajo
pGEX-4T-2	Vector de expresión para proteínas con etiqueta GST, Ap <sup>r</sup>	Amersham

pGEX_cerN	Derivado de pGEX-4T-2 que expresa GST-CerN	Este trabajo
pGEX_cerM	Derivado de pGEX-4T-2 que expresa 6xHis-CerM	Este trabajo
pGEX_cerNM	Derivado de pGEX-4T-2 que expresa GST-CerN y 6xHis-CerM	Este trabajo
pRS551	Vector para la clonación de promotores, que lleva al gen reportero <i>lacZ</i> ; Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> / <i>lacZ</i>	Simons et al, 1987
pcerMBS1:: <i>lacZ</i>	Derivado de PRS551 que lleva la fusión transcripcional <i>cerMBS1&gt;::lacZ</i>	Este trabajo
pBBR1gus	Plásmido fuente del gen <i>uidA</i>	Girard et al, 2000
pIJ963	Plásmido fuente del cassette de higromicina	Lydiate et al, 1989
pWM5	Plásmido fuente del cassette <i>uidA-aadA</i>	Metcalfe & Wanner, 1993

## Ensayos de motilidad

La motilidad se evaluó en placas de agar suave (0.2% de agar) que contenían medio mínimo de Sistro utilizando 0.2% de casaminoácidos como fuente de carbono. Las placas se incubaron en un frasco anaeróbico utilizando sobres generadores de gas BD GasPak EZ, bajo iluminación continua.

## Sobreexpresión y purificación de proteínas

La purificación por afinidad de 6xHis-CerM se realizó según protocolos previamente publicados para proteínas con etiqueta His (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>). En resumen, la cepa *E. coli* Rosetta pET-28a\_6xHis-*cerM* se cultivó durante la noche en medio LB y se subcultivó en 100 ml de medio fresco a una densidad óptica inicial (OD600) de 0.05. Una vez que alcanzó una OD600 de 0.6, se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM y el cultivo se incubó

durante 4 horas a 30°C. Las células se recolectaron y resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8). Se añadió lisozima (1 mg ml<sup>-1</sup>) y las células se incubaron durante 30 minutos en hielo en presencia de un inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor, Roche). Después de este tiempo, los protoplastos celulares se sonicaron y los desechos celulares se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante se incubó con 200 µl de perlas de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) con agitación suave durante 1 hora a 4°C. La mezcla se cargó en una columna y se dejó fluir. La columna se lavó tres veces con tampón de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8), y la proteína se eluyó con tampón de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8). La proteína se dializó en PBS, pH 7.4.

Para obtener GST-CerN, Rosetta pGEX-4T-2\_GST-*cerN* se cultivó durante la noche en medio LB y se subcultivó en 100 ml de medio fresco a una OD<sub>600</sub> inicial de 0.05. Una vez que alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0.6, se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM y el cultivo se incubó durante 4 horas a 30°C. Las células se precipitaron y resuspendieron en 5 ml de tampón PBS (pH 7.4) suplementado con lisozima (1 mg ml<sup>-1</sup>) y 20% de glicerol, y se incubaron durante 1 hora en hielo en presencia de un inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor, Roche). Los protoplastos celulares se sonicaron y los desechos celulares se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante se incubó con 100 µl de perlas de agarosa de glutatión (Sigma) con agitación suave durante 1 hora a 4°C. La mezcla se cargó en una columna y se dejó fluir. La columna se lavó tres veces con tampón PBS, y la proteína se eluyó con tampón de elución (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutatión reducido, pH 8). La proteína se dializó en tampón PBS (pH 7.4).

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad con BSA como estándar.

### **Anticuerpos e inmunodetección (Western blot)**

Se generaron anticuerpos policlonales en ratones hembra BALB/c contra la proteína 6xHis-CerM, como se describió anteriormente.<sup>69</sup> Los extractos celulares totales se sometieron a SDS-PAGE, y las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se probaron con  $\alpha$ -CerM (1:10,000), obtenidos en este trabajo, o con  $\alpha$ -CtrA,  $\alpha$ -FlgE, o  $\alpha$ -His (Qiagen). Como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). La detección se realizó utilizando el sustrato CDP-Star (Applied Bio-systems).

### **Experimento de Pull-Down**

Las cepas Rosetta/pET\_6xH-*cerM* y Rosetta/pGEX\_*cerN* se indujeron como se describió. Las células se recolectaron y se resuspendieron en 5 ml de tampón PBS (pH 7.4), suplementado con lisozima (1 mg ml<sup>-1</sup>) y 20% de glicerol, y se incubaron durante 1 hora en hielo en presencia de un inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor, Roche). Los protoplastos celulares se sonicaron y los desechos celulares se eliminaron por centrifugación. Los sobrenadantes se incubaron juntos en ausencia o presencia de 100  $\mu$ l del AHL obtenido del sobrenadante de cultivo celular de AM1, y 100  $\mu$ l de perlas de agarosa de glutatión (Sigma). Las muestras se incubaron con agitación suave durante 1 hora a 4°C. La mezcla se cargó en una columna y se dejó fluir. La columna se lavó tres veces con tampón PBS, o

PBS-AHL. Las proteínas se eluyeron con tampón de elución (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutatión reducido, pH 8). Las muestras se analizaron por Western blot o SDS-PAGE, teñidas con azul de Coomassie R 250.

### **Concentración de AHL a partir de sobrenadantes de cultivos celulares**

Para concentrar AHL de los sobrenadantes de cultivos celulares, se utilizó el método de acetato de etilo previamente descrito.<sup>7</sup> Para esto, la cepa productora de autoinductor AM1 y su derivado  $\Delta cerI$  (JV14) se cultivaron fotoheterotróficamente en medio mínimo de SistroM sin ácido succínico y suplementado con 0.2% de casaminoácidos como fuente de carbono. Se mezclaron 20 ml de sobrenadante libre de células con un volumen igual de acetato de etilo acidificado (0.1% de ácido acético), se agitó vigorosamente durante 15 minutos para asegurar una mezcla completa y se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se dejó evaporar el solvente en la campana de extracción. Una vez seco, se añadieron 200  $\mu$ l de etanol al 100%. La presencia del autoinductor se verificó mediante el sistema reportero *A. tumefaciens* NTL4 pZLR4-*traG::lacZ* (Figura S5).

### **Ensayo de detección de AHL**

Para evaluar la actividad promovida por la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4-*traG::lacZ*), un cultivo crecido toda la noche se diluyó a una OD<sub>600</sub> de 0.05 en LB, suplementado o no con el autoinductor. N-(3-hidroxi-7cis-tetradecenoil)-L-homoserina lactona (Cayman) se usó a las siguientes concentraciones: 100 nM, 1  $\mu$ M y 3  $\mu$ M. Alternativamente, se añadieron 2

ml de los extractos etanólicos recién preparados a partir de los sobrenadantes de cultivos celulares (Materiales y métodos 7). Los cultivos se incubaron durante 18 horas a 30°C. Las células se recolectaron y se determinó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa expresada en unidades Miller (Figura S5).

## **RT-PCR**

Se aisló ARN total de células cultivadas hasta una densidad óptica (OD600) de 0.6 en medio mínimo de SistroM utilizando el kit RiboPure (Ambion). La transcripción inversa y la amplificación por PCR se realizaron con el sistema Access RT-PCR (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción de control sin transcriptasa reversa en paralelo. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida. Los oligonucleótidos DOWNcerRfw y asRNAcerI se utilizaron para probar la región entre *cerR* y *cerI*, amplificando un producto de 379 pb. FwpctrAXbal y RvctrAEcoRI se utilizaron para amplificar una región de 285 pb correspondiente a la región río arriba de *ctrA* como control.

## **Determinación *in vivo* de la capacidad de unión de CerM al ADN**

La cepa reportera MC4100 que porta el gen *lacZ* bajo el control del promotor artificial *cerMBS1::lacZp* en el locus *trp*, fue transformada con los plásmidos derivados de pGEX-4T-2 que expresan 6XHis-CerM, GST-CerN o ambas proteínas simultáneamente. Como control negativo, la cepa reportera también fue transformada con el plásmido vacío pGEX-4T-2. Estas cepas se cultivaron en 2 ml de medio LB con o sin AHL obtenido del sobrenadante de cultivo celular de AM1

durante 3.5 h a 37 °C. Las células se recolectaron por centrifugación y se determinó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

### **Ensayos de $\beta$ -glucuronidasa**

Se utilizaron extractos celulares totales para medir la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa. Estos extractos se prepararon utilizando cultivos en la fase exponencial de crecimiento. Las células se concentraron 6 veces antes de la lisis. Las actividades enzimáticas se realizaron siguiendo protocolos previamente reportados.<sup>63</sup> El contenido de proteína se determinó utilizando el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad con BSA como estándar.

### **Ensayos de $\beta$ -galactosidasa**

Los ensayos se llevaron a cabo según el protocolo de OpenWetWare: Ensayo de  $\beta$ -Galactosidasa (Un mejor ensayo Miller).

### **Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)**

Los ensayos se llevaron a cabo basándose en el protocolo previamente reportado <sup>65</sup> con algunas modificaciones. En resumen, se incubaron 50 ng de ADN en ausencia o presencia de 50, 100 o 200 ng de 6xHis-CerM en un Tampón de Unión (10 mM Tris [pH 7.5], 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.1 mM DTT, 5% v/v glicerol, 0.10 mg ml<sup>-1</sup> BSA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cuando fue necesario, se añadió GST-CerN a una concentración equimolar respecto a 6xHis-CerM. Se agregaron sobrenadantes concentrados o autoinductor sintético si era necesario. Cuando se

incubaron 6xHis-CerM y GST-CerN juntos, se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregar el ADN. Las mezclas se separaron en un gel no desnaturizante de 4% Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8) utilizando un tampón de electroforesis 1X (Tampón TAE: 40 mM Tris, 2.5 mM EDTA, ajustado a pH 7.8 con ácido acético). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV.

### **RNA-seq**

La secuenciación de ARN (RNA-seq) se realizó como se describió previamente.<sup>61</sup> Las cepas *C. sphaeroides* AM1/pRK415 y  $\Delta$ *cerN*/pcerM (JV17/pcerM) se cultivaron en medio mínimo de SistroM con 0.2% de casaminoácidos en condiciones fotoheterotróficas. Cuando los cultivos alcanzaron una OD600 de 0.6, las células se cosecharon y el ARN total se aisló utilizando el kit RiboPure RNA Purification (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis capilar utilizando el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La eliminación de rARN se llevó a cabo utilizando el kit Ribo-Zero Plus rRNA Depletion según las instrucciones del fabricante. El ARN depletado de rARN fue posteriormente procesado por la compañía CD Genomics hasta su secuenciación. La preparación de la biblioteca se realizó siguiendo el protocolo High Sample (HS) de la Guía de Preparación de Muestras TruSeq Stranded mRNA (Illumina). Las bibliotecas de cDNA se sometieron a secuenciación de extremos emparejados de 2 × 150 pb en la plataforma Illumina HiSeq. El número de lecturas que se mapearon a una ubicación única en el genoma WS8N fue de 163,336,124 y 208,340,108 para AM1/pRK415 y  $\Delta$ *cerN*/pcerM, respectivamente. El análisis

diferencial de expresión génica se realizó con DESeq2 (versión 1.10.1). Los genes con un cambio de expresión  $\log_2 \geq 2$  o  $\leq -2$  y un valor de probabilidad ajustado (P<sub>adj</sub>) de  $\leq 0.01$  se consideraron diferencialmente expresados.

### **Análisis in silico**

Para identificar nuevos componentes del SPQ de *C. sphaeroides*, se obtuvieron los perfiles HMM PF03472.18, PF00196.22 y PF00765.20, correspondientes a los dominios Autoind\_bind, GerE (HTH) y Autoind\_synth, respectivamente, de la base de datos Pfam utilizando el programa hmfetch de HMMER en terminal.<sup>66</sup> Posteriormente, estos perfiles se compararon con las proteínas anotadas de *C. sphaeroides* WS8N. Los valores de corte se establecieron en puntuaciones de 35, 20 y 50 para los dominios Autoind\_bind, GerE (HTH) y Autoind\_synth, respectivamente. La presencia del dominio Autoind\_bind se requirió para definir un regulador LuxR, mientras que la presencia del dominio Autoind\_synth se requirió para definir una sintasa de autoinductor LuxI. El programa OrthoFinder 2.5.5<sup>67</sup> se ejecutó con los parámetros predeterminados, utilizando Diamond para comparar las secuencias proporcionadas. La entrada consistió en las proteínas anotadas completas de *C. sphaeroides* WS8N (GCF\_000212605.1), *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 (GCF\_000021865.1), *Dinoroseobacter shibae* DF12 (GCF\_000018145.1), *Ruegeria* sp. KLH11 (*Bacterium Rhodobacteraceae* KLH11: GCF\_000158135.1) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (GCF\_000006965.1), abarcando un total de 22,618 secuencias peptídicas. Estas secuencias se organizaron en 4,375 ortogrupos. La salida de Orthofinder también incluyó el árbol filogenético de especies y los árboles de genes para todos los ortogrupos.

Para evaluar la sintenia, se utilizó la versión en línea del programa SyntTax (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/SyntTax/>)<sup>68</sup> con un valor mínimo de puntuación del 10%. La entrada consistió en las secuencias peptídicas de las proteínas del SPQ de *C. sphaeroides* que se compararon con los genomas de *R. capsulatus* SB 1003, *D. shibae* DF12 y *Ruegeria pomeroyi* DSS3.

### **Búsqueda *in silico* del sitio de unión de CerM**

Para identificar un motivo que pudiera corresponder al sitio de unión de CerM, se filtraron los 381 genes diferencialmente expresados (DE) entre  $\Delta cerN/pcerM$  y AM1/pRK415 ( $\log_2FC \geq 2$  o  $\leq -2$ ) para eliminar 200 genes que se sabe que están controlados por CtrA. Considerando un  $\log_2FC \geq 1$  o  $\leq -1$ , el regulón de CtrA consiste en 546 genes bajo las condiciones de crecimiento reportadas previamente.<sup>63</sup> Esto resultó en 181 genes, organizados en 105 unidades transcripcionales (operones). Se definió un operón como genes en la misma orientación que están separados por menos de 50 pb. El análisis de estas 105 regiones utilizando MEME 5.5.5 con los parámetros predeterminados no reveló un motivo conservado. Para hacer este análisis más específico, buscamos en este conjunto de datos utilizando una matriz de peso posicional (PWM) que describe el sitio de unión de GtaR (Figura S9). Esto se basó en la premisa de que GtaR y CerM probablemente son parálogos y podrían reconocer sitios similares. En consecuencia, esta estrategia identificaría los sitios de unión de GtaR que podrían formar parte de nuestro conjunto de datos, así como aquellos sitios reconocidos por CerM.

Esta búsqueda se realizó utilizando el programa 'RSAT matrix scan quick and simple', con un valor de probabilidad de corte de  $1e-4$  y la PWM de GtaR. Dada la naturaleza palindrómica del sitio de unión de GtaR, frecuentemente se calcularon dos coincidencias para cada promotor; también se observó que en una sola región reguladora ocasionalmente se encontraron varias coincidencias.

Para construir la PWM que modela el sitio de unión de GtaR, seleccionamos una región de 300 pb río arriba y 10 pb aguas río abajo del codón de inicio de los ortólogos de *gtaR* de 23 especies de Rhodobacterales que poseen ortólogos de GtaR y GtaI (los ortólogos se identificaron utilizando el método del mejor golpe recíproco con BLASTP, con una cobertura mínima del 70% y una identidad de secuencia mínima del 35%). Las especies incluidas fueron: *Rubellimicrobium thermophilum* DSM 16684, *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001, *Ketogulonicigenium vulgare* Y25, *Wenxinia marina* DSM 24838, *Roseobacter* sp. CCS2, *Paracoccus denitrificans* PD1222, *Paracoccus* sp. J39, *Paracoccus* sp. J55, *Paracoccus* sp. TRP, *Paracoccus* sp. N5, *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, *Paracoccus pantotrophus* J40, *Paracoccus pantotrophus* J46, *Rhodobacter capsulatus* SB 1003, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588, *Rhodobacter* sp. SW2, *Pseudorhodobacter ferrugineus* DSM 5888, *Celeribacter baekdonensis* B30, *Maritimibacter alkaliphilus* HTCC2654, *Roseibacterium elongatum* DSM 19469, *Jannaschia* sp. CCS1, *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 y *Oceaniovalibus guishaninsula* JLT2003. También se incluyó la región reguladora del ortólogo de GtaR en *C. sphaeroides* WS8N. Este análisis identificó un motivo de 22 pb,

RACMTGTCYWWWRGACAKGTY, con un valor e de  $1.1e-048$ , que estuvo presente en 18 de las 24 secuencias analizadas.

## Resultados

### Identificación *in silico* de nuevos componentes del SPQ de *C. sphaeroides* y sus relaciones filogenéticas

Con el objetivo de identificar a los componentes del SPQ en *C. sphaeroides*, se realizó una búsqueda de homólogos de LuxR y LuxI en el genoma de este organismo. Para ello se buscaron los dominios de unión a autoinductor (Autoind\_bind (PF03472.18)) y de unión a ADN (GerE/HTH (PF00196.22)) presentes en LuxR y de síntesis de AHL (Autoind\_synth (PF00765.20)) presente en LuxI utilizando el programa HMMER. Estas búsquedas se llevaron a cabo contra las proteínas anotadas del genoma de *C. sphaeroides* WS8N. Solo se consideraron como homólogos de LuxR aquellos blancos que presentaran el dominio Autoind\_bind, y como homólogos de LuxI, aquellos que contaran con el dominio Autoind\_synth. Este análisis resultó en la identificación de seis homólogos de LuxR. Cinco de ellos poseen los dos dominios presentes en LuxR: RSWS8N\_05820, RSWS8N\_13935, RSWS8N\_15394, RSWS8N\_RS15160 y RSWS8N\_05825, este último previamente descrito como *cerR*.<sup>52</sup> Sin embargo, uno de ellos solo presenta el dominio Autoind\_bind: RSWS8N\_05815. Finalmente, se identificó un único homólogo de LuxI, que posee el dominio Autoind\_synth y que corresponde a *cerI*, reportado previamente<sup>52</sup> : RSWS8N\_05830 (Tabla 1).

	ORF	gene	ID	HMMER					
				Autoind_bind		GerE_HTH		Autoind_synth	
				score	e-value	score	e-value	score	e-value
<b>LuxR</b>	RSWS8N_05825	<i>cerR</i>	WP_002720271.1	128.1	4.30E-38	63.4	2.60E-18		
	RSWS8N_RS15160	RS15160	WP_082242126.1	77.1	2.10E-22	68.2	8.10E-20		
	RSWS8N_13935	<i>gtaR</i>	WP_011336955.1	51.6	1.60E-14	24.6	3.20E-06		
	RSWS8N_05820	<i>cerM</i>	WP_011338009.1	47.5	2.90E-13	42.9	6.50E-12		
	RSWS8N_15394	15394	WP_002723109.1	38.7	1.50E-10	37.7	2.70E-10		
	RSWS8N_05815	<i>cerN</i>	WP_009563908.1	66.1	5.30E-19				
<b>LuxI</b>	RSWS8N_05830	<i>cerI</i>	WP_002720272.1					281.5	5.20E-85

Tabla 1. Homólogos de LuxR y LuxI en el genoma de *C. sphaeroides* identificados mediante HMMER. Los genes *cerR* y *cerI* fueron reportados previamente.<sup>52</sup> Los nombres *gtaR*, *cerM* y *cerN* fueron asignados en este trabajo.

Dos de los cinco homólogos de *luxR* identificados en esta búsqueda se encuentran río arriba de *cerR*, y los otros están distribuidos a lo largo de los cromosomas I y II (Figura 7).

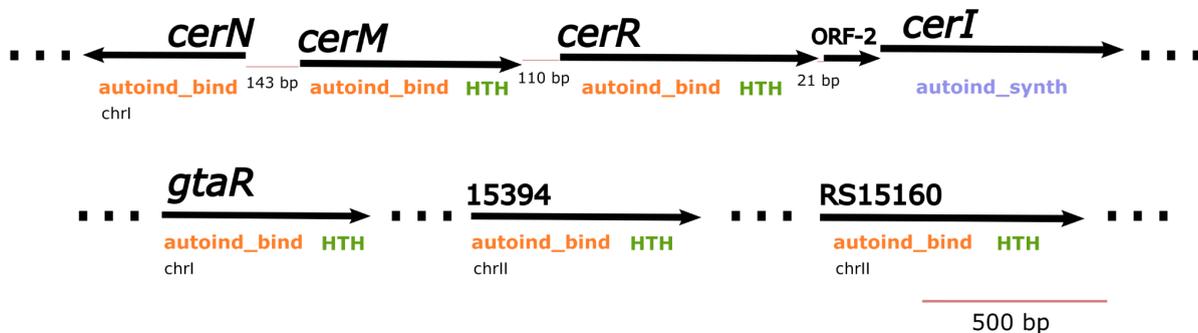


Figura 7. Genes que codifican a homólogos de LuxR y LuxI presentes en el genoma de *C. sphaeroides* identificados por HMMER. *cerI* y *cerR* corresponden a los homólogos previamente caracterizados de *luxI* y *luxR*, respectivamente. Tres puntos continuos representan un salto a otra posición en el genoma. Se indica la distancia entre genes contiguos. Debajo de cada flecha se muestran los dominios identificados en las proteínas codificadas por estos genes.

Para evaluar las relaciones filogenéticas entre los componentes del SPQ de *C. sphaeroides* y las proteínas del SPQ de otras bacterias en las que se ha descrito

una conexión entre el SPQ y el TCS CckA/ChpT/CtrA, realizamos un análisis de grupos de ortólogos utilizando el programa Orthofinder. Este análisis incluyó las proteínas anotadas de *D. shibae* DFL 12, *R. capsulatus* SB 1003, y *Ruegeria sp.* KLH11, además de las de *C. sphaeroides* WS8N. Derivado de este análisis, se observó que la sintasa de autoinductor CerI se agrupó en el ortogrupo OG0309 junto con Ssal de *Ruegeria sp.* KLH11. De manera similar, se encontró que CerR se agrupa con SsaR de *Ruegeria sp.* KLH11 en el ortogrupo OG0076, que también incluye a RSWS8N\_RS15160. Los otros cuatro reguladores LuxR de *C. sphaeroides* se ubicaron en el ortogrupo OG0480, junto con GtaR de *R. capsulatus* y LuxR1 de *D. shibae*. La agrupación de RSWS8N\_13935 en relación con GtaR y LuxR1 sugiere que estas proteínas podrían ser ortólogas, mientras que los otros tres reguladores LuxR de *C. sphaeroides* (RSWS8N\_05820, RSWS8N\_05815 y RSWS8N\_15394) podrían ser parálogos de RSWS8N\_13935 (Fig 8A-B). Un análisis de sintenia utilizando SyntTax reveló que RSWS8N\_13935 es el único que exhibe una sintenia conservada con LuxR1 de *D. shibae* y GtaR de *R. capsulatus*, apoyando la propuesta de que estos tres reguladores son ortólogos. Por lo tanto, RSWS8N\_13935 será referido en adelante como GtaR. Este análisis también reveló la pérdida del homólogo de GtaI/LuxI1 en *C. sphaeroides* (Fig. 8C).

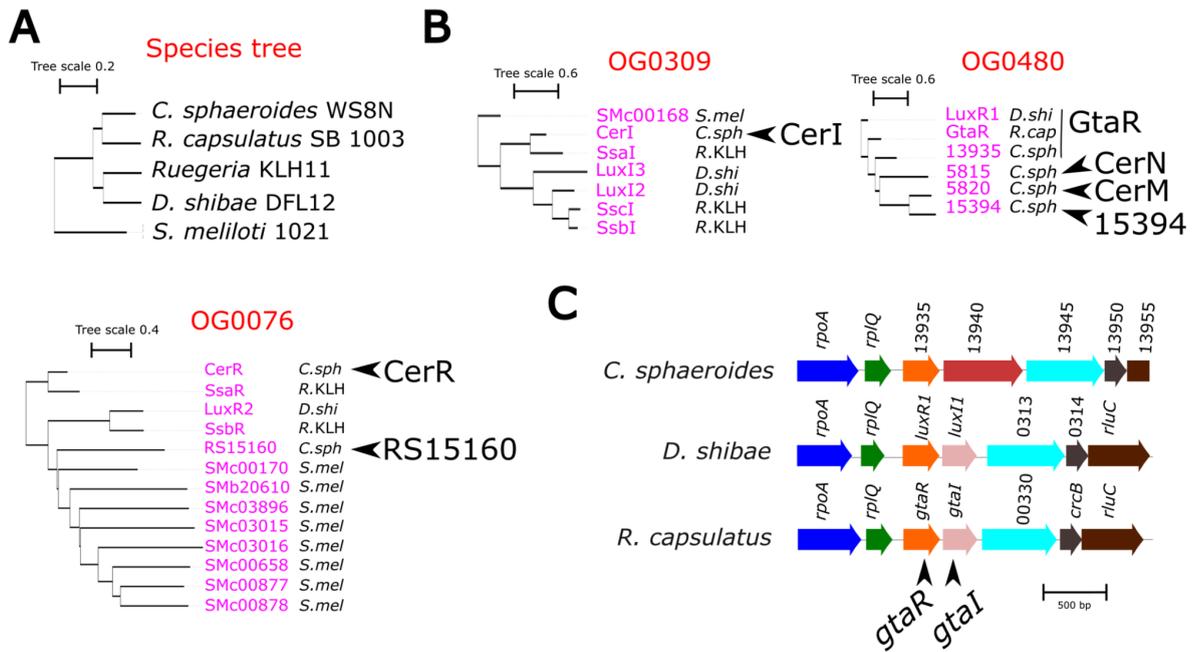


Figura 8. **Análisis filogenético de los componentes del SPQ en *C. sphaeroides* y especies relacionadas.** A, Árbol filogenético que muestra las relaciones filogenéticas entre *C. sphaeroides* WS8N, *R. capsulatus* SB 1003, *D. shibae* DF12, *Ruegeria* sp. KLH11 y *Sinorhizobium meliloti* 1021, creado con OrthoFinder. B, Árboles filogenéticos de genes para los ortogrupos OG0309, OG0480 y OG0076, que contienen los componentes del SPQ de *C. sphaeroides*, construidos con OrthoFinder utilizando las proteínas anotadas completas de los organismos mencionados. Los identificadores de genes están coloreados en magenta, mientras que los nombres de las especies están en negro, cada uno con un código específico: *C. sphaeroides* WS8N (*C.sph*), *R. capsulatus* SB 1003 (*R.cap*), *D. shibae* DF12 (*D.shi*), *Ruegeria* sp. KLH11 (*R.KLH*) y *S. meliloti* 1021 (*S.mel*). C, Análisis de conservación de sintenia de los genes del SPQ de *C. sphaeroides* en *D. shibae*, *R. capsulatus* y *Ruegeria* sp. KLH11, utilizando el programa SyntTax. Solo el gen RSWS8N\_13935 mostró conservación de sintenia con *D. shibae* y *R. capsulatus*. Los genes homólogos se representan con flechas del mismo color, y los identificadores de genes están coloreados en negro.

## Los componentes del SPQ están involucrados en el control del TCS CckA/ChpT/CtrA

En *C. sphaeroides*, la motilidad mediada por el flagelo Fla2 depende del TCS CckA/ChpT/CtrA. Para investigar si existe una conexión entre este sistema y el SPQ, evaluamos la capacidad de nado de la cepa AM1 (que es capaz de nadar exclusivamente con el flagelo Fla2) en ausencia de los componentes del SPQ. Se aislaron mutantes individuales de estos componentes y se evaluó su capacidad de nado en placas de agar suave. Observamos que las cepas  $\Delta cerI$ ,  $\Delta cerN$  y  $\Delta cerR$  no eran capaces de nadar (Fig. 9A). La inmunodetección mediante western blot de la proteína estructural flagelar FlgE2 hizo evidente la ausencia de ésta en dichas mutantes, lo que sugiere que la expresión de los genes flagelares está controlada por el SPQ (Fig. 9B).

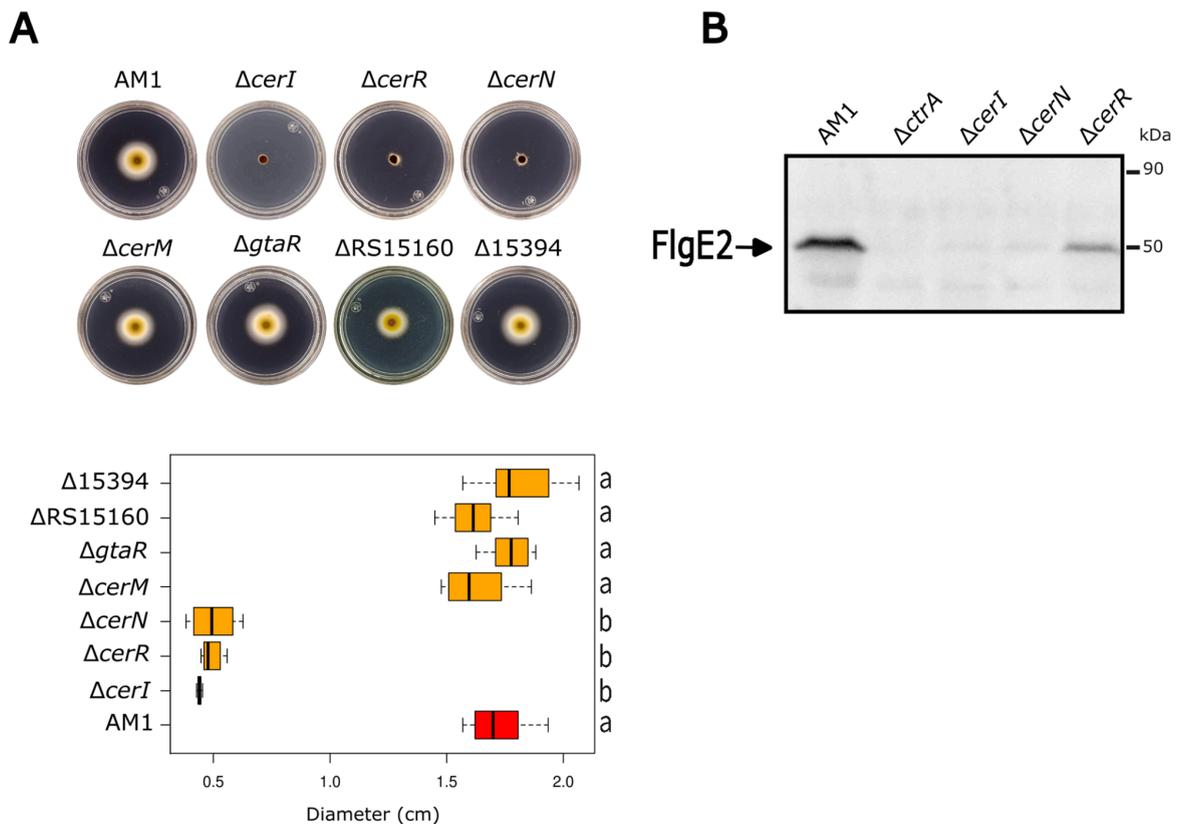


Figura 9. **Capacidad de nado de las cepas mutantes del SPQ e inmunodetección de la proteína flagelar FlgE2.** A, capacidad de nado de cepas derivadas de AM1 que llevan las mutaciones indicadas. Arriba: se inocularon placas de agar suave que contienen medio mínimo de Sistro suplementado con 0.2% de casaminoácidos y se incubaron durante 60 h bajo condiciones fotoheterotróficas. Abajo, se muestra el diámetro promedio del halo de nado de cada cepa; las mediciones se obtuvieron de al menos 30 halos de nado provenientes de tres experimentos independientes. El diámetro del halo de nado promovido por la cepa parental AM1 se muestra en rojo. La mediana está representada por la línea dentro de cada caja, y la caja muestra el rango intercuartílico que abarca el 50% central de los datos. La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido del análisis post-hoc de Tukey. Los grupos que comparten la misma letra (a, b) no presentan diferencias significativas, mientras que letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). B, análisis Western blot anti-FlgE2 de extractos celulares totales de las cepas no motiles  $\Delta cerI$ ,  $\Delta cerR$ , y  $\Delta cerN$ .

La introducción de un plásmido que expresa *cerI* o *cerN* restauró la capacidad de nado de las cepas  $\Delta cerI$  o  $\Delta cerN$ , respectivamente, lo que respalda el papel de CerI y CerN en el fenotipo de no nado (Fig. 10, grupo A). De manera inesperada, no se observó complementación cuando se introdujo a *cerR* en la cepa  $\Delta cerR$ , lo que indica que este fenotipo es causado por otra razón más allá de la pérdida de este gen. En concordancia con esta posibilidad, observamos que esta cepa fue complementada al usar el plásmido pcerOp que expresa a *cerR* y *cerI* (Fig. 10, grupo A), lo que sugiere que la inserción del cassette de resistencia *aadA* en *cerR* afectó la expresión de *cerI*. Independientemente del papel de CerR, nuestros resultados indican que CerI y CerN son necesarios para la expresión del flagelo Fla2. Cabe destacar que CerN no tiene un dominio de unión al ADN, lo que sugiere que podría funcionar a través de un mecanismo no canónico. Esta posibilidad nos llevó a investigar el fenotipo de nado de cepas doble mutantes, donde *cerN* fue inactivado junto con los otros reguladores homólogos a LuxR, estos experimentos

demonstraron que solamente CerM se encuentra involucrado en el control de la motilidad (Figura S1\_Anexo). En la figura 10 (grupo B), se observa que *cerM* es epistático a *cerN*, sugiriendo que CerM actúa como un represor del sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA, mientras que CerN funciona como un anti-represor. Además, demostramos que la introducción de *cerM* en la cepa doble mutante  $\Delta cerN \Delta cerM$  reduce su capacidad de nado a un nivel similar al de  $\Delta cerN$ , indicando que no hay otra mutación involucrada en el fenotipo observado (Fig. 10, grupo B).

También encontramos que la doble mutante  $\Delta cerI \Delta cerM$  fue capaz de nadar, a diferencia de  $\Delta cerI$ , sugiriendo que la presencia de AHL es crucial para liberar el efecto represor de CerM. Una cepa mutante supresora, aislada de los halos de nado de la cepa  $\Delta cerI$ , presentó una mutación en *cerM* que cambió el residuo Q189 por un codón de paro, produciendo una proteína trunca (Figura S2\_Anexo). La doble mutante  $\Delta cerI \Delta cerM$  replicó este fenotipo, y la introducción de *pcerM* restauró el fenotipo paralizado, confirmando que CerM tiene un efecto negativo sobre la motilidad, el cual es neutralizado por CerN y el autoinductor. Sorprendentemente, la doble mutante  $\Delta cerI \Delta cerN$  si presentó un halo de nado aunque reducido, sugiriendo que AHL y/o CerN podrían contribuir en alguna medida a estabilizar CerM o su forma represora.

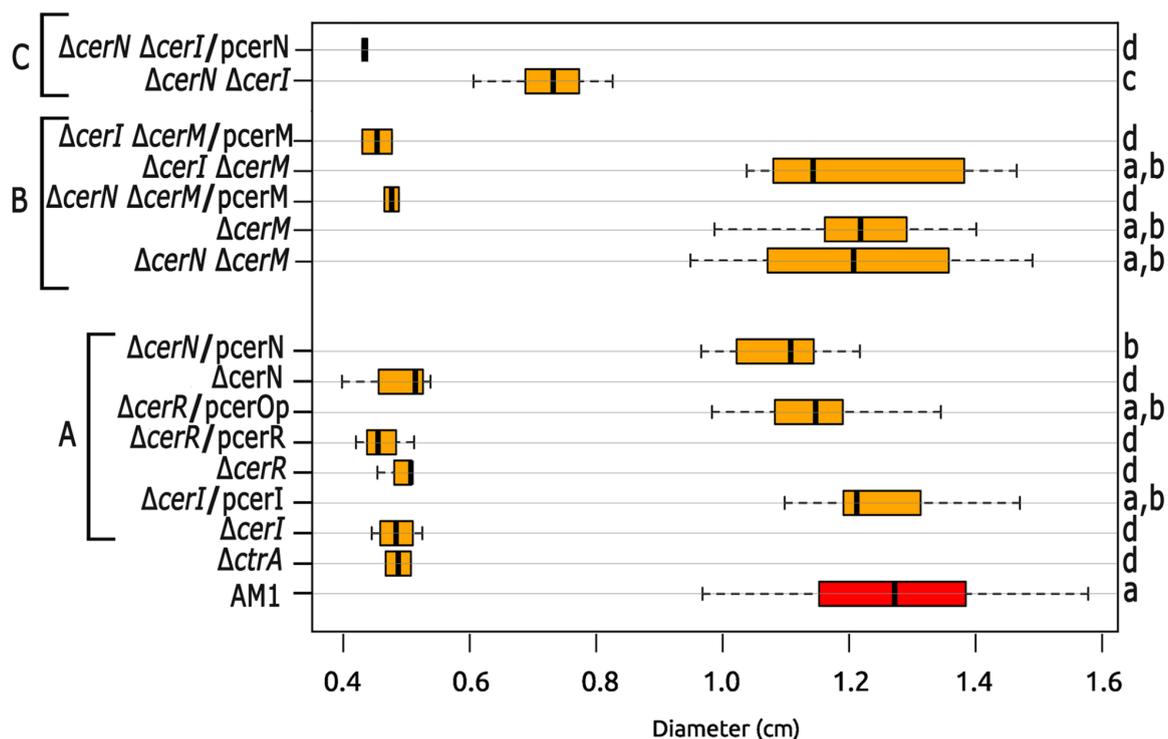


Figura 10. **Capacidad de nado de mutantes del SPQ y cepas complementadas.** Las pruebas de complementación se llevaron a cabo mediante la introducción del plásmido pRK415 que porta el gen silvestre correspondiente; la presencia del plásmido en una cepa particular se indica con una barra diagonal seguida del nombre del plásmido. Se inocularon placas de agar suave que contenían medio mínimo de Sistrom suplementado con 0.2% de casaminoácidos y se incubaron durante 48 h bajo condiciones fotoheterotróficas. Se muestra un diagrama de cajas y bigotes que representa la distribución de los diámetros de los halos de nado. El diámetro del halo de nado de la cepa parental AM1 se muestra en rojo. La mediana está representada por la línea dentro de cada caja, y la caja muestra el rango intercuartílico que abarca el 50% central de los datos. La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido del análisis post-hoc de Tukey. Los grupos que comparten la misma letra (a, b, c, d) no presentan diferencias significativas, mientras que letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

El comportamiento de nado de estas cepas mutantes podría estar determinado por la disponibilidad de CtrA; por lo tanto, determinamos el nivel de CtrA en las cepas  $\Delta cerI$ ,  $\Delta cerN$  y en la mutante supresora obtenida de  $\Delta cerI$  (SupCerI) (Figura 11). Como era de esperar, CtrA se redujo severamente en las cepas  $\Delta cerI$  y  $\Delta cerN$ . En

concordancia con el fenotipo observado, la mutante supresora recuperó un nivel de CtrA similar al observado en la AM1. La recuperación de los niveles de CtrA también se observó en las cepas complementadas  $\Delta cerI/pcerI$  y  $\Delta cerN/pcerN$ . Por el contrario, CtrA se redujo en  $SupCerI/pcerM$ .

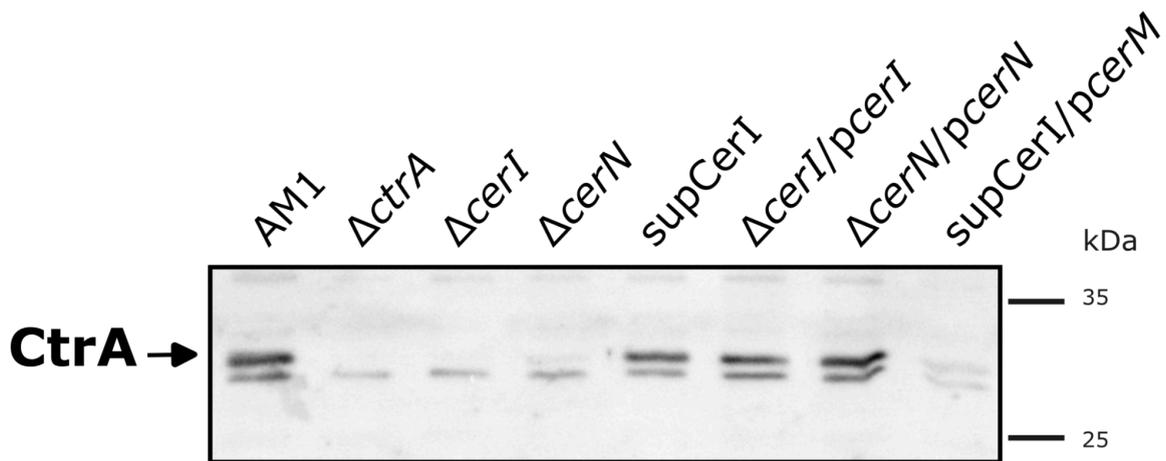


Figura 11. **Inmunodetección de CtrA en algunas cepas mutantes del SPQ.** Extractos celulares totales de los mutantes indicados fueron analizados mediante inmunoblot usando un anticuerpo anti-CtrA. [EA1 ( $\Delta ctrA::aadA$ ), JV14 ( $\Delta cerI::aadA$ ), JV17 ( $\Delta cerN::aadA$ ), JV32 ( $\Delta cerI::aadA cerMQ189amb$ )]. Se detectaron varias bandas inespecíficas en la membrana, y la identificación positiva de CtrA se llevó a cabo incluyendo un extracto celular de la cepa  $\Delta ctrA$  en el experimento. La migración de los marcadores de peso molecular se muestra a la derecha. La señal asignada a CtrA (26.7 kDa) está indicada por una flecha.

Como se mencionó anteriormente, la cepa  $\Delta cerR$  no fue complementada por el plásmido  $pcerR$ . Para definir el posible papel de CerR en la capacidad de nado de *C. sphaeroides*, se aisló un mutante con delección en  $cerR$ , evitando el uso de un casete de resistencia. Para ello, se eliminó por completo la región que contiene los genes  $cer$  involucrados en el SPQ de AM1. Luego, esta cepa fue transformada con un plásmido que contenía la región completa intacta o con una versión mutante en la que el gen  $cerR$  estaba eliminado. Como se muestra en la Figura S3\_Anexo,

ambas cepas pudieron nadar de manera similar a AM1, lo que indica que CerR no está relacionado con el control del sistema CckA/ChpT/CtrA ni es necesario para la síntesis de AHL; de lo contrario, la capacidad de nado se habría visto afectada. De acuerdo con esto, un ensayo de Western blot reveló la presencia de CtrA en ausencia de *cerR*. Además, mediante experimentos de RT-PCR, determinamos que *cerR* y *cerI* se expresan como un solo ARN mensajero, lo que explica el efecto polar del alelo  $\Delta cerR::aadA$  (cepa JV16 en la Figura 10). Los ensayos de complementación de la cepa  $\Delta cerOp$  también fueron útiles para determinar que el pequeño ORF-2, reportado entre *cerR* y *cerI*,<sup>52</sup> no tiene un papel en la capacidad de nado de AM1 (Figura S3\_Anexo).

### **Producción de autoinductor y detección de CerM en cepas mutantes del SPQ**

Para evaluar si la ausencia de CerN podría afectar negativamente la producción del autoinductor, llevamos a cabo un ensayo de complementación funcional. Este experimento determinó si las células  $\Delta cerI$  recuperaban su capacidad de nado cuando las cepas  $\Delta cerN$ ,  $\Delta cerM$  y AM1 se cultivaban en proximidad. A partir de este ensayo, se observó que el AHL producido por las cepas  $\Delta cerN$ ,  $\Delta cerM$  y AM1 promovió el nado de  $\Delta cerI$  (Figura S4\_Anexo). Por lo tanto, ni CerN ni CerM son necesarios para la síntesis de AHL.

Para caracterizar mejor estas cepas, determinamos la presencia de CerM en extractos celulares totales de las células  $\Delta cerI$  y  $\Delta cerN$  mediante Western blot. En  $\Delta cerI$  se detectó una ligera reducción de CerM en comparación con AM1, mientras que en  $\Delta cerN$  se observó una reducción notable de CerM (Figura 12). Este resultado sugiere la posibilidad de que CerM y CerN podrían interactuar,

favoreciendo así la estabilidad de CerM. Los niveles reducidos de CerM en las mutantes  $\Delta cerI$  o  $\Delta cerN$  aún son suficientes para reprimir completamente su capacidad de nado (Figura 10); sin embargo, cuando se combinan, observamos una ligera recuperación de la motilidad, lo que sugiere una mayor disminución de CerM.

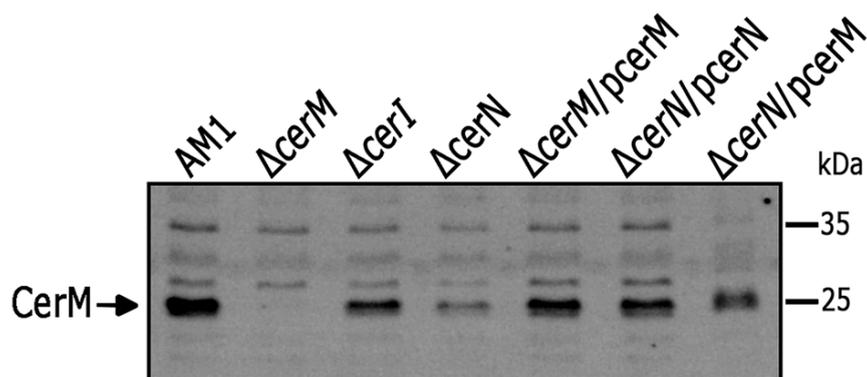


Figura 12. **Inmunodetección de CerM en las cepas  $\Delta cerI$  y  $\Delta cerN$ .** Los extractos celulares totales de los mutantes indicados fueron analizados mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-CerM. JV18 ( $\Delta cerM::aadA$ ), JV14 ( $\Delta cerI::aadA$ ), JV17 ( $\Delta cerN::aadA$ ). El antisuero contra CerM detecta varios polipéptidos inespecíficos en la membrana; la identificación positiva de CerM se realizó incluyendo un extracto celular de  $\Delta cerM$ . En esta muestra, se observó la ausencia de una única banda del tamaño esperado para CerM (22.4 kDa) en comparación con AM1. Además, la señal fue recuperada mediante la introducción del plásmido pcerM. La señal asignada a CerM está indicada por una flecha.

### **CerN interactúa con CerM en presencia de autoinductor**

El análisis fenotípico de los mutantes del SPQ sugiere que CerM y CerN podrían interactuar entre sí. Para explorar esta posibilidad, realizamos un experimento de pull-down utilizando 6xHis-CerM y GST-CerN. Los extractos celulares solubles que contenían estas proteínas se incubaron juntos, ya sea en presencia o ausencia del AHL obtenido del sobrenadante de la AM1. Es importante destacar que la presencia de AHL en dicho sobrenadante se determinó utilizando a *A. tumefaciens* NTL4

(pZLR4) como cepa reportera (Figura S5\_Anexo). Las proteínas purificadas por afinidad al glutatión se analizaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con Coomassie y Western blot. Estos experimentos revelaron que, en ausencia del autoinductor, solo se recuperó GST-CerN (Figura 13, carril E). En contraste, 6xHis-CerM se eluyó junto con GST-CerN cuando se incluyó AHL en el ensayo. No se observaron interacciones espurias entre GST y 6xHis-CerM.

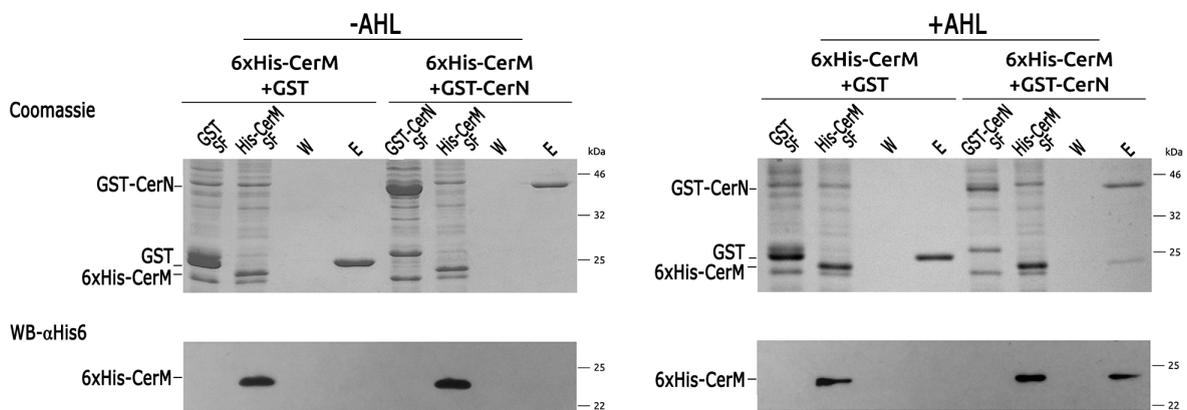


Figura 13. **Interacción entre CerM y CerN probada mediante pull-down.** Extractos solubles totales que contienen GST-CerN (40 kDa) o GST solo (29 kDa) fueron incubados con extractos solubles totales que contienen 6xHis-CerM. Se muestra una muestra de cada extracto antes de mezclarlos en presencia o ausencia de AHL. Después de la incubación, las proteínas fueron capturadas utilizando perlas de glutatión-Sepharosa, lavadas (W), y eluidas con glutatión reducido (E). Las proteínas en cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE y detectadas mediante azul brillante Coomassie R 250 o Western blot utilizando un anticuerpo anti-6xHis.

### La proteína CerM no se une a la región de control de *cckA*, *chpT* o *ctrA*

Si existe una regulación directa del SPQ sobre la expresión de *ctrA*, se esperaría que CerM pudiera unirse a su región regulatoria o probablemente a las regiones

regulatorias de *cckA* o *chpT*. Para evaluar esta posibilidad, se purificó la proteína 6xHis-CerM y se probó su interacción con dichas regiones mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Ninguna de estas regiones modificó su movilidad electroforética en presencia de 6xHis-CerM, lo que sugiere que CerM debe afectar indirectamente la expresión de *ctrA* (Figura S6\_Anexo).

### **Perfil transcriptómico de la cepa $\Delta$ cerN**

Nuestros resultados sugieren que, en ausencia de AHL y de CerN, CerM actúa indirectamente como un represor de *ctrA*; sin embargo, en presencia de AHL, CerN podría actuar como un anti-represor de CerM. Basándonos en esta propuesta, planteamos la hipótesis de que entre los genes expresados diferencialmente en presencia o ausencia de CerN, sería posible identificar el factor de transcripción responsable de controlar directamente a *ctrA*. Para ello, comparamos el perfil de expresión global de las cepas  $\Delta$ cerN/pcerM y AM1/pRK451, considerando que representan los estados reprimido y activado del SQ que afecta a CtrA. Un total de 381 genes fueron expresados diferencialmente (Figura 14). Como era de esperar, este conjunto incluye los genes previamente reportados como controlados por CtrA.<sup>63</sup> En concordancia con nuestras observaciones, se observó una fuerte regulación negativa de *ctrA* en  $\Delta$ cerN/pcerM. Después de excluir los genes conocidos como controlados por CtrA, quedaron 181 genes, de los cuales algunos podrían ser controlados directamente por CerN-CerM. Entre ellos, identificamos 8 genes que codifican factores de transcripción que están regulados positivamente en  $\Delta$ cerN/pcerM (Tabla S3\_Anexo), de los cuales 3 no afectan la expresión del Fla2 y corresponden a los homólogos de LuxR RSWS8N\_15394 y RSWS8N\_RS15160, y

el tercero es el regulador de respuesta *torR* involucrado en la expresión de una reductasa de TMAO (Figura S8\_Anexo). Además de *ctrA*, el único gen regulado negativamente codifica un putativo antirepresor de profago (RSWS8N\_18024) que probablemente controla la expresión de los genes que codifican el bacteriófago RS-Mu (Figura S7\_Anexo). Por lo tanto, hipotetizamos que el producto de uno de los otros 5 factores de transcripción restantes podría estar involucrado en el control directo de la expresión de *ctrA* (Tabla S3). Entre ellos está el regulador RSWS8N\_14710.

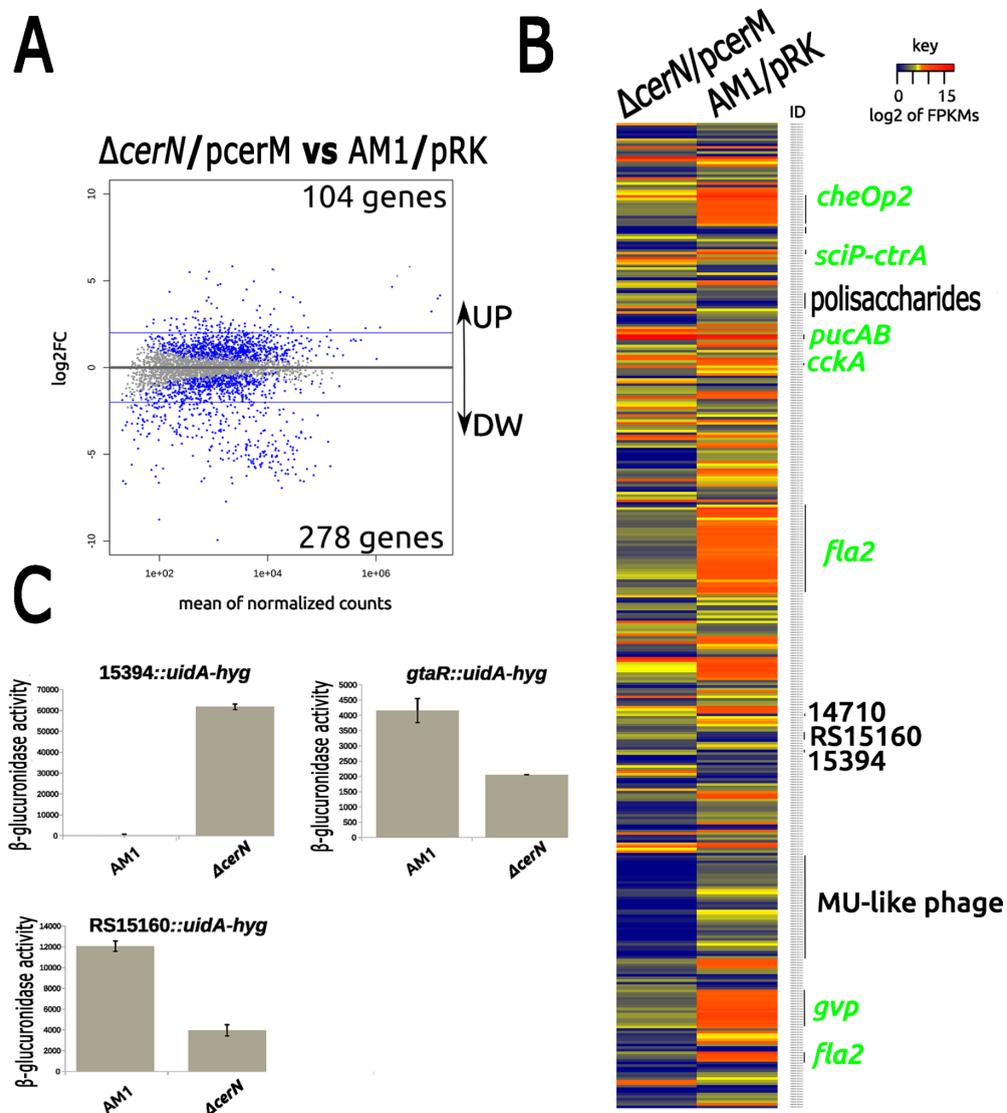


Figura 14. Análisis global de expresión correspondiente al regulón CerN-CerM. A. Gráfico MA que compara los perfiles de expresión génica global de las cepas  $\Delta cerN/pcerM$

(JV17) vs AM1/pRK415 (AM1/pRK). Cada gen está representado como un punto; el eje y representa el cambio en la expresión en escala log<sub>2</sub> (FC), y el eje x representa la media de los conteos normalizados. Las líneas paralelas al eje x representan el valor de corte para considerar un gen como regulado diferencialmente ( $\log_2FC \geq 2$  o  $\leq -2$ ). B. Mapa de calor de los genes regulados diferencialmente. Los datos de expresión de  $\Delta cerN/pcerM$  y AM1/pRK415 (AM1/pRK) se muestran para los genes diferencialmente expresados (DE) como valores log<sub>2</sub>FPKM. La barra de color representa el nivel de expresión en escala log<sub>2</sub>. A la derecha de la columna de AM1, se anotan genes seleccionados para resaltar su patrón de regulación. En verde se indican los genes del regulón de CtrA; en negro, los genes regulados por CerM-CerN. C. Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa promovida por fusiones transcripcionales del gen reportero *uidA* con tres genes presuntamente regulados por CerN-CerM. Estas fusiones fueron colocadas cromosómicamente en las cepas AM1 o  $\Delta cerN/pcerM$ . La actividad se expresa como pmoles de metilumbeliferona min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. Se muestran las desviaciones estándar de tres ensayos independientes.

### Identificación del sitio de unión de CerM

Para identificar los genes que podrían ser controlados directamente por CerM, nos propusimos identificar el posible sitio de unión para esta proteína. Para ello se realizó una búsqueda de motivos con el programa MEME en las 105 regiones regulatorias que corresponden a las regiones promotoras de los 181 genes diferencialmente expresados, pero no se encontró ningún motivo confiable. Para resolver este problema, buscamos un motivo similar al sitio de unión de GtaR (Figura S9\_Anexo) en dichas regiones, ya que este regulador parece ser un parálogo de CerM y ambos podrían reconocer sitios similares. Esta búsqueda reveló un motivo presente en *gtaR* y en otras 10 regiones regulatorias (Tabla S4\_Anexo). Para obtener evidencia sobre la funcionalidad de estos sitios, evaluamos la posible interacción de CerM con cinco de ellos. Observamos que los fragmentos de ADN correspondientes a las regiones regulatorias de RSWS8N\_14710 (factor de transcripción, Log<sub>2</sub>FC=5), RSWS8N\_17824 (factor de traducción, Log<sub>2</sub>FC=2.7),

RSWS8N\_07465 (factor de traducción, Log2FC=3.8), RSWS8N\_15394 (regulador LuxR, Log2FC=5.4), y *gtaR* (regulador LuxR, Log2FC=1.6) experimentaron un cambio de movilidad en presencia de CerM (Figura 15). La región promotora de *sciP* y un fragmento interno de *cckA* se incluyeron como controles negativos.

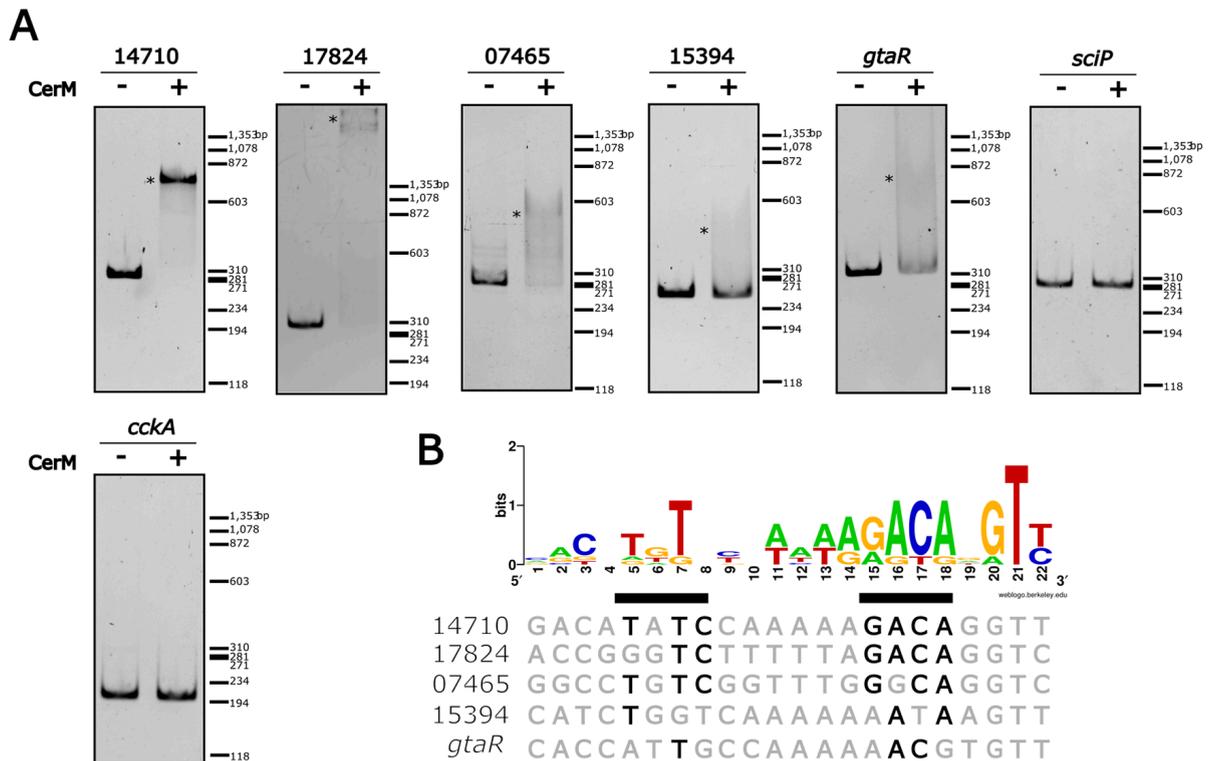
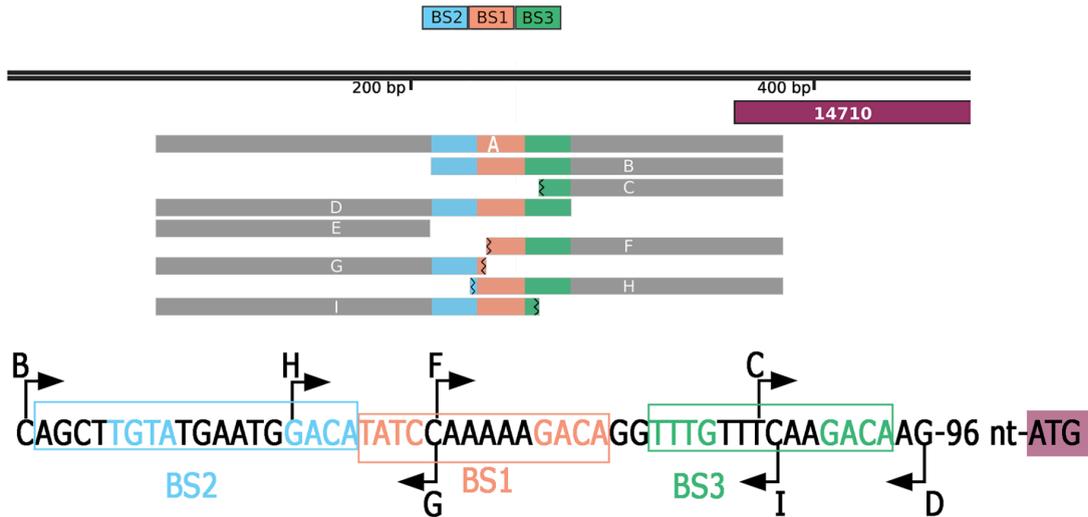


Figura 15. **Identificación del sitio de unión de CerM.** A. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA) de las regiones regulatorias indicadas en ausencia o presencia de CerM. Las reacciones incluyeron 200 ng de His6X-CerM (+), o sin la proteína (-). Un asterisco indica la migración del complejo CerM-ADN. La región reguladora de *sciP* y un fragmento de la región codificante de *cckA* se utilizaron como controles negativos. Los tamaños de los fragmentos son: 14710, 310 pb; 17824, 306 pb; 07465, 323 pb; 15394, 249 pb; *gtaR*, 337 pb; *sciP*, 303 pb; *cckA*, 239 pb. La migración de los estándares de tamaño de ADN HaellI-PhiX174 se muestra a la derecha. B. Secuencia LOGO del sitio de unión putativo de CerM obtenida a partir de la alineación de las secuencias de los fragmentos retardados. Los nucleótidos similares a la secuencia LOGO se muestran en negritas.

## **Mapeo del sitio de unión de CerM**

El alineamiento de las secuencias que interactúan con CerM reveló un motivo conservado, TNT(N5)AAGACA(N2)T, similar al sitio de unión de GtaR, que podría representar el sitio de unión de CerM (MBS) (Figura 15B). Para definir de forma precisa la región de ADN que interacciona con CerM, llevamos a cabo un análisis de delección de la región regulatoria de RSWS8N\_14710, empezando con la región de 300 pb probada en el experimento mostrado en la Figura 15. Esta región fue seleccionada porque en este ensayo forma un complejo estable con CerM. Observamos que se formaron dos complejos con una baja concentración de CerM (50 ng), mientras que a mayor concentración (200 ng), predominó el complejo de migración lenta (Figura 16, fragmento A). Estos complejos no se vieron afectados por ADN no específico, lo que indica al menos dos sitios de unión a CerM con diferentes afinidades (Figura 16C). Eliminar 130 pb de la región río arriba del fragmento A no afectó la unión de CerM, pero una eliminación adicional de 41 pb si lo hizo (Figura 16, fragmentos B y C), lo que sugiere que el sitio de unión de CerM se encuentra dentro de esta región de 41 pb. La región A contiene las secuencias TwTm(N6)GAC (BS2, BS1) y TwTg(N6)GAC (BS3), similares al MBS propuesto. El fragmento que contiene BS2 y BS1 (I) mostró un patrón de migración con dos complejos, mientras que el fragmento con BS3 y BS1 (H) mostró solo un complejo. Los fragmentos que carecían de BS1 no mostraron cambio de movilidad con CerM (Figura 16, fragmentos F y G), lo que sugiere que BS2 se une a CerM solo en presencia de BS1.

A



B

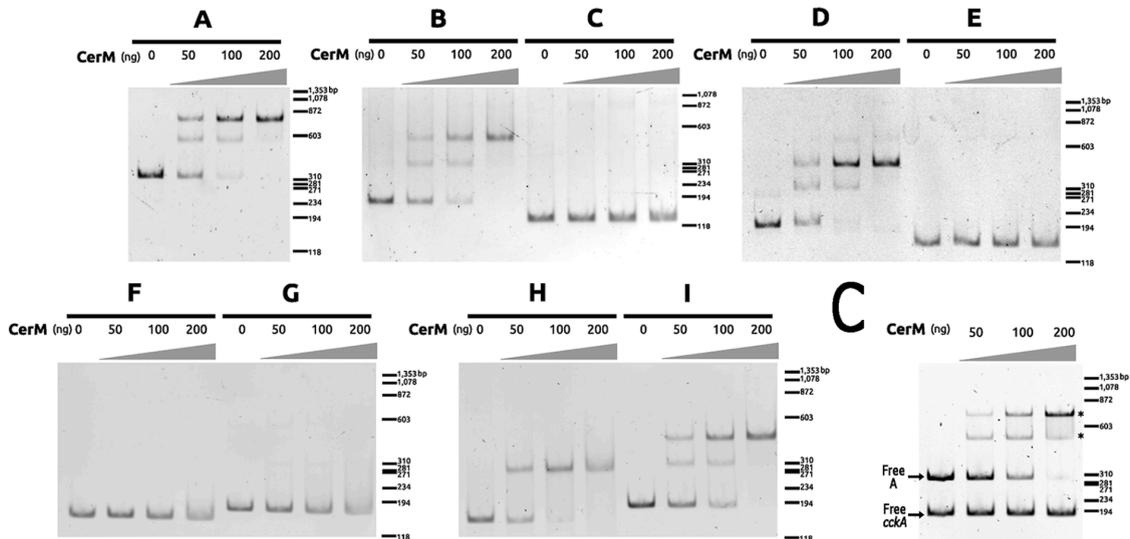


Figura 16. Mapeo del sitio de unión de CerM (MBS) en la región regulatoria de RSWs8N\_14710. A. Una línea horizontal doble representa la región codificante incompleta de RSWs8N\_14710 y 286 pb de su región de control; la escala de tamaño se indica en esta barra. Debajo, un rectángulo morado indica la ubicación de la región de RSWs8N\_14710. Los fragmentos de PCR probados por EMSA se representan como rectángulos grises y están etiquetados de la A a la I. Los posibles sitios de unión de CerM (MBS) se indican con recuadros de color azul, naranja y verde. Un MBS incompleto se representa con una línea discontinua en los recuadros de color. Debajo, se muestra un acercamiento de la región donde se encuentran estos sitios, y los tres MBS putativos están encerrados en rectángulos. Los nucleótidos en color coinciden con los residuos más conservados de los MBS putativos.

B. Ensayos de movilidad electroforética de los fragmentos de ADN indicados en la parte superior de cada gel, desde A hasta I. En estos experimentos, se añadieron cantidades crecientes de His6X-CerM, como se indica. La migración de los estándares de peso molecular se muestra a la izquierda de cada gel. C. Ensayo de movilidad electroforética usando dos fragmentos de ADN simultáneamente: uno es el fragmento de ADN A de RSWS8N\_14710, y el otro es un control negativo correspondiente a una región codificante de *cckA*. Estos fragmentos se mezclaron e incubaron en presencia de cantidades crecientes de His6X-CerM. Los complejos CerM-ADN están indicados por un asterisco.

### **CerN, en presencia de AHL, interfiere con la capacidad de CerM para unirse al ADN**

Para evaluar si CerN y/o AHL afectan la interacción de CerM con su sitio de unión, preincubamos estos componentes con CerM antes de probar su interacción con la región de control de 310 pb de RSWS8N\_14710. Utilizando una alta concentración de CerM (200 ng), se realizaron dos experimentos. En uno se usó AHL obtenido del sobrenadante de la cepa AM1 (Fig. 17A), mientras que en el otro se utilizó el análogo sintético 3OH-C14-HSL (Fig. 17B). Los resultados mostraron que el AHL del medio de AM1 debilitó la unión de CerM a su sitio, aumentando la presencia del complejo de migración rápida y el ADN libre (Fig. 17A). CerN por sí mismo no afectó el complejo CerM-ADN en ausencia de AHL; sin embargo, cuando se incluyeron AHL y CerN, se observó una cantidad significativa de ADN libre, lo que sugiere que ambos contribuyen a debilitar la interacción CerM-ADN. Se observó una tendencia similar con CerN y 3OH-C14-HSL, aunque los efectos fueron menos pronunciados que con el sobrenadante de AM1. Los ensayos de control confirmaron que CerN no puede unirse al ADN con o sin AHL (Figura S10 \_Anexo). Curiosamente, la combinación de AHL del sobrenadante y CerN causó un barrido visible encima del

complejo de migración lenta, lo que podría corresponder a un complejo formado por CerM-CerN-AHL-ADN.

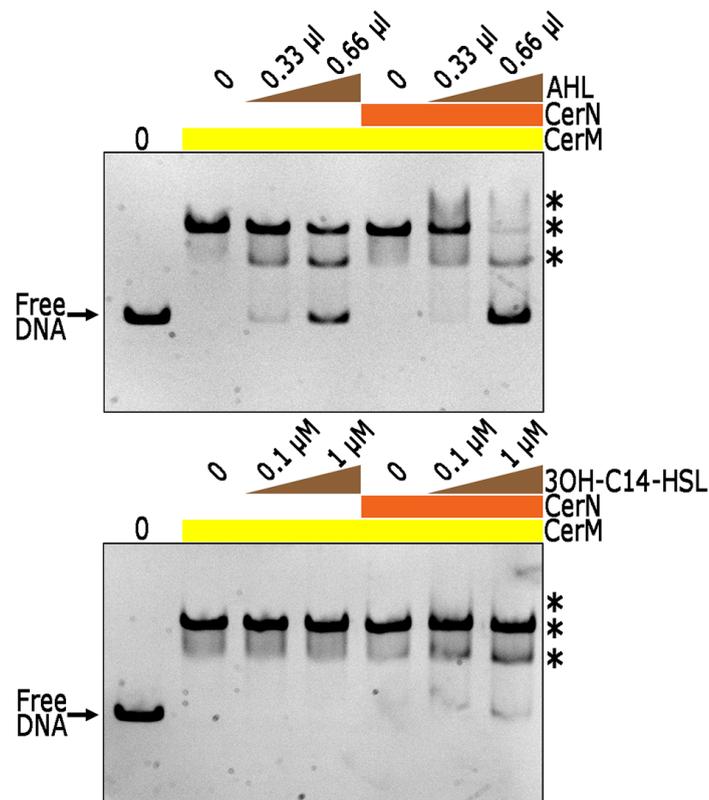


Figura 17. **Efecto de CerM y AHLs en la unión de CerM con su ADN blanco.** Para ambos ensayos EMSA, se utilizó la región de control de 310 pb de RSWS8N\_14710. La presencia de CerM (200 ng) en la reacción está indicada con una barra horizontal amarilla. La inclusión de una cantidad equimolar de CerN está indicada con una barra horizontal naranja. La adición creciente de C14-HSL obtenido del sobrenadante de AM1 (A) o 3OH-C14-HSL (B) se representa con un triángulo café.

Para respaldar la idea de que CerN reduce la capacidad de CerM para unirse a su sitio de reconocimiento en presencia de AHL, evaluamos la actividad transcripcional del gen reportero *lacZ* controlado por un promotor artificial que incluye el MBS propuesto (TATCCAAAAGACA) entre las secuencias consenso -35 (TTGACA) y -10 (TATAAT) (Fig. 18A). Este plásmido se introdujo en *Escherichia coli* MC4100, la cual fue transformada posteriormente con un plásmido que expresa CerM, CerN o



plásmido. Los datos representan la media  $\pm$  DE (desviación estándar). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido del análisis post-hoc de Tukey. Los grupos que comparten la misma letra (a, b, c) no presentan diferencias significativas, mientras que letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

### **Papel de RSWS8N\_14710 en el control de la expresión de *ctrA***

Nuestros resultados indican que CerM reduce indirectamente la expresión de CtrA, lo que sugiere la participación de un factor de transcripción desconocido. Los experimentos de RNA-seq revelaron que CerM-CerN controlan la expresión de varios genes que codifican factores de transcripción. Sin embargo, solo tres de estos genes tienen un posible MBS en su región de control y son reconocidos por CerM in vitro: *gtaR*, RSWS8N\_14710 y RSWS8N\_17824. Dado que GtaR no afecta la expresión del Fla2, consideramos que los productos de los otros dos genes podrían estar involucrados en el control de *ctrA*.

Basándonos en la mejor puntuación de su MBS, en su mayor log<sub>2</sub>FC tras el análisis de expresión diferencial y la estabilidad del complejo MBS-CerM observada en el ensayo de retardo, probamos si el producto de RSWS8N\_14710 interconecta el sistema SPQ con CtrA. Este gen codifica a un regulador transcripcional que contiene un dominio de unión a ADN tipo HTH (hélice-giro-hélice) de la familia XRE (Elemento de Respuesta Xenobiótica). Para esto, aislamos la cepa  $\Delta cerN$   $\Delta RSWS8N_14710$  y evaluamos su capacidad de nadar. A diferencia de  $\Delta cerN$ , esta cepa fue capaz de nadar (Fig. 19), lo que implica que el TCS CckA/ChpT/CtrA está activo. Este resultado sugiere que el factor de transcripción codificado por RSWS8N\_14710 podría controlar de forma directa la expresión de *ctrA* en respuesta

al estado del SPQ. Queda por determinar si el producto de RSWS8N\_17824 también participa en esta regulación.

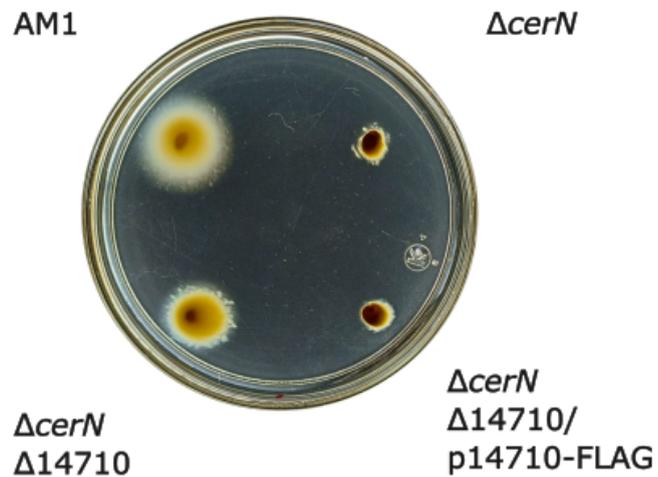


Figura 19. **Capacidad de nado del doble mutante  $\Delta cerN$  14710::*aadA* y de la cepa complementada  $\Delta cerN$  14710::*aadA*/p14710.** Placas de agar suave que contenían medio mínimo de Sistrom suplementado con 0.2% de casaminoácidos fueron inoculadas con las cepas indicadas e incubadas durante 60 h bajo condiciones fotoheterotróficas. JV18 ( $\Delta cerN$ ::Hyg), JV33 ( $\Delta cerN$ ::Hyg 14710::*aadA*).

## Discusión

La caracterización de los SPQ se ha enfocado principalmente en  $\gamma$ -proteobacterias, especialmente en bacterias patógenas, lo que ha limitado nuestro conocimiento sobre estos sistemas en otros grupos bacterianos, como las  $\alpha$ -proteobacterias, que incluyen organismos de importancia ecológica, biotecnológica y médica.

*C. sphaeroides*, un organismo modelo en el estudio de la fotosíntesis bacteriana y la motilidad, ha demostrado ser de relevancia biotecnológica por la producción de ciertos compuestos celulares, como el polihidroxiбутirato (PHB) y el hidrógeno gaseoso, procesos que parecen estar, al menos en parte, controlados por su SPQ.

En este trabajo, llevamos a cabo una identificación exhaustiva de los componentes del SPQ en *C. sphaeroides*, identificando homólogos de LuxR y LuxI de *A. fischeri* y determinando cuáles de estos podrían estar involucrados en el control del sistema de dos componentes (TCS) CckA/ChpT/CtrA, utilizando la motilidad flagelar Fla2 como indicador del estado del TCS. A través de este enfoque, identificamos dos nuevos componentes del SPQ de *C. sphaeroides*, CerM y CerN, que regulan el TCS CckA/ChpT/CtrA en respuesta a la AHL sintetizada por CerI (Figura 20).

Observamos que, en ausencia de CerI o CerN, la motilidad se reducía significativamente; sin embargo, la ausencia de CerM restauraba el fenotipo de motilidad parental en las mutantes simples *cerN* y *cerI*, lo que indica que, en ausencia de AHL, CerM actúa como un regulador negativo. Como era de esperarse, este fenotipo de motilidad reflejaba los niveles de CtrA en estas cepas. Ninguno de

los otros tres homólogos de LuxR fue esencial para mantener la motilidad o contrarrestar el efecto negativo de CerM, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar involucradas en la regulación de otra respuesta fisiológica de *C. sphaeroides* o que su función podría estar relacionada con la afinación del SPQ.

Demostramos además que CerM y CerN interactúan de manera dependiente del AHL, lo que sugiere que CerN podría ejercer su función a través de una interacción condicional con CerM. Este hallazgo clarifica cómo una proteína sin un dominio de unión a ADN puede influir en el control de la expresión génica y ofrece una explicación molecular para los fenotipos observados en las cepas mutantes analizadas en este estudio. Dado que CerM no interactuó con las regiones reguladoras de *cckA*, *chpT* o *ctrA*, asumimos que su control es indirecto. Esto es similar a lo observado en *Ruegeria sp.* KLH11, donde el SPQ regula a *ctrA* de forma indirecta, y posiblemente también en *D. shibae* y *R. capsulatus*, donde aún no se ha demostrado la regulación directa de sus SPQ sobre *ctrA*.

Para identificar los genes regulados por CerM/CerN, se realizó un perfil global de expresión de las cepas  $\Delta cerN/pRK\_cerM$  y AM1/pRK415. El análisis de los genes diferencialmente expresados (DE) entre estas cepas corroboró una expresión reducida de *ctrA* y la consecuente alteración del regulón CtrA. Es importante destacar que 181 genes fueron regulados exclusivamente por CerM/CerN, incluidos genes involucrados en la síntesis de polisacáridos, protección contra el estrés oxidativo, y 9 posibles factores de transcripción además de *ctrA*. Dentro de este subconjunto de genes, uno codifica un posible antirrepresor de profago, ubicado inmediatamente río arriba de un gran clúster que codifica un profago tipo Mu. Los

genes de este clúster se encontraron reprimidos en la cepa  $\Delta cerN/pRK\_cerM$ , reflejando la disminución del antirrepresor de profago putativo. Por lo tanto, este factor de transcripción podría controlar específicamente los genes del profago tipo Mu. Curiosamente, los homólogos de LuxR RSWS8N\_15394, RSWS8N\_RS16160 y *gtaR* están incluidos entre los factores de transcripción controlados por CerM/CerN, lo que denota un patrón jerárquico de expresión que sitúa a CerM/CerN en un nivel superior, interconectando además a los componentes de su SPQ.

El análisis de las regiones regulatorias de los genes diferencialmente expresados reveló la presencia de un posible sitio de unión de CerM (MBS) en 9 regiones, lo que sugiere que CerM regula directamente solo unos pocos genes. Sin embargo, sigue existiendo la posibilidad de que no todos los sitios que reconoce CerM puedan ser descritos por la matriz de peso posicional utilizada para descubrir los posibles MBS, que describe el sitio de unión de su posible parólogo GtaR. Por lo tanto, un enfoque más directo para identificar estos sitios de unión debe emplearse en experimentos futuros.

Considerando la información recopilada para los 9 factores de transcripción controlados por CerM/CerN, inferimos que solo 5 de ellos podrían estar involucrados en el control del TCS CckA/ChpT/CtrA. De estos, únicamente RSWS8N\_14710 y RSWS8N\_17824 tienen una región promotora que interactúa con CerM. La doble mutante  $\Delta cerN \Delta RSWS8N\_14710$  fue capaz de nadar, lo que respalda la idea de que el factor de transcripción codificado por este gen podría regular directamente la expresión de *ctrA* (Figura 20). Se están realizando más experimentos para demostrar esta posibilidad y evaluar el posible papel de RSWS8N\_17824.

Nuestros resultados mostraron que la región reguladora de RSWS8N\_14710 contiene al menos dos sitios MBS, BS1 y BS2. La ocupación de BS2 aparentemente requiere la presencia de CerM interactuando con BS1. Un fragmento de ADN que contiene BS1 se une a CerM *in vitro* e *in vivo*, apoyando la idea de que una vez que CerM interactúa con BS1, las interacciones proteína-proteína favorecen la unión a BS2. Evidencia adicional que analice estos sitios y mida su afinidad por CerM ayudaría a desarrollar un modelo que explique esta aparente cooperatividad.

Proponemos un modelo en el cual CerM se une a su sitio de reconocimiento en ausencia de AHL para regular la expresión de genes, y CerN-AHL antagoniza esta interacción (Figura 20). CerM recuerda el caso de los reguladores ExpR y EsaR, los cuales en ausencia de AHL (apoproteína) se asocian al ADN para reprimir o activar la expresión de sus genes blanco. Sin embargo, CerM no conserva las características de estructura primaria, como un linker largo entre los dominios de unión a AHL y de unión a ADN y un carboxilo extendido, por lo que no podría agruparse en la misma familia de reguladores.

Adicionalmente, notamos en los ensayos de movilidad electroforética que el AHL interfiere con la unión de CerM, aunque en menor medida que en presencia de CerN-AHL, lo que sugiere que una alta concentración de autoinductor podría afectar directamente a CerM y desestabilizar el complejo ADN-CerM. En este sentido, es importante destacar que *in vivo*, una cepa  $\Delta cerN$  que es capaz de producir AHL solo recupera la expresión de *ctrA*, y consecuentemente la capacidad de nadar, cuando una segunda mutación inactiva a *cerM*, lo que indica que *in vivo* la AHL por sí sola

no alivia el efecto inhibitorio de CerM. Estos resultados opuestos podrían explicarse si el nivel intracelular de AHL no alcanza la concentración crítica para desestabilizar los complejos CerM-ADN.

El control negativo de CerN sobre CerM recuerda la inhibición del homólogo de LuxR TraR mediada por TrIR en *A. tumefaciens*; en este caso, TrIR es una versión truncada de TraR que carece del dominio de unión a ADN. El complejo TrIR-AHL se une a TraR-AHL formando un complejo inactivo que no puede unirse al ADN. TrIR es muy similar a TraR (88% de identidad). En contraste, CerM y CerN muestran solo un 31% de identidad, lo que sugiere que CerN es una duplicación antigua o una rápida divergencia de secuencia. Los cambios conformacionales de CerM y CerN al unirse al AHL podrían afectar la afinidad de estas proteínas para formar homodímeros o heterodímeros. Similar al caso de TraR y TrIR, la posible formación de heterodímeros entre CerM y CerN en presencia de AHL podría no solo influir en la afinidad de CerM por el ADN, si no también en otros parámetros, como su estabilidad.

Aunque en ambos sistemas existen reguladores LuxR trancos que regulan a reguladores LuxR completos de manera dependiente de AHL, es importante destacar que, mientras que TraR requiere AHL para unirse al ADN, CerM no lo necesita.

Desde un punto de vista general, fue sorprendente que CerR, el primer regulador de LuxR identificado en *C. sphaeroides*, no esté involucrado en el control del TCS CckA/ChpT/CtrA, especialmente porque *cerR* forma parte del mismo operón del cual

se expresa *cerI*. CerR se caracterizó en la cepa 2.4.1 de *C. sphaeroides* y se informó que en respuesta a AHL previene la agregación celular. En contraste, este fenotipo no se observó en WS8N. Esta discrepancia probablemente se deba a diferencias genéticas entre estas cepas. Dado que ambas cepas comparten los mismos genes relacionados con el SPQ, estos cambios deberían ser sutiles.

Otro aspecto sorprendente del SPQ de *C. sphaeroides* es la retención de *gtaR* y la pérdida de *gtaI* en comparación con su contraparte en *R. capsulatus*. En *R. capsulatus*, la AHL sintetizada por GtaI (C16-AHL) alivia el efecto negativo que GtaR ejerce sobre dos blancos: *gafA* y *gtaR*. Además, GtaR de *R. capsulatus*, afecta negativamente la expresión de CtrA a través de un mecanismo que aún no se ha aclarado. La razón por la cual *C. sphaeroides* conservó *gtaR* y no *gtaI* podría estar relacionada con la posible intercomunicación de esta bacteria con otras especies que comparten su nicho ambiental, permitiendo que GtaR responda a AHL exógenas. Alternativamente, si GtaR se une a la AHL sintetizada por CerI, GtaR podría tener un papel especializado en la respuesta de quórum de *C. sphaeroides*.

Como se mencionó anteriormente, el control de la motilidad en las  $\alpha$ -proteobacterias está mediado predominantemente por CtrA, lo que nos lleva a cuestionar si el control del SPQ sobre CtrA y en consecuencia sobre el nado, observado en las Rhodobacterales previamente mencionadas, incluido *C. sphaeroides*, representa un mecanismo de regulación conservado en dichos clados.

Específicamente, resulta notable que CerN y CerM parecen estar conservados de manera exclusiva dentro del género *Cereibacter*, mientras que GtaR está

ampliamente distribuido en el orden Rhodobacterales (datos no mostrados). Por lo tanto, si el control del SPQ sobre CtrA está efectivamente conservado, es probable que la vía regulatoria que medie este control no lo esté. Queda por explorar la conservación del resto de los componentes del SPQ de esta bacteria, así como del factor transcripcional RSWS8N\_14710, que parece ser el vínculo del SPQ y CtrA.

Es importante mencionar que el presente estudio no considera el posible control que el SPQ podría ejercer sobre el sistema flagelar Fla1, el cual fue adquirido mediante un evento de transferencia horizontal y que ejerce un fuerte control negativo sobre el sistema flagelar endógeno Fla2. Por lo tanto, sería necesario profundizar en el estudio del SPQ tanto en un fondo silvestre WS8N como en un fondo Fla2-.

Como se mencionó anteriormente, existen SPQ que afectan la actividad de sistemas de dos componentes. Un ejemplo es el sistema AinS-AinR de *A. fischeri*, en el cual la AHL producida por AinS interactúa directamente con la cinasa de histidina AinR, inhibiendo su actividad cinasa y, como consecuencia, afectando la fosforilación de su regulador de respuesta y, finalmente, la expresión génica. Nuestros resultados indican que en el caso de *C. sphaeroides*, el control del SPQ se ejerce sobre la expresión del regulador de respuesta CtrA, lo cual también parece observarse en las otras Rhodobacterales estudiadas. Queda por determinar si el mismo control se ejerce sobre la cinasa CckA o la fosfotransferasa ChpT, o si pudiese existir algún mecanismo adicional que module la fosforilación del sistema, por ejemplo, a través de CckA.

Finalmente, el presente trabajo se limitó únicamente a identificar y estudiar componentes del SPQ homólogos a LuxR y LuxI de *A. fischeri*. Por lo tanto, sería importante buscar e identificar homólogos de otros sistemas de percepción de quórum, como el SPQ inter-especie del autoinductor 2 (AI-2), así como tratar de identificar nuevos SPQ. [OBJ]

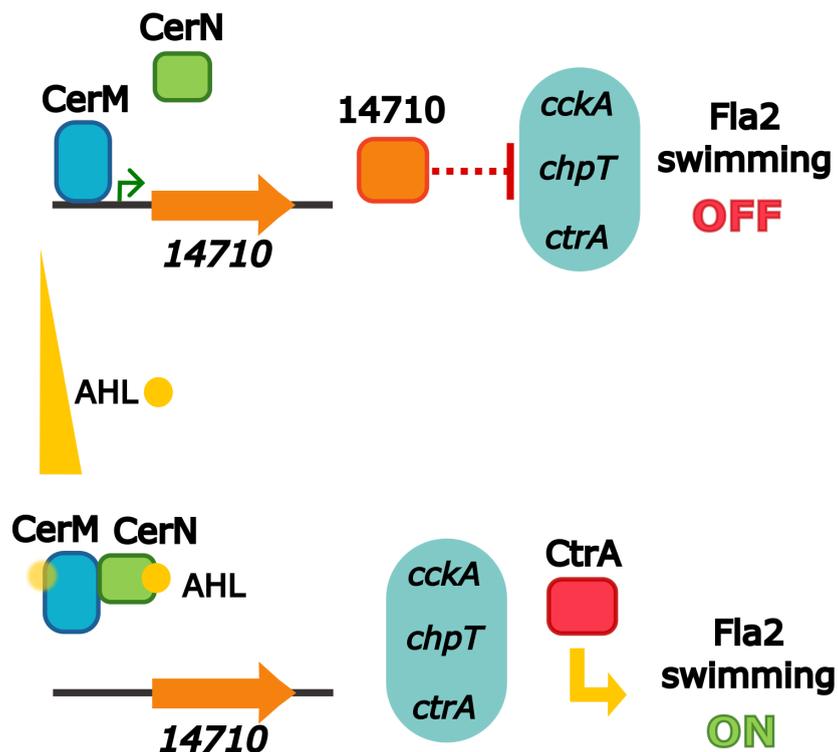


Figura 20. **Modelo de regulación del SPQ sobre la activación del TCS CckA/ChpT/CtrA y la motilidad flagelar Fla2 en *C. sphaeroides*.** En ausencia de autoinductor (AHL), CerM se une al promotor de 14710, activando su expresión. 14710 parece reprimir al TCS CckA/ChpT/CtrA, apagando la motilidad mediada por el flagelo Fla2 (estado apagado 'OFF'). Cuando los niveles de AHL aumentan, CerM y CerN interactúan, liberando a CerM del ADN y regulando a la baja la expresión de 14710. En este estado CtrA se expresa, lo que activa el nado con el flagelo Fla2 (estado encendido 'ON').

## Conclusiones

El SPQ en *C. sphaeroides* está compuesto por cinco reguladores LuxR completos, un regulador LuxR trunco y una única sintasa de autoinductor homóloga a LuxI. CerM y CerN controlan la expresión de CtrA, y, por lo tanto, la motilidad del flagelo Fla2 en respuesta al AHL sintetizado por CerI.

En ausencia de autoinductor, CerM se asocia al ADN para regular la expresión de sus genes blanco. Sin embargo, en presencia de AHL, CerN interactúa con CerM, desplazándolo del ADN y antagonizando su actividad.

El SPQ regula la expresión de CtrA de manera indirecta, lo cual es consistente con las observaciones hechas en otras Rhodobacterales, como *Ruegeria sp.* KLH11 y *D. shibae*. El vínculo entre el SPQ y CtrA podría estar mediado por el regulador transcripcional RSWS8N\_14710 (Figura 20).

## Anexo

### Figuras suplementarias

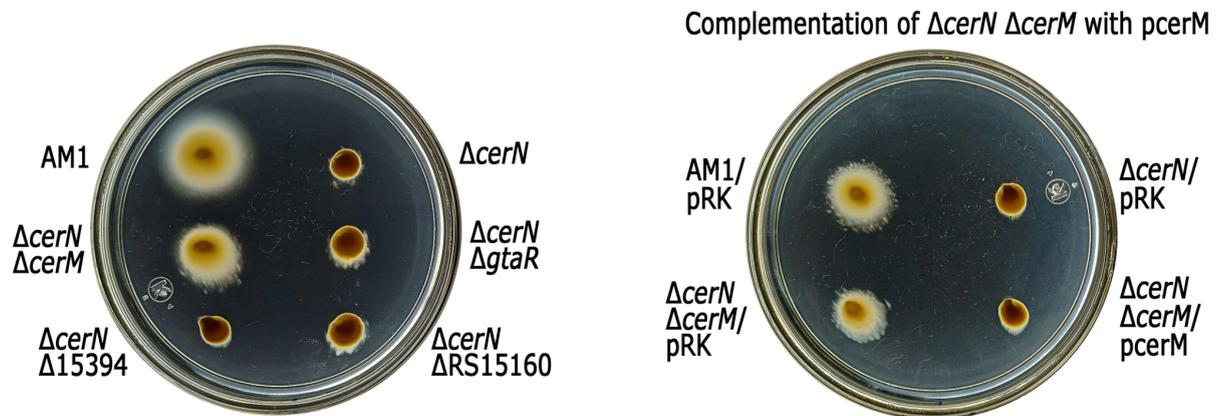


Figura S1. **Papel de los homólogos de LuxR en el comportamiento de nado de la cepa JV18 ( $\Delta cerN::Hyg$ ).** A la izquierda de la figura, una placa de agar suave que contiene medio mínimo de Sistrom suplementado con 0.2% de casaminoácidos fue inoculada con las cepas indicadas y se incubó durante 60 horas en condiciones fotoheterotróficas. Las cepas utilizadas fueron:  $\Delta cerN$  (JV18  $\Delta cerN::Hyg$ ),  $\Delta cerN \Delta cerM$  (JV20  $\Delta cerN::Hyg \Delta cerM$ ),  $\Delta cerN \Delta gtaR$  (JV29  $\Delta cerN::aadA \Delta gtaR::uidA-aadA$ ),  $\Delta cerN \Delta 15394$  (JV31  $\Delta cerN::aadA \Delta 15394::uidA-Hyg$ ), y  $\Delta cerN \Delta RS15160$  (JV30  $\Delta cerN::aadA \Delta RS15160::uidA-Hyg$ ). A la derecha, se muestra una placa de agar suave de la cepa complementada  $\Delta cerN \Delta cerM$  (JV20  $\Delta cerN::Hyg \Delta cerM$ ) con el plásmido  $pcerM$ . Se incluyeron como controles la cepa AM1,  $\Delta cerN$  (JV18  $\Delta cerN::Hyg$ ) y  $\Delta cerN \Delta cerM$  (JV20  $\Delta cerN::Hyg \Delta cerM$ ) que portaban el vector vacío pRK415 (etiquetado como pRK).

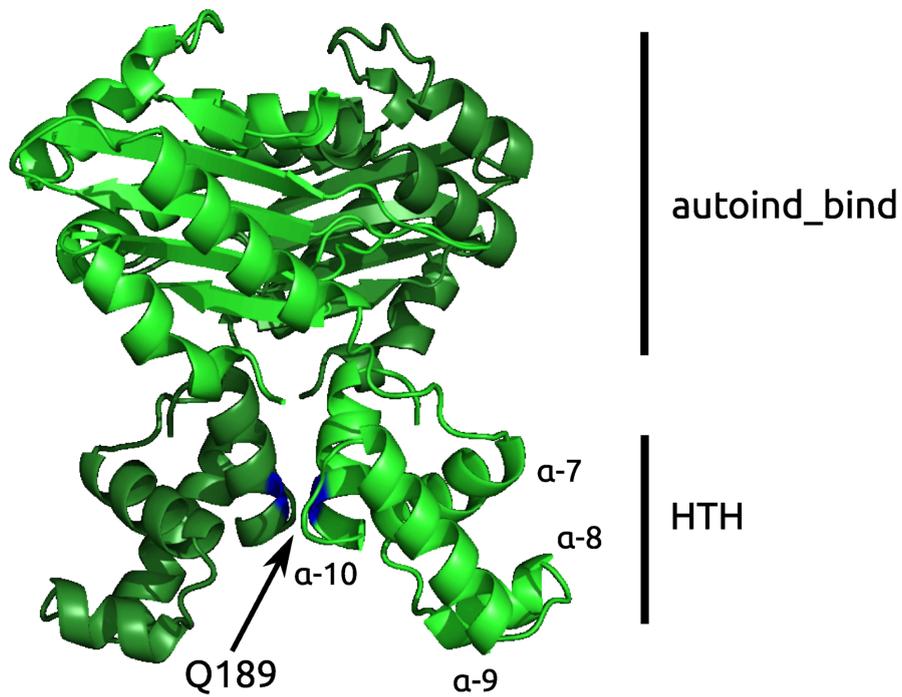


Figura S2. Representación de la estructura dimérica de CerM predicha por AlphaFold 2. Se indican el dominio de unión al autoinductor (autoind-bind) y el dominio de unión a ADN (HTH). El residuo de glutamina 189 (Q189), que está mutado en la cepa Supcer1, se muestra en azul.

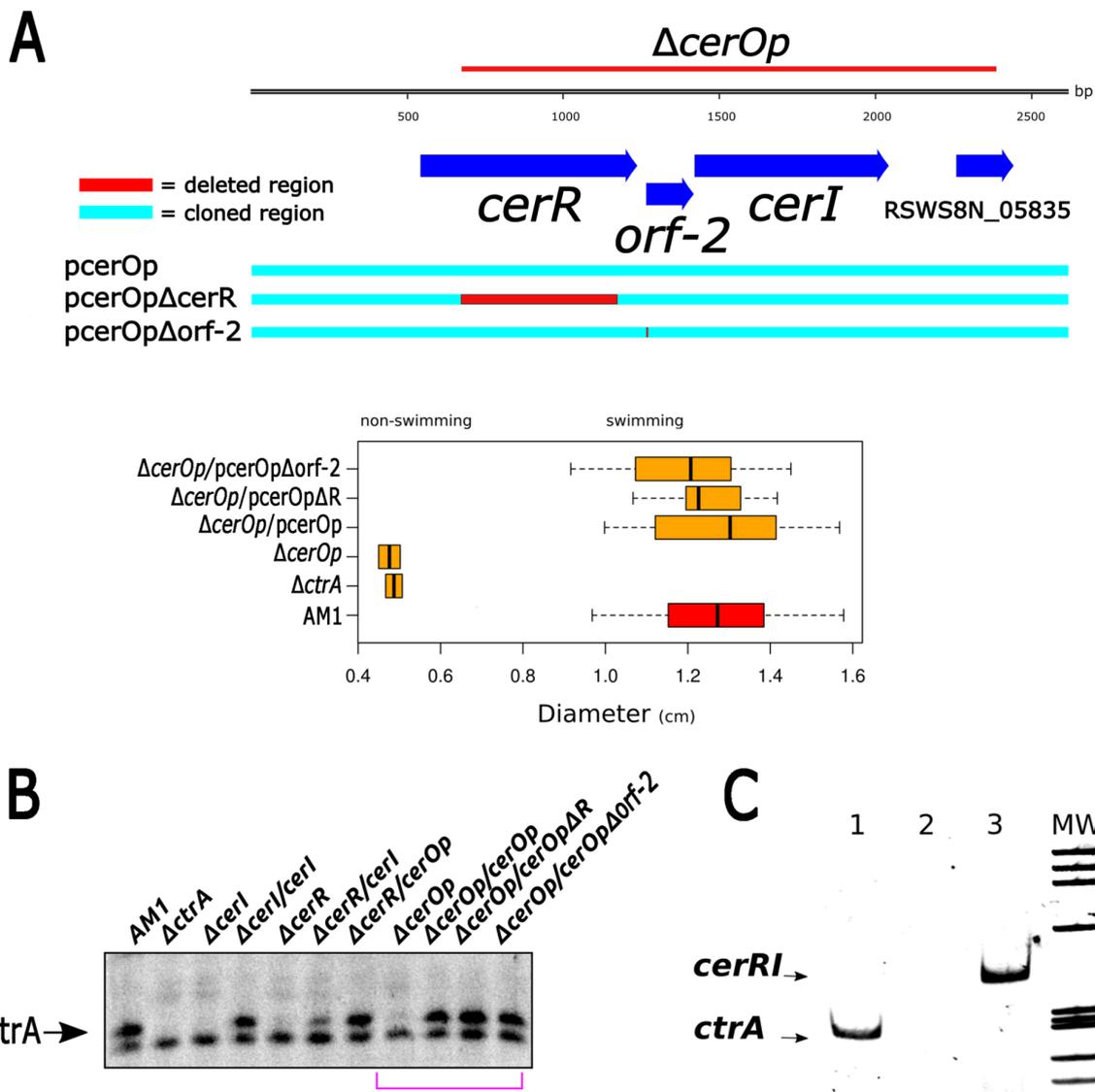


Figura S3. Evaluación del papel de CerR y ORF-2 en el comportamiento de nado de AM1. A. Representación esquemática de la región eliminada en la cepa JV25 ( $\Delta cerOp::aadA$ ). Se obtuvieron un conjunto de plásmidos en los que se clonaron diferentes versiones del operón *cer* en el plásmido pRK415. Las tres construcciones utilizadas se representan a continuación de la arquitectura del operón. El fragmento de ADN incluido en cada plásmido se muestra en azul, mientras que la región eliminada se muestra en rojo. El nombre de cada plásmido se indica a la izquierda. Se evaluó la capacidad de nado de la cepa  $\Delta cerOp$  (JV25) portando cada uno de estos plásmidos en placas de agar suave. Debajo se muestra un diagrama de caja que representa la distribución de los diámetros de los anillos de nado a partir de triplicados de al menos tres experimentos independientes. Los datos para la cepa parental AM1 se muestran en una caja roja. B. Detección de CtrA en extractos celulares totales de las cepas mutantes indicadas mediante inmunoblot utilizando

anticuerpos  $\alpha$ -CtrA.  $\Delta ctrA$  es la cepa EA1 ( $\Delta ctrA::aadA$ ),  $\Delta cerI$  JV14 ( $\Delta cerI::aadA$ ),  $\Delta cerR$  JV16 ( $\Delta cerR::aadA$ ),  $\Delta cerOp$  JV25 ( $\Delta cerOp::aadA$ ). Los controles correspondientes a las muestras de AM1 y  $\Delta ctrA$  están a la izquierda, mientras que las muestras de las cepas  $\Delta cerOp$  portando los plásmidos indicados se muestran a la derecha (etiquetadas con una forma rosa debajo). C. Ensayo de RT-PCR utilizando ARN total de las células AM1 y los oligonucleótidos DOWNcerRfw y asRNacerI, que son complementarios a *cerR* y *cerI*, respectivamente. Estos amplifican una región corta de estos genes y la región intercistrónica entre ellos. El carril 1 muestra la reacción de RT-PCR correspondiente a una región interna de *ctrA*; los carriles 2 y 3 muestran la reacción de RT-PCR correspondiente a la región *cerR-cerI* sin transcriptasa reversa o con transcriptasa reversa, respectivamente. A la derecha, el carril MW corresponde a los estándares de tamaño de ADN HaeIII-PhiX174.

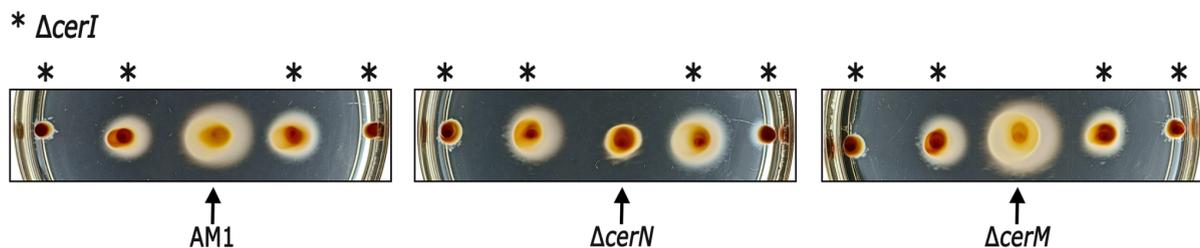


Figura S4. **Complementación funcional del fenotipo no móvil de la cepa  $\Delta cerI$  [JV14 ( $\Delta cerI::aadA$ )] por los mutantes de percepción de quórum  $\Delta cerN$  y  $\Delta cerM$ .** Las placas de agar suave fueron inoculadas con las cepas AM1 (control positivo),  $\Delta cerN$  [JV17 ( $\Delta cerN::aadA$ )] y  $\Delta cerM$  [JV19 ( $\Delta cerM::aadA$ )] en el centro de la placa. El punto de inoculación de estas cepas se indica con una flecha. La cepa no móvil  $\Delta cerI$  (asteriscos) fue inoculada cerca y lejos del inóculo central. Después de 60 horas de incubación, se observó nado de  $\Delta cerI$  en las células cultivadas cerca de AM1,  $\Delta cerN$  y  $\Delta cerM$ .

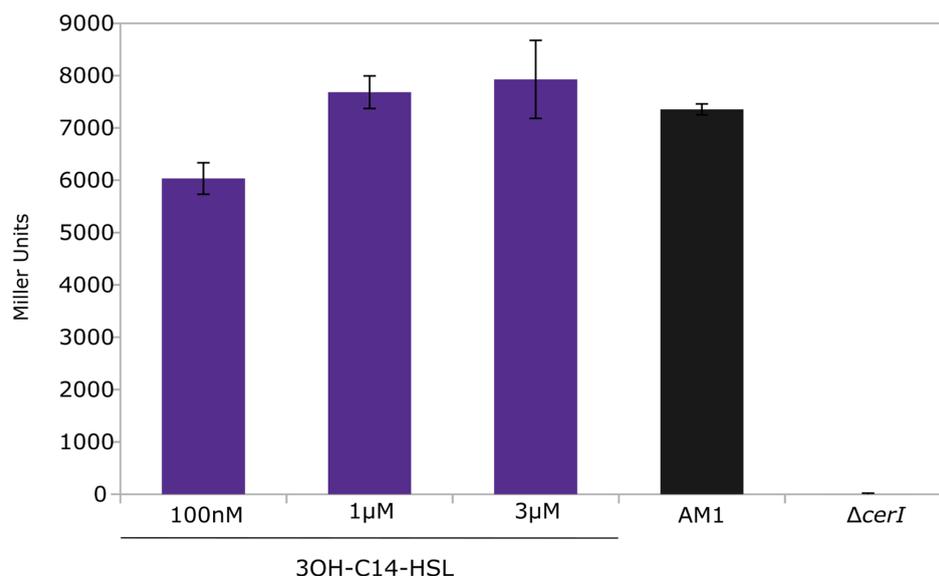


Figura S5. **Actividades de  $\beta$ -galactosidasa promovidas por AHL en la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).** Los cultivos de la cepa reportera se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de 3-OH-C14-HSL (barras moradas) o mediante la adición de 2  $\mu$ l de extractos de los sobrenadantes de cultivos celulares de las cepas AM1 o  $\Delta$ *cerI* (JV14) (barras negras). Se realizaron tres ensayos independientes y se muestra el valor promedio. Se incluye la desviación estándar.

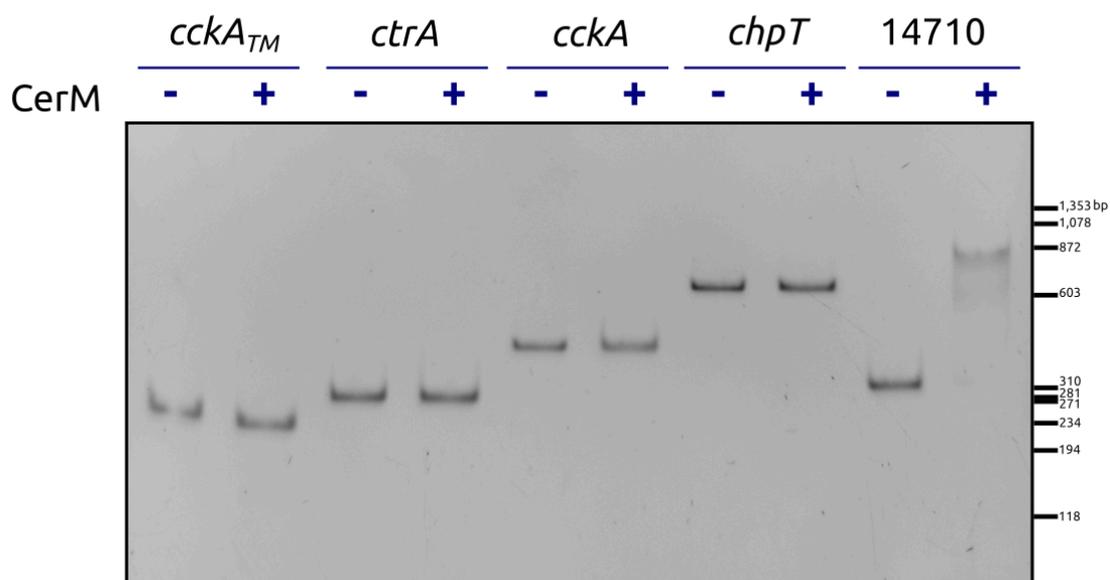


Figura S6. **Ensayo de movilidad electroforética de las regiones regulatorias de *ctrA*, *cckA* y *chpT*.** Se incluyeron 200 ng de la proteína purificada 6xHis-CerM en la reacción. A la derecha, se muestra la migración del marcador de peso molecular de ADN *HaeIII*-PhiX174.

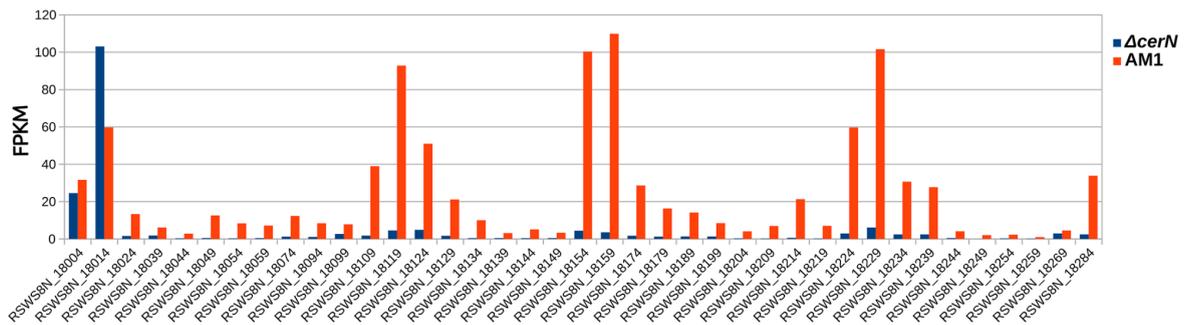


Figura S7. **Expresión de los genes en el locus genético que codifica los componentes para la formación del fago RS-Mu.** Se muestra la expresión de cada ORF representada como el número de fragmentos por kilobase por millón (FPKM) promedio. Las barras naranjas representan la expresión en la cepa AM1/pRK415 y las barras azules representan la expresión en  $\Delta cerN$ /pcerM. RSWS8N\_18024 codifica el putativo antirrepresor que sigue el mismo patrón de expresión que los genes identificados como componentes de RS-Mu (RSWS8N\_18039-RSWS8N\_18284). Curiosamente, se observa una regulación inversa para RSWS8N\_18014, anotado como un represor transcripcional de fago (COG2932), y orientado divergente al resto de los genes.

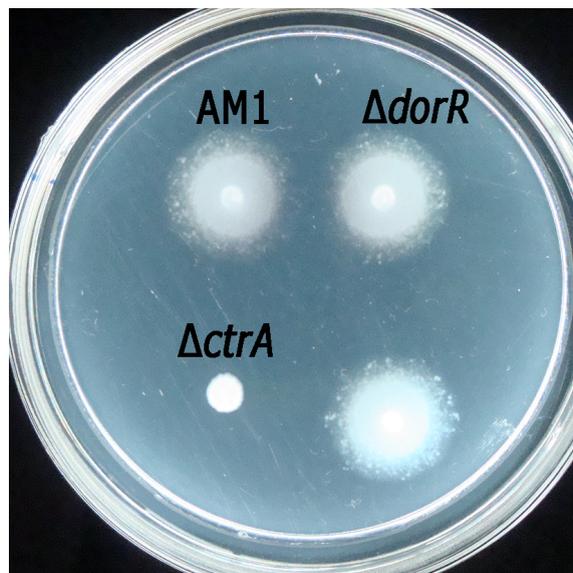


Figura S8. **Capacidad de nado del derivado de AM1  $\Delta dorR::aadA$ .** Una placa de agar suave que contiene medio mínimo de Sistrom suplementado con 0.2% de casaminoácidos fue inoculada con las cepas indicadas y se incubó durante 60 horas en condiciones heterotróficas. La cepa EA1 ( $\Delta ctrA::aadA$ ) se incluyó como control negativo.

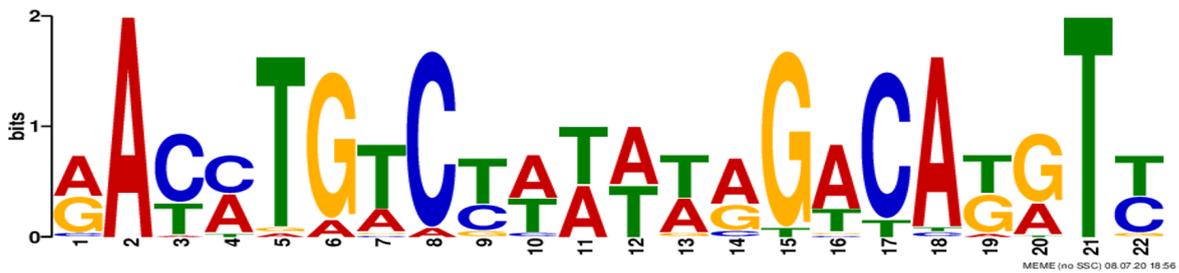


Figura S9. Logo que representa el motivo identificado por MEME, que podría corresponder al sitio de unión de GtaR. Este análisis se realizó en la región de 300 pb río arriba y 10 pb aguas río abajo del codón de inicio de los ortólogos de *gtaR* de 23 especies de Rhodobacterales que poseen ortólogos de GtaR y GtaI. También se incluyó la región reguladora del ortólogo de GtaR en *C. sphaeroides* WS8N. Este análisis identificó un motivo de 22 pb, RACMTGTCYWWWWRGACAKGTY, con un valor e de  $1.1 \times 10^{-48}$ , que estuvo presente en 18 de las 24 secuencias analizadas. Para mayores detalles ver Materiales y métodos.

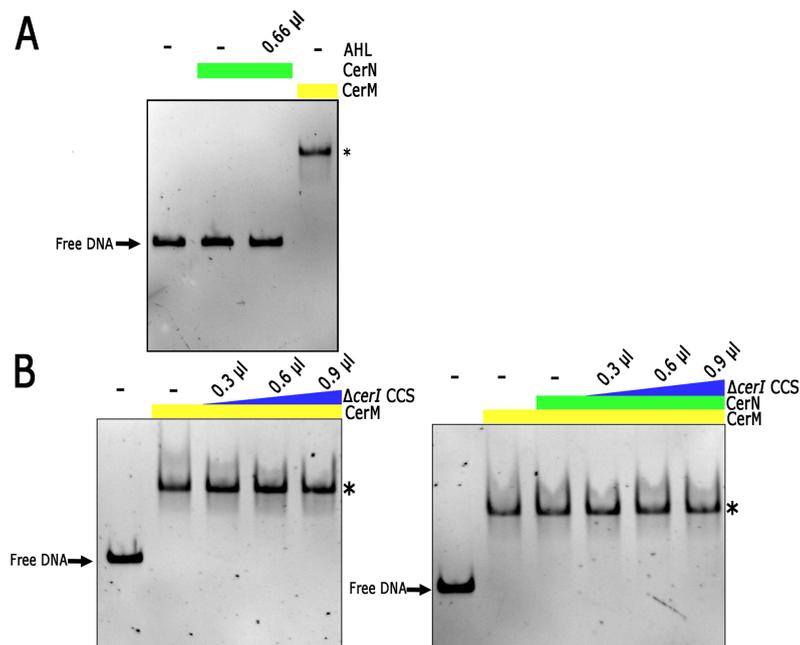


Figura S10. Ensayo de movilidad electroforética de la región regulatoria de RSWS8N\_14710 en presencia de CerN y AHL. A. Ensayo de movilidad electroforética de la región regulatoria de RSWS8N\_14710 y CerN. La inclusión de GST-CerN (200 ng) en la reacción está representada por una barra verde. Se incluyó (0.66  $\mu$ l) o no (-) AHL en las reacciones de unión. Como control positivo, se incluyó una reacción que contenía el mismo fragmento de ADN y 200 ng de 6xHis-CerM (barra amarilla). Un asterisco indica la

migración del complejo ADN-CerM. B. Ensayos de movilidad electroforética de la región reguladora de RSWS8N\_14710 y CerM (barra amarilla) realizados en presencia de cantidades crecientes de sobrenadante de cultivo celular (CCS) obtenido de la cepa JV14 ( $\Delta cerI::aadA$ ) (triángulo azul). Las reacciones de unión incluyeron GST-CerN (barra verde) o se realizaron en su ausencia.

### **Procedimientos para obtener los plásmidos utilizados en este trabajo**

- pTZ\_cerI: Se amplificó por PCR una región de 1714 pb que contiene el gen *cerI* utilizando los oligonucleótidos CerIfor1 y CerIRV1 y se clonó en el vector pTZ18R (EcoRI-/BamHI-/SmaI-) en el sitio XbaI.
- pTZ\_cerRuPdW: Se amplificó un producto de 610 pb correspondiente a la región río arriba de *cerR* utilizando los oligonucleótidos UPcerRfw y UPcerRrv, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 623 pb usando los oligonucleótidos DOWNcerRfw y DOWNcerRrev. Estos productos de PCR se unieron a través de un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_cerNuPdW: Se amplificó un producto de 662 pb correspondiente a la región río arriba de *cerN* utilizando los oligonucleótidos 05815UPrv y 05815UPfw, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 711 pb usando los oligonucleótidos 05815DOWNrv y 05815DOWNfw. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_cerMuPdW: Se amplificó un producto de 733 pb correspondiente a la región río arriba de *cerM* utilizando los oligonucleótidos 05820FWup y 05820RVup, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 701 pb utilizando los oligonucleótidos 05820FWdown y 05820RVdown. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_ΔcerN::Hyg-ΔcerM: Se amplificó un producto de 2301 pb correspondiente a la región río abajo de *cerN*, el cassette de resistencia a Hyg que interrumpe el *cerN* deletado, la región intercistronica entre *cerN* y *cerM*, y 33 pb correspondientes a la

región codificante de *cerM*, usando los oligonucleótidos 05815DOWNrv y 05820RVup, y el ADN cromosómico de JV18 ( $\Delta cerN::Hyg$ ) como templado. La región río abajo de *cerM* (701 pb) se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 05820FWdown y 05820RVdown usando ADN cromosómico de AM1 como templado. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.

- pTZ\_gtaRuPdW: Se amplificó un producto de 670 pb correspondiente a la región río arriba de *gtaR* utilizando los oligonucleótidos 13935UPfw y 13935UPrv, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 704 pb utilizando los oligonucleótidos 13935DOWNfw y 13935DOWNrv. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio SacI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_RS15160uPdW: Se amplificó un producto de 822 pb correspondiente a la región río arriba de RS15160 utilizando los oligonucleótidos UPrvRS15160 y UPfwRS15160, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 753 pb utilizando los oligonucleótidos DWfwRS15160 y DWrvRS15160. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio SacI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_15394uPdW: Se amplificó un producto de 800 pb correspondiente a la región río arriba de 15394 utilizando los oligonucleótidos UPfw15394 y UPrv15394, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 750 pb utilizando los oligonucleótidos DWfw15394 y DWrv15394. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_cerRuP-cerXdW: Se amplificó un producto de 661 pb correspondiente a la región río arriba de *cerR* utilizando los oligonucleótidos UPcerRfw y UPcerRrv, mientras que se obtuvo un producto río abajo de 834 pb utilizando los oligonucleótidos fwUpCerX y rvUpCerX. Estos productos de PCR se unieron mediante un sitio EcoRI diseñado en los oligonucleótidos y se clonaron en pTZ18R en el sitio XbaI.
- pTZ\_cerM: Un fragmento de 1001 pb correspondiente a *cerM* y su región intercistronica río arriba se amplificó utilizando los oligonucleótidos 5815UPrv y UPcerRrv y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.

- pTZ\_cerR: Se amplificó un fragmento de 1248 pb correspondiente a *cerR* y su región intercistrónica río arriba utilizando los oligonucleótidos UPcerRfw y Rv\_cerR\_compl y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pTZ\_cerN: Un fragmento de 597 pb correspondiente a *cerN* y su región intercistrónica río arriba se amplificó utilizando los oligonucleótidos fw\_compl\_5815 y rv\_compl\_5815 y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pTZ\_14710mut: Se amplificó un fragmento de 1276 pb que comprende 363 pb correspondientes al ORF RSWS8N\_14710, 622 pb de su región río arriba, y 291 pb de su región río abajo utilizando los oligonucleótidos Fwcro\_Xba y Rvcro\_Sac, y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI. El plásmido seleccionado liberó el fragmento de 1276 pb al ser digerido con XbaI.
- pTZ\_14710: Un fragmento de 430 pb que comprende 363 pb correspondientes al ORF RSWS8N\_14710 y 67 pb de su región río arriba se amplificó utilizando los oligonucleótidos Fw14710\_XbaI y Rv14710\_HindIII y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pTZ\_cerOp: Se amplificó un fragmento de 2614 pb correspondiente a *cerR*-ORF2-*cerI* y la región intercistrónica río arriba de *cerR* utilizando los oligonucleótidos UPcerRfw y Rv\_cerR\_compl y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pTZ\_cerMpET: Un fragmento de 827 pb correspondiente a *cerM* sin su codón de inicio se amplificó utilizando los oligonucleótidos Fw\_5820\_BamH1 y UPcerRrv y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pTZ\_cerNpGEX: Se amplificó un fragmento de 491 pb correspondiente a *cerN* sin su codón de inicio utilizando los oligonucleótidos 5815\_rv\_sall\_pGEX y 5815\_fw\_ecoRI\_pGEX y se clonó en el vector pTZ18R en el sitio SmaI.
- pJQ\_Δ*cerI*::*aadA*: El plásmido pTZ\_cerI fue digerido con EcoRI y BamHI, resultando en la eliminación de una región de 247 pb correspondiente a la secuencia codificante de *cerI*. Los extremos fueron reparados con la polimerasa de ADN T4 e interrumpidos con el cassette *aadA*, que confiere resistencia al antibiótico

espectinomycin. El fragmento  $\Delta cerI::aadA$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se clonó en el vector pJQ200mp18 en el sitio XbaI.

- pJQ\_ $\Delta cerI::Rif$ : El plásmido pTZ\_cerI fue digerido con EcoRI y BamHI, lo que resultó en la eliminación de una región de 247 pb de la secuencia codificante de *cerI*. Los extremos fueron reparados con la polimerasa de ADN T4 y se ligaron con el cassette Rif de 678 pb, que confiere resistencia al antibiótico rifampicina. El fragmento  $\Delta cerI::Rif$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se clonó en el vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta cerR::aadA$ : El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_cerRuPdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN que lleva  $\Delta cerR::aadA$  se extrajo de pTZ\_ $\Delta cerR::aadA$  mediante digestión con XbaI y posteriormente se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta cerN::aadA$ : El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_cerNuPdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN que contiene  $\Delta cerN::aadA$  se extrajo de pTZ18R mediante digestión con XbaI y posteriormente se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta cerN::Hyg$ : Un fragmento de ADN de 1390 pb correspondiente al cassette Hyg se clonó en pTZ\_cerNuPdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN que corresponde a  $\Delta cerN::Hyg$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta cerM::aadA$ : El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_cerMuPdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN que corresponde a  $\Delta cerM::aadA$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta cerN::Hyg-\Delta cerM$ : El fragmento  $\Delta cerN::Hyg-\Delta cerM$  se liberó con XbaI de pTZ\_ $\Delta cerN::Hyg-\Delta cerM$  y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta gtaR::aadA$ : El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_gtaRuPdW previamente digerido con SacI. El fragmento de ADN correspondiente a  $\Delta gtaR$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ $\Delta gtaR::uidA-Hyg$ : El fragmento que contiene el cassette *uidA-Hyg* se generó uniendo el fragmento *uidA* de pBBR1gus y el cassette de resistencia a Hyg de

pIJ963. El fragmento resultante se clonó en pTZ\_gtaRuPdW, que previamente se había digerido con ScaI y se había reparado con T4 DNA polimerasa. Después de seleccionar la orientación correcta del gen reportero, este plásmido fue digerido con XbaI para obtener el fragmento  $\Delta gtaR::uidA$ -Hyg y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.

- pJQ\_ΔRS15160::uidA-Hyg: El cassette *uidA*-Hyg se clonó en pTZ\_RS15160uPdW previamente digerido con ScaI. El fragmento de ADN correspondiente a  $\Delta RS15160::uidA$ -Hyg se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_Δ15394::uidA-Hyg: El cassette *uidA*-Hyg se clonó en pTZ\_15394uPdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN correspondiente a  $\Delta 15394::uidA$ -Hyg se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_14710::aadA: El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_14710mut, que se había digerido previamente con Sall y se reparó con T4 polimerasa de ADN. El fragmento de ADN que porta 14710::*aadA* se extrajo de pTZ\_14710::*aadA* mediante digestión con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pJQ\_ΔcerOp::aadA: El cassette *aadA* se clonó en pTZ\_cerRuP-cerXdW previamente digerido con EcoRI. El fragmento de ADN correspondiente a  $\Delta cerOp$  se liberó de pTZ18R con XbaI y se subclonó en el sitio XbaI del vector pJQ200mp18.
- pcerM (pRK415\_cerM): El fragmento que porta *cerM* se extrajo de pTZ\_cerM con EcoRI y se subclonó en pRK415, previamente digerido con EcoRI. En este plásmido, *cerM* está orientado en la dirección opuesta al promotor plac presente en pRK415.
- pcerN (pRK415\_cerN): El fragmento que lleva *cerN* se liberó con EcoRI y XbaI de pTZ\_cerN y se subclonó en pRK415, que previamente había sido digerido con EcoRI y XbaI. En este plásmido, *cerN* está orientado en la dirección opuesta al promotor plac presente en pRK415.
- pcerR (pRK415\_cerR): El fragmento que lleva *cerR* se liberó de pTZ\_cerR con EcoRI y XbaI y se subclonó en pRK415, previamente digerido con EcoRI y XbaI. En

este plásmido, *cerR* está orientado en la misma dirección que el promotor *plac* presente en pRK415.

- p14710 (pRK415\_14710): El fragmento que porta la ORF RSWS8N\_14710 se extrajo de pTZ\_14710 con XbaI y HindIII y se subclonó en pRK415, previamente digerido con XbaI y HindIII.
- p*cerI* (pRK415\_ *cerI*): El fragmento XbaI obtenido del plásmido pTZ\_ *cerI* se subclonó en pRK415, que había sido previamente digerido con XbaI. En este plásmido, *cerI* está orientado en la dirección opuesta al promotor *plac* presente en pRK415.
- p*cerOp* (pRK415\_ *cerOp*): El fragmento que lleva *cerR*-ORF2-*cerI* se liberó de pTZ\_ *cerOp* con XbaI y se subclonó en pRK415, previamente digerido con XbaI. En este plásmido, *cerR*-ORF2-*cerI* está orientado en la dirección opuesta al promotor *plac* presente en pRK415.
- p*cerOp*Δ*cerR* (pRK\_ *cerOp*Δ*cerR*): El plásmido pTZ\_ *cerOp* se utilizó como templado para una reacción de PCR inversa con los oligonucleótidos UP*cerR*<sub>rv</sub> y DOWN*cerR*<sub>fw</sub>. Después de la auto-ligación, se verificó la presencia de una delección de 511 pb en la región codificante de *cerR*. El fragmento que lleva Δ*cerR*-ORF2-*cerI* se liberó con XbaI de pTZ18R y se subclonó en pRK415, previamente digerido con XbaI. En este plásmido, Δ*cerR*-ORF2-*cerI* está orientado en la dirección opuesta al promotor *plac* presente en pRK415.
- p*cerOp*Δorf-2 (pRK415\_ *cerOp*Δorf-2): El plásmido pTZ\_ *cerOp* se utilizó como templado para una reacción de PCR inversa con los oligonucleótidos *cerAmutEcoR1* y *Rv\_cerR\_compl*. Después de la auto-ligación, se verificó la presencia de una delección que abarca de -19 a +3 de la región codificante de ORF-2. El fragmento que porta *cerR*-ΔORF2-*cerI* se liberó con XbaI de pTZ18R\_ *cerOp*Δorf-2 y se subclonó en pRK415, que previamente había sido digerido con XbaI. En este plásmido, *cerR*-ΔORF2-*cerI* está orientado en la dirección opuesta al promotor *plac* presente en pRK415.
- pET\_6xH-*cerM* (pET28a\_6xHis-*CerM*): El fragmento de ADN que lleva *cerM* se extrajo de pTZ\_ *cerMpET* con BamHI y EcoRI y se subclonó en pET28a, que había sido previamente digerido con las mismas enzimas.

- pGEX\_cerN (pGEX-4T-2\_GST-CerN): El fragmento que lleva *cerM* se liberó de pTZ\_cerNpGEX con EcoRI y Sall y se subclonó en pGEX-4T-2, que había sido previamente digerido con las mismas enzimas.
- pcerMBS1::lacZ (pRS551\_cerMBS1::lacZ): Se hibridaron 10 µM de los oligonucleótidos FW\_artifprom\_CerM y RV\_artifprom\_CerM mediante un gradiente de temperatura de 98 °C a 12 °C. El producto resultante se ligó en el plásmido pRS551, que previamente había sido digerido con EcoRI y BamHI para producir la fusión transcripcional *cerMBS1::lacZ*.
- pGEX\_cerM (pGEX-4T-2\_6xHisCerM): Un producto de 1188 pb que contiene la fusión 6xHis-*cerM* se amplificó por PCR del vector pET28a\_6xHis-*cerM* utilizando los oligonucleótidos T7promBgIII y T7terBgIII. El producto resultante se clonó en el vector pGEX-4T-2, que previamente había sido digerido con EagI. En este plásmido, 6xHis-*cerM* está orientado en la misma dirección que el promotor ptac presente en pGEX-4T-2.
- pGEX\_cerNM (pGEX-4T-2\_GST-CerN - 6xHis-CerM): Se obtuvo un producto de PCR de 1188 pb que contiene 6xHis-*cerM* del vector pET28a\_6xHis-*cerM* utilizando los oligonucleótidos T7promBgIII y T7terBgIII. El producto resultante se clonó en el vector pGEX\_cerN, que había sido previamente digerido con EagI. En este plásmido, 6xHis-*cerM* está orientado en la misma dirección que el promotor ptac presente en pGEX-4T-2.

Tabla S1. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia
CerIfor1	GCTCTAGAGGGCCTTCTGTCCGGTGAC
CerIRV1	GCTCTAGAAAATGAGCGCACCTTCTCG
UPcerRfw	GTCTAGAGCTGGACCTTCACCAACCAC
UPcerRrv	GGAATTCTGGACTCGTTGTCGCATAGG
DOWNcerRfw	GGAATTCAGAAGCTCGGCACCCTCTC
DOWNcerRrev	GTCTAGATCGTGACATAGGCGATCGAG
05815DOWNrv	GCTCTAGACCGTGTAAGTGATCGTCTCG
05815DOWNfw	GCGAATTCGCTGCGTCACTGATTCGTC
05815UPrv	GCGAATTCCGAAGTGCCAGTCGGAAT
05815UPfw	GCTCTAGAGCATAGGCCATCTGCTTGTA
05820FWup	GCTCTAGAAACGGCGAGTCTCAGGATG

05820RVup	GCGAATTCCAGGAATGCTTCCTTCATGT	
05820FWdown	GCGAATTCGAGTCGCGGCATCCTTTA	
05820RVdown	GCTCTAGACGATGTCCGTCTGCGACT	
13935UPfw	GCTCTAGACACGAGCAGATCAAGACGAC	
13935UPrv	GCGAGCTCGTGCAGGCCAGAAAGTAGC	
13935DOWNfw	GCGAGCTCAGGAATACCGGCTGATCTGA	
13935DOWNrv	GCTCTAGAGAGTTGCCGGGGTTGATG	
UPrvRS15160	GCTCTAGATTATAATGCACCGTGCCGC	
UPfwRS15160	GCGAGCTCTTCGCGGTAAGTCAAGAAG	
DWfwRS15160	GCTCTAGATCACGAAGCGCGAAATCGAC	
DWrvRS15160	GCGAGCTCATCTATACAGGTCGCTGACG	
UPfw15394	GCTCTAGATTCAAGCTCGGAACCGGAGC	
UPrv15394	GCGAATTCCGAGAGGGTTCCACGCTTCA	
DWfw15394	GCGAATTCTGAAGGCCCGCTTCAAGGCC	
DWrv15394	GCTCTAGACTTCCTCAGGTCTCTAGGTC	
fw_compl_5815	GCGAATTCAAGCTTGTGCTGTTCCATTG	
rv_compl_5815	GCTCTAGAGCCCGACGAATCAGTGAC	
Rv_cerR_compl	GCGAATTCTCACCTCGGATAGACCAGAC	
Fw_5820_BamH1	GGGATCCCATCTGTCAGACATGAAGG	
5815_rv_sall_pGEX	GCGTCTGACTCAGTGACGCAGCGTCGCGC	
5815_fw_ecoRI_pGEX	GCGAATTCCCATGGTGAACGTTCCGAGCGT	
FW_artifprom_CerM	AATTCTTGACATATCCAAAAGACAGGTTTTAT AATG	
RV_artifprom_CerM	GATCCATTATAAAACCTGTCTTTTTGGATATGT CAAG	
T7promBgIII	GCAGATCTTTAATACGACTCACTATAGGG	
T7terBgIII	GCAGATCTGATATAGTTCTCCTTTTCAGC	
fwUpCerX	GGAATTCCGAGCGGCTGTTCTATCTCC	
rvUpCerX	GCTCTAGAGGTGGACAGTTCGTTGCG	
cerAmutEcoR1	GGAATTCCGGCACTTTGAGCCCTTTCCC	
FwpctrAXbal	CCTCTAGAAAGGTCACGATGATCCAGA	
RvctrAEcoRI	CCGAATTCAGCAGGATGAGATCGTAATC	
Fw_hygrouniv	GCGGATCCCGGGCCAGCTCCGCCATCGCC	
Rv_hygrouniv	GCGGATCCGGCGGCCCGGGCGTCAGGC	
Fwcro_Xba	GCTCTAGAAGCCGAAGGCCGCGACGCGCG	
Rvcro_Sac	GCGAGCTCCGCCGCCGCGCGAGGATGGCG	
Fw14710_Xbal	GCTCTAGAGGGGTTTTGGCACACAATATG	
Rv14710_HindIII	GCAAGCTTCTAGGCGGCTTCGGAGAGCAC	
<b>Oligonucleótidos usados para EMSAs</b>		
<b>Región</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
<i>cckA</i>	454A	GTCTAGACGATTTTCAGGGCCGAATGTCC
(239 pb)	RvCckATMPst	GCCTGCAGCATGAGCCCCCGGGCGATCAGC

<i>cckA</i> (396 pb)		cckAprom	GGTCTAGAGCTTTCTCGAGCGGACCTCC
		RvCckATMPst	GCCTGCAGCATGAGCCCCGGGCGATCAGC
<i>chpT</i> (603 pb)		ChpMutUp1	GGATCCAGCAGGAGATGGTTCGACAGA
		ChpTmutUp2	GATATCAGATGCGCGAACCAGAA
<i>sciP</i> (303 pb)		sciPfXbal	CCTCTAGACGAAACCCAGCGAATTGA
		RACEsciP146Rv	AGCCCGTGGATCACCGCCTTCACGAC
<i>ctrA</i> (281 pb)		FwpctrAEco	GCGAATTCAAGGTCACGATGATCCAGA
		RvpctrASac	GCGAGCTCAGCAGGATGAGATCGTAATC
14710 <sub>R</sub> R	A (310 pb)	FW14710EbpLargo Xbal	CCCGAATATTCGCGACTTGCA
		RV14710Prom	GTGGGCGTCGACGGGATGTTTC
	B (170 pb)	FW14710GtaRbox	CAGCTTGTATGAATGGACATATC
		RV14710Prom	GTGGGCGTCGACGGGATGTTTC
	C (129 pb)	Fw14710Dbox	TCAAGACAAGTTTTTCTGGAT
		RV14710Prom	GTGGGCGTCGACGGGATGTTTC
	D (191 pb)	FW14710LargoXbal	CCCGAATATTCGCGACTTGCA
		RvGTARbox	CTTGTCTTGAAACAAACCTGTC
	E (135 pb)	FW14710LargoXbal	CCCGAATATTCGCGACTTGCA
		RV_d5820_BS	GTTCCGGCGTCCGCCGCTGTGGA
	F (147 pb)	FW_CerM_BS	CAAAAAGACAGGTTTGTTTCAA
		RV14710Prom	GTGGGCGTCGACGGGATGTTTC
	G (163 pb)	FW14710LargoXbal	CCCGAATATTCGCGACTTGCA
		RV_CerM_BS	GATATGTCCATTCATACAAGCT
	H (155 pb)	FW_CerM_BS_F_e xtend_raso	GACATATCCAAAAGACAGGTT
		RV14710Prom	GTGGGCGTCGACGGGATGTTTC
	I (182 pb)	FW14710LargoXbal	CCCGAATATTCGCGACTTGCA
		RV_CerM_BS_G_e xtend	AAACAAACCTGTCTTTTTGGAT
07465 (323 pb)		FW_07465	CGCCACATCCGTCGCCATCG
		RV_07465	GAGACAGGCCGAGAACCCAG
15394 <sub>RR</sub> (249 pb)		FW_RR_15394	GCGAATTCCCATCTGCACATTTTCGGTAAC
		UP_RV_15394	GCGAATTCCGAGAGGGTTCCACGCTTCA
<i>gtaR</i> (337 pb)		13935UPrv	GCGAGCTCGTGCAGGCCAGAAAGTAGC
		FW_RR_13935	GCGAGCTCGTTTTCCGGTCTTGGCGATTT
17824 (306 pb)		FW_RSWS8N_178 24	CCCTCCCCTGATATCGGGAACCTCG
		RV_RSWS8N_1782 4	CGTAAAATGCCACCGACCGGAAG

## Tabla S2. Regulón CerN-CerM

Los genes que forman parte del regulón de CtrA (Log2FC = +/-1) están resaltados en amarillo.

old_ID	new_ID	prot_ID	log2FC	padj	*CtrA	FPKM		COG	Name
						DcerN/cerM	AMI/pRK		
RSWS8N_00130	RSWS8N_RS00130	WP_002719132.1	2.5987	1.12E-16	#N/A	179.531	29.648	T	bolA
RSWS8N_00195	RSWS8N_RS00195	WP_002719145.1	-2.012	7.07E-06	#N/A	2.6182	10.601	S	-
RSWS8N_00215	RSWS8N_RS00215	WP_002719149.1	-3.446	2.70E-29	yes	2.071953	22.8162	S	-
RSWS8N_00345	RSWS8N_RS00340	WP_002719175.1	-3.087	3.29E-05	#N/A	0.53391	4.8707	C	-
RSWS8N_00350	RSWS8N_RS00345	WP_002719176.1	-2.231	1.26E-05	#N/A	1.93223	9.1988	C	-
RSWS8N_00355	RSWS8N_RS00350	WP_002719177.1	-2.517	9.56E-06	#N/A	0.44021	2.565	C	-
RSWS8N_00685	RSWS8N_RS00685	WP_002719243.1	2.1962	0.0002654	#N/A	147.468	32.237	S	-
RSWS8N_00855	RSWS8N_RS00850	WP_002719277.1	2.6553	1.17E-13	#N/A	34.3405	5.4508	H	mtbC
RSWS8N_01005	RSWS8N_RS01000	WP_002719307.1	2.3508	0.0004662	#N/A	7.30511	1.44	S	-
RSWS8N_01090	RSWS8N_RS01095	WP_002719324.1	2.1693	1.31E-13	#N/A	1113.7	247.8	H	metF
RSWS8N_01110	RSWS8N_RS01115	WP_002719328.1	3.29655	2.56E-27	yes	15.39803	1.56893	H	gabT
RSWS8N_01115	RSWS8N_RS01120	WP_002719329.1	-3.3725	2.92E-17	yes	4.963541	51.7957	L	dprA
RSWS8N_01155	RSWS8N_RS01160	WP_037087423.1	4.4277	2.58E-08	#N/A	9.83111	0.4572	L	-
RSWS8N_01190	RSWS8N_RS22640	WP_002719344.1	2.1262	3.77E-08	#N/A	34955	8015	#N/D	#N/D
RSWS8N_01315	RSWS8N_RS01310	WP_002719369.1	2.0073	4.56E-11	#N/A	791.969	197.19	M	tmpC
RSWS8N_01355	RSWS8N_RS01350	WP_002719377.1	-2.6459	7.39E-26	yes	14.00105	88.0088	H	msbB
RSWS8N_01360	RSWS8N_RS01355	WP_002719378.1	-4.5132	7.20E-45	yes	10.61036	242.827	N	flgG2
RSWS8N_01395	RSWS8N_RS01385	WP_002719385.1	-2.525	9.78E-29	#N/A	2.52738	14.525	G	glgX
RSWS8N_01400	RSWS8N_RS01390	WP_037086806.1	-2.449	9.10E-09	#N/A	2.02552	11.239	H	glgC
RSWS8N_01905	RSWS8N_RS01885	WP_002719487.1	-2.3062	4.27E-14	yes	9.285266	46.2555	K	-
RSWS8N_02125	RSWS8N_RS02110	WP_002719531.1	-2.047	0.0044554	#N/A	1.77903	7.4111	P	katE
RSWS8N_02215	RSWS8N_RS02195	WP_002719549.1	4.048	1.85E-13	#N/A	1056.02	63.879	C	ccpA
RSWS8N_02220	RSWS8N_RS02200	WP_002719550.1	2.1061	0.0025988	#N/A	30.4926	7.0915	V	-
RSWS8N_02290	RSWS8N_RS02270	WP_002719564.1	-3.0997	6.97E-78	yes	105.6751	906.66	K	rpoHI
RSWS8N_02375	RSWS8N_RS02350	WP_002719581.1	2.0195	0.0013135	#N/A	12.6404	3.1179	H	cobS
RSWS8N_02395	RSWS8N_RS02370	WP_002719585.1	-3.8655	5.10E-34	yes	28.12154	409.85	S	omp28
RSWS8N_02400	RSWS8N_RS02375	WP_002719586.1	-2.5964	4.52E-18	yes	134.3761	813.365	H	metY
RSWS8N_02405	RSWS8N_RS02380	WP_002719587.1	-5.232	1.27E-53	yes	93.02619	3503.86	#N/D	#N/D
RSWS8N_02410	RSWS8N_RS02385	WP_002719588.1	-4.2914	6.61E-81	yes	657.3507	12884	T	cheY2
RSWS8N_02415	RSWS8N_RS02390	WP_002719589.1	-4.1041	5.64E-95	yes	119.05	2049.21	H	cheR1
RSWS8N_02420	RSWS8N_RS02395	WP_002719590.1	-4.3819	7.53E-96	yes	41.84629	874.37	NT	cheW1
RSWS8N_02425	RSWS8N_RS02400	WP_002719591.1	-5.7871	6.36E-170	yes	18.37415	1016.71	H	cheA1
RSWS8N_02430	RSWS8N_RS02405	WP_002719592.1	-5.6972	3.88E-115	yes	22.0524	1153.07	T	cheY1
RSWS8N_02435	RSWS8N_RS02410	WP_002719593.1	-5.0249	6.23E-176	yes	30.30057	989.482	#N/D	cheX
RSWS8N_02440	RSWS8N_RS21180	WP_082240219.1	-5.171	6.52E-108	#N/A	25.4487	921.11	NT	cheD
RSWS8N_02445	RSWS8N_RS02420	WP_002719595.1	-5.826	4.14E-62	yes	22.10171	1255.7	T	mcpA
RSWS8N_02450	RSWS8N_RS02425	WP_082240202.1	-6.9639	2.56E-129	yes	3.473646	438.221	NT	tlpS
RSWS8N_02455	RSWS8N_RS02430	WP_002719597.1	-6.1764	3.56E-180	yes	10.71797	778.026	NT	mcpB
RSWS8N_02460	RSWS8N_RS02435	WP_002719598.1	-5.3541	5.45E-78	yes	8.328383	344.063	T	cheY5
RSWS8N_02465	RSWS8N_RS02440	WP_002719599.1	-4.1509	5.26E-21	yes	9.633956	168.576	S	-
RSWS8N_02565	RSWS8N_RS02540	WP_002719619.1	-3.0538	0.0063539	yes	0.691888	5.9853	-	-
RSWS8N_02585	RSWS8N_RS02560	WP_011840821.1	-3.3858	0.00015198	yes	0.153192	1.57827	S	-
RSWS8N_02590	RSWS8N_RS02565	WP_002719624.1	-4.8771	1.42E-07	yes	0.050837	1.3144	S	-
RSWS8N_02710	RSWS8N_RS20990	WP_002719648.1	2.729	1.91E-12	#N/A	41.9982	6.3163	#N/D	#N/D
RSWS8N_02995	RSWS8N_RS02960	WP_002719705.1	2.5935	6.05E-19	#N/A	86.3692	14.317	S	-
RSWS8N_03025	RSWS8N_RS02990	WP_002719711.1	-2.102	7.83E-19	#N/A	16.8963	72.687	D	exoP
RSWS8N_03035	RSWS8N_RS03000	WP_002719713.1	-2.8705	2.01E-10	yes	1.487497	11.1613	M	exoA
RSWS8N_03040	RSWS8N_RS03005	WP_002719714.1	-3.015	1.55E-13	#N/A	2.4411	20.027	M	exoL
RSWS8N_03050	RSWS8N_RS03015	WP_002719716.1	-2.274	0.0077035	#N/A	0.5614	2.6272	GM	sqdC
RSWS8N_03315	RSWS8N_RS03285	WP_002719769.1	-4.6957	2.71E-32	yes	7.860915	207.156	S	sciP
RSWS8N_03320	RSWS8N_RS03290	WP_002719770.1	-3.664	1.19E-19	#N/A	170.295	2160.8	K	ctrA
RSWS8N_03435	RSWS8N_RS03400	WP_002719793.1	-2.579	2.55E-26	yes	8.282235	49.8008	G	eda
RSWS8N_03660	RSWS8N_RS03615	WP_002719838.1	2.0209	2.21E-10	#N/A	2514.78	620.15	#N/D	#N/D
RSWS8N_03940	RSWS8N_RS03885	WP_002719894.1	2.10924	2.42E-06	yes	181.8343	42.1955	-	-
	RSWS8N_RS21230	WP_082242035.1	2.1057	1.52E-10	#N/A	140.135	32.594	E	-

RSWS8N_04320	RSWS8N_RS04265	WP_002719970.1	2.0271	3.83E-08	#N/A	11.0204	2.713	I	ispD
RSWS8N_04900	RSWS8N_RS04850	WP_002720086.1	4.8573	1.29E-20	#N/A	79.2112	2.7282	Q	-
RSWS8N_05085	RSWS8N_RS05035	WP_002720123.1	2.0807	0.000381	#N/A	13.1087	3.1073	K	-
RSWS8N_05330	RSWS8N_RS05290	WP_037086972.1	-2.1063	1.13E-07	yes	26.65272	114.906	T	-
RSWS8N_05635	RSWS8N_RS05590	WP_235697896.1	-3.2366	0.0002665	yes	0.149652	1.50348	#N/D	#N/D
RSWS8N_05640	RSWS8N_RS05595	WP_002720234.1	-2.4406	5.93E-15	yes	46.39785	252.147	T	-
RSWS8N_05645	RSWS8N_RS05600	WP_002720235.1	-2.3088	4.81E-10	yes	129.6173	643.056	S	-
RSWS8N_t15161	RSWS8N_RS05870		2.5303	0.0001682	#N/A	69.205	11.97	#N/D	#N/D
RSWS8N_05940	RSWS8N_RS05915	WP_002720294.1	-2.589	2.45E-27	#N/A	3.33997	20.155	S	-
RSWS8N_05945	RSWS8N_RS05920	WP_002720295.1	-3.409	2.87E-18	#N/A	0.6339	6.666	S	-
RSWS8N_05960	RSWS8N_RS05935	WP_002720298.1	2.4336	1.46E-09	#N/A	38.4325	7.1234	I	-
RSWS8N_05965	RSWS8N_RS05940	WP_002720299.1	2.4862	3.45E-10	#N/A	63.6795	11.378	C	MA20_2
RSWS8N_05975	RSWS8N_RS05950	WP_002720301.1	3.3827	3.42E-22	#N/A	46.0364	4.4113	M	-
RSWS8N_05980	RSWS8N_RS05955	WP_002720302.1	3.791	1.23E-11	#N/A	14.392	1.0385	M	-
RSWS8N_05985	RSWS8N_RS05960	WP_002720303.1	4.8204	4.60E-38	#N/A	52.5402	1.8605	M	exoB
RSWS8N_05990	RSWS8N_RS05965	WP_082242044.1	4.9405	1.90E-26	#N/A	203.898	6.6459	M	-
RSWS8N_06040	RSWS8N_RS06005	WP_002720314.1	-4.8911	4.28E-69	yes	3.067769	92.6046	N	flM2
RSWS8N_06115	RSWS8N_RS06080	WP_002720329.1	2.3023	8.48E-18	#N/A	193.154	39.198	E	amaB
RSWS8N_06215	RSWS8N_RS06175	WP_002720349.1	-3.14	8.13E-12	#N/A	2.83696	25.729	S	-
RSWS8N_06370	RSWS8N_RS06335	WP_002720380.1	-3.319	0.0001577	#N/A	1.3793	14.97	#N/D	#N/D
RSWS8N_06450	RSWS8N_RS06410	WP_002720395.1	-3.4362	1.90E-07	yes	0.697262	7.80656	N	motB1
RSWS8N_06455	RSWS8N_RS06415	WP_002720396.1	-4.5223	5.58E-38	yes	1.907819	42.7678	N	motA1
RSWS8N_06460	RSWS8N_RS06420	WP_002720397.1	-5.9771	1.20E-246	yes	10.21993	646.044	NT	tlpL
RSWS8N_06500	RSWS8N_RS06460	WP_002720405.1	2.5772	3.73E-15	#N/A	167.671	28.136	O	-
RSWS8N_06595	RSWS8N_RS06555	WP_002720424.1	2.35808	1.78E-09	yes	3942.886	769.638	S	pufQ
RSWS8N_06625	RSWS8N_RS06585	WP_037087034.1	2.0659	6.91E-10	yes	202.4714	48.4036	F	crtE
RSWS8N_06870	RSWS8N_RS06830	WP_002720479.1	2.2994	6.17E-17	yes	255543.9	51957	H	pucB1
RSWS8N_06875	RSWS8N_RS06835	WP_002720480.1	2.25569	8.85E-16	yes	128064.1	26839	H	pucA1
RSWS8N_07350	RSWS8N_RS07305	WP_002720573.1	-2.3533	8.78E-22	yes	7.69748	39.4675	S	-
RSWS8N_07355	RSWS8N_RS07310	WP_002720574.1	-5.3178	1.64E-56	yes	6.12857	246.653	T	-
RSWS8N_07360	RSWS8N_RS07315	WP_002720575.1	-4.8404	6.66E-50	yes	79.32804	2276.59	H	-
RSWS8N_07375	RSWS8N_RS07330	WP_002720578.1	2.9415	1.50E-17	#N/A	54.8649	7.1396	S	-
RSWS8N_07380	RSWS8N_RS07335	WP_002720579.1	-4.0563	2.77E-12	yes	7.371163	123.103	T	pleD
RSWS8N_07460	RSWS8N_RS07415	WP_002720595.1	2.372	6.11E-22	#N/A	68.7883	13.301	V	-
RSWS8N_07465	RSWS8N_RS07420	WP_002720596.1	3.8665	8.61E-16	#N/A	587.959	40.34	K	-
RSWS8N_07560	RSWS8N_RS07515	WP_002720615.1	-2.7638	4.47E-30	yes	403.6652	2744.11	L	recA
RSWS8N_07565	RSWS8N_RS07520	WP_002720616.1	-2.4604	1.30E-13	yes	67.4904	371.971	-	-
RSWS8N_07570	RSWS8N_RS07525	WP_082242059.1	-4.2	4.50E-55	yes	21.40346	393.982	T	cckA
RSWS8N_07600	RSWS8N_RS21380	WP_002720623.1	2.214	6.25E-06	#N/A	383.411	82.733	#N/D	#N/D
RSWS8N_07875	RSWS8N_RS07820	WP_235697877.1	-4.1305	8.92E-21	yes	11.14996	195.664	T	-
RSWS8N_07940	RSWS8N_RS07885	WP_002720689.1	-2.812	4.38E-12	#N/A	13.193	93.042	S	-
RSWS8N_08145	RSWS8N_RS08090	WP_002720730.1	-4.3581	8.20E-39	yes	10.4821	216.338	#N/D	#N/D
RSWS8N_08425	RSWS8N_RS08365	WP_002720786.1	-4.028	3.70E-11	#N/A	0.17786	2.8179	S	-
RSWS8N_08500	RSWS8N_RS22450	WP_002720801.1	2.3952	5.40E-11	#N/A	127.308	24.217	#N/D	#N/D
RSWS8N_08705	RSWS8N_RS08650	WP_009561857.1	2.3632	4.12E-22	#N/A	176.901	34.429	E	pchB
RSWS8N_08715	RSWS8N_RS08660	WP_002720844.1	4.0505	1.30E-13	#N/A	3.47417	0.2105	-	-
RSWS8N_08795	RSWS8N_RS08740	WP_002720860.1	2.4631	1.56E-05	yes	47.00191	8.53712	KLT	-
RSWS8N_09185	RSWS8N_RS09120	WP_009561770.1	2.1627	0.0001054	#N/A	52.8723	11.831	K	-
RSWS8N_09235	RSWS8N_RS09175	WP_002720948.1	-3.8649	2.63E-55	yes	62.89098	918.382	K	mucS
RSWS8N_09490	RSWS8N_RS09430	WP_002720999.1	-4.755	1.54E-27	yes	16.82897	456.391	T	-
RSWS8N_09525	RSWS8N_RS09465	WP_002721006.1	2.1174	3.01E-12	#N/A	1546.75	356.8	-	-
RSWS8N_09560	RSWS8N_RS09500	WP_002721013.1	3.3103	5.10E-09	#N/A	55.6806	5.6128	E	MA20_0
	RSWS8N_RS22460	WP_235697905.1	2.7757	7.55E-07	#N/A	77.1823	11.28	EGP	-
RSWS8N_09675	RSWS8N_RS09615	WP_002721039.1	2.3154	4.06E-07	#N/A	110.693	22.263	K	acnR
RSWS8N_09680	RSWS8N_RS22665	WP_002721040.1	2.3837	3.73E-07	#N/A	249.42	47.845	#N/D	#N/D
RSWS8N_09685	RSWS8N_RS09620	WP_002721042.1	2.942	6.30E-07	#N/A	51.093	6.6561	S	mbfA
RSWS8N_09735	RSWS8N_RS09675	WP_002721053.1	-2.6222	3.95E-05	yes	6.701492	41.4913	S	-

RSWS8N 09740	RSWS8N RS09680	WP 002721054.1	2.1035	2.11E-10	#N/A	392.789	91.482	-	-
RSWS8N 09775	RSWS8N RS09715	WP 002721065.1	2.5858	8.40E-15	#N/A	22.6083	3.7739	L	rnhA
RSWS8N 09785	RSWS8N RS09725	WP 002721067.1	-2.8009	9.19E-15	yes	76.79164	536.421	K1	osp
RSWS8N 10360	RSWS8N RS10290	WP 002721287.1	3.37374	6.27E-28	yes	1359.01	131.233	#N/D	#N/D
RSWS8N 10495	RSWS8N RS10430	WP 002721325.1	2.3402	2.07E-06	#N/A	25.2559	4.9922	J	rsmE
RSWS8N 10555	RSWS8N RS10490	WP 002721341.1	2.32192	4.08E-20	yes	42.71748	8.54671	C	glcE
RSWS8N 10675	RSWS8N RS10610	WP 002721383.1	2.2173	6.65E-09	#N/A	101.985	21.948	D	mipZ
RSWS8N 10780	RSWS8N RS10720	WP 002721427.1	-5.5064	2.74E-81	yes	3.208667	144.293	T	MA20 2
	RSWS8N RS21485	WP 009563136.1	2.3508	8.75E-26	#N/A	1618.17	317.48	#N/D	#N/D
RSWS8N 10900	RSWS8N RS10840	WP 002721461.1	2.0022	4.75E-27	#N/A	253.942	63.444	S	-
RSWS8N 10920	RSWS8N RS10860	WP 002721470.1	-3.2709	2.50E-34	yes	4.314477	42.0323	G	-
RSWS8N 10925	RSWS8N RS10865	WP 002721472.1	-2.7841	2.51E-19	yes	31.93704	220.275	S	-
RSWS8N 10930	RSWS8N RS10870	WP 002721473.1	-2.7335	1.12E-29	yes	67.60428	450.13	S	-
RSWS8N 11035	RSWS8N RS10975	WP 002721513.1	-4.2028	5.60E-13	yes	0.974408	17.3519	Q	-
RSWS8N 11040	RSWS8N RS10980	WP 002721514.1	-5.2239	1.07E-41	yes	1.739389	63.13	Q	-
RSWS8N 11045	RSWS8N RS10985	WP 002721515.1	-6.89	3.03E-91	yes	0.264172	33.1529	#N/D	#N/D
RSWS8N 11050	RSWS8N RS10990	WP 002721516.1	-10.732	2.12E-41	yes	0.020533	38.3458	H	wgeD
RSWS8N 11055	RSWS8N RS10995	WP 002721517.1	-6.3234	4.69E-37	yes	0.467776	38.942	OU	wgeF
RSWS8N 11060	RSWS8N RS11000	WP 002721518.1	-5.5007	6.25E-22	yes	5.306996	241.637	H	-
RSWS8N 11065	RSWS8N RS11005	WP 002721521.1	-6.0736	2.61E-07	yes	1.502447	101.628	V	aprD/wg
RSWS8N 11070	RSWS8N RS11010	WP 002721523.1	-6.6799	5.06E-06	yes	0.663335	68.6269	M	aprE
RSWS8N 11075	RSWS8N RS11015	WP 002721525.1	-5.2527	7.29E-51	yes	30.66367	1172.23	M	-
RSWS8N 11080	RSWS8N RS11020	WP 002721526.1	-4.5256	1.56E-131	yes	11.62576	267.523	#N/D	#N/D
RSWS8N 11085	RSWS8N RS11025	WP 002721528.1	-4.7671	1.04E-143	yes	7.037707	191.976	L	dnaE2
RSWS8N 11090	RSWS8N RS11030	WP 002721530.1	-2.6501	4.53E-34	yes	13.00068	81.4191	M	mltB
RSWS8N 11170	RSWS8N RS21490	WP 002721563.1	3.2525	3.15E-16	#N/A	1303.29	136.9	-	-
RSWS8N 11320	RSWS8N RS11260	WP 235697881.1	-3.5049	5.09E-41	yes	5.670368	64.0162	MP	-
RSWS8N 11325	RSWS8N RS11265	WP 002721631.1	-3.7821	3.82E-20	yes	13.95339	192.923	L	radC
RSWS8N 11440	RSWS8N RS11380	WP 002721670.1	-2.8464	6.09E-05	yes	2.114987	15.4713	S	comF
RSWS8N 11510	RSWS8N RS11450	WP 002721694.1	-2.4333	2.95E-05	yes	1.362689	7.19175	T	-
RSWS8N 11685	RSWS8N RS11625	WP 002721756.1	2.10064	1.17E-25	yes	90.31898	21.085	G	-
RSWS8N 11690	RSWS8N RS11630	WP 002721758.1	2.17399	5.91E-12	yes	37.94805	8.42542	S	-
RSWS8N 11710	RSWS8N RS11650	WP 002721767.1	3.94508	3.47E-29	yes	68.12362	4.41679	C	pazS
RSWS8N 11720	RSWS8N RS11660	WP 002721771.1	2.0426	2.05E-08	#N/A	1445.44	351.21	S	hvrA
RSWS8N 11755	RSWS8N RS11695	WP 002721783.1	-2.024	0.0010576	#N/A	1.34172	5.4776	I	-
RSWS8N 11990	RSWS8N RS11920	WP 002721864.1	-4.7109	1.36E-46	yes	3.119961	83.051	N	motB2
RSWS8N 11995	RSWS8N RS11925	WP 002721867.1	-5.6801	1.44E-105	yes	78.68085	4038.94	N	flgE2
RSWS8N 12000	RSWS8N RS11930	WP 002721869.1	-6.5634	4.35E-91	yes	11.65463	1106.43	N	flgK2
RSWS8N 12005	RSWS8N RS11935	WP 002721871.1	-6.5083	1.22E-294	yes	20.215	1845.38	N	flgL2
RSWS8N 12010	RSWS8N RS11940	WP 002721873.1	-5.9678	1.21E-217	yes	13.43844	843.99	N	flgl2
RSWS8N 12015	RSWS8N RS11945	WP 002721875.1	-2.7829	3.23E-42	yes	14.94633	103.024	T	-
RSWS8N 12025	RSWS8N RS11955	WP 002721877.1	-4.4618	9.02E-54	yes	10.13577	224.856	N	flhP2
RSWS8N 12030	RSWS8N RS11960	WP 002721878.1	-4.7548	1.74E-66	yes	7.87073	209.385	N	flhN2
RSWS8N 12035	RSWS8N RS11965	WP 002721879.1	-4.8402	5.07E-40	yes	9.050152	261.877	N	flhH2
RSWS8N 12040	RSWS8N RS11970	WP 037087267.1	-4.563	1.08E-56	yes	29.3209	694.354	N	flhF2
RSWS8N 12045	RSWS8N RS11975	WP 002721881.1	-4.2576	8.55E-19	yes	27.08426	519.912	N	flhL2
RSWS8N 12050	RSWS8N RS11980	WP 002721882.1	-4.7941	6.03E-34	yes	31.84248	887.391	-	-
RSWS8N 12055	RSWS8N RS11985	WP 002721883.1	-4.7958	1.73E-48	yes	18.31196	511.568	S	-
RSWS8N 12060	RSWS8N RS11990	WP 002721884.1	-4.9106	1.89E-101	yes	17.79905	536.489	N	motA2
RSWS8N 12065	RSWS8N RS11995	WP 002721885.1	-6.0882	1.37E-192	yes	7.036285	480.575	O	-
RSWS8N 12070	RSWS8N RS12000	WP 011338874.1	-4.9133	1.91E-35	yes	16.36952	495.728	M	-
RSWS8N 12075	RSWS8N RS12005	WP 002721887.1	-5.4064	3.51E-117	yes	6.973652	297.206	N	flhA2
RSWS8N 12080	RSWS8N RS12010	WP 002721888.1	-5.2862	9.73E-36	yes	5.619879	221.624	N	flhR2
RSWS8N 12085	RSWS8N RS12015	WP 002721889.1	-5.01	3.04E-49	yes	8.130193	263.758	N	flhB2
RSWS8N 12090	RSWS8N RS12020	WP 002721890.1	-5.2571	3.63E-98	yes	6.010938	225.045	-	-
	RSWS8N RS12025	WP 017140007.1	-5.1238	4.76E-159	yes	9.697451	339.287	N	flhL
RSWS8N 12095	RSWS8N RS12030	WP 002721891.1	-5.2594	1.84E-56	yes	16.92296	651.332	N	flgH2
RSWS8N 12100	RSWS8N RS12035	WP 002721892.1	-5.3402	2.83E-67	yes	17.56217	716.513	N	flgA2

RSWS8N 12105	RSWS8N RS12040	WP 002721893.1	-4.8057	4.55E-107	yes	28.11192	786.895	N	flgG2
RSWS8N 12110	RSWS8N RS12045	WP 002721894.1	-4.6145	2.27E-47	yes	31.24549	767.568	N	flgF2
RSWS8N 12115	RSWS8N RS12050	WP 002721895.1	-4.7823	1.75E-28	yes	49.725	1373.63	N	flrQ2
RSWS8N 12120	RSWS8N RS12055	WP 002721896.1	-4.4144	9.79E-65	yes	62.76789	1343.67	N	flrE2
RSWS8N 12125	RSWS8N RS12060	WP 002721897.1	-3.5363	5.53E-26	yes	74.34577	864.656	N	flgC2
RSWS8N 12130	RSWS8N RS12065	WP 002721898.1	-3.5793	2.20E-20	yes	67.31331	806.539	N	flgB2
RSWS8N 12135	RSWS8N RS12070	WP 002721899.1	-4.9202	1.21E-29	yes	4.957637	151.131	NU	flrI2
RSWS8N 12140	RSWS8N RS12075	WP 002721900.1	-5.063	7.01E-19	yes	9.982866	337.404	-	-
RSWS8N 12145	RSWS8N RS12080	WP 002721901.1	-4.9933	0.00011202	yes	8.418463	269.322	N	flgJ2
RSWS8N 12155	RSWS8N RS22470	WP 002721903.1	-5.421	5.95E-140	#N/A	32.4297	1398.2	N	-
RSWS8N 12160	RSWS8N RS12090	WP 002721904.1	-4.9906	1.92E-137	yes	37.97258	1209.79	N	flgD2
RSWS8N 12165	RSWS8N RS12095	WP 002721905.1	-2.5708	1.32E-30	yes	36.57997	217.709	H	ubiB
RSWS8N 12170	RSWS8N RS12100	WP 002721909.1	2.402	1.95E-22	#N/A	132.868	25.157	H	ubiE
RSWS8N 12260	RSWS8N RS12190	WP 002721942.1	-5.655	1.82E-71	yes	2.278198	115.498	T	pleC
RSWS8N 12265	RSWS8N RS12195	WP 002721945.1	-3.9027	8.88E-37	yes	1.655224	23.9515	S	-
RSWS8N 12270	RSWS8N RS12200	WP 002721947.1	-2.038	1.43E-15	yes	21.47125	88.2243	L	recQ
RSWS8N 12310	RSWS8N RS12240	WP 002721957.1	2.47907	1.38E-30	yes	33.98036	6.09466	H	pncB
RSWS8N 12315	RSWS8N RS12245	WP 002721958.1	2.7621	6.26E-23	yes	39.40056	5.79925	Q	pncA
RSWS8N 12365	RSWS8N RS12295	WP 002721977.1	-5.5555	5.79E-05	yes	1.446981	69.1607	-	-
RSWS8N 12515	RSWS8N RS12450	WP 002722035.1	-2.113	1.84E-08	#N/A	8.77817	38.368	M	-
RSWS8N 12705	RSWS8N RS12650	WP 002722111.1	-3.4937	1.53E-05	yes	7.304956	83.5939	#N/D	#N/D
RSWS8N 12710	RSWS8N RS12655	WP 002722113.1	-2.3179	3.17E-14	yes	2.079927	10.4358	L	-
RSWS8N 12760	RSWS8N RS12705	WP 002722127.1	3.75863	3.25E-12	yes	1172.686	86.6909	C	alkB2
RSWS8N 12805	RSWS8N RS12750	WP 037087298.1	2.126	1.54E-14	yes	60.906	13.968	P	-
RSWS8N 12810	RSWS8N RS12755	WP 002722137.1	2.7651	3.90E-07	#N/A	59.248	8.6993	#N/D	#N/D
RSWS8N 12815	RSWS8N RS12760	WP 002722141.1	2.1645	5.93E-06	#N/A	38.8169	8.6646	P	-
RSWS8N 12825	RSWS8N RS12770	WP 002722145.1	2.0657	3.70E-17	#N/A	68.0722	16.271	EP	oppB
RSWS8N 12830	RSWS8N RS12775	WP 002722147.1	3.0676	3.82E-45	#N/A	253.62	30.277	E	oppA
RSWS8N 12930	RSWS8N RS12870	WP 002722176.1	-4.5978	2.05E-31	yes	11.57711	280.964	H	rsbW
RSWS8N 12935	RSWS8N RS12875	WP 002722179.1	-4.4873	5.12E-37	yes	30.83566	694.298	T	rsbV
RSWS8N 13025	RSWS8N RS12970	WP 002722219.1	2.2015	3.37E-21	#N/A	1603.01	348.83	K	hvrA
RSWS8N 13045	RSWS8N RS12990	WP 002722234.1	-4.3384	0.00013755	yes	5.841178	118.343	T	divL
RSWS8N 13080	RSWS8N RS13025	WP 002722248.1	-4.4577	5.22E-58	yes	7.581759	168.035	-	-
RSWS8N 13100	RSWS8N RS13045	WP 002722256.1	-2.388	0.0010994	#N/A	6.17554	32.725	IQ	acpP
RSWS8N 13105	RSWS8N RS13050	WP 002722258.1	-3.372	3.13E-40	#N/A	2.04031	21.267	Q	-
RSWS8N 13110	RSWS8N RS13055	WP 002722260.1	-2.287	0.0003347	#N/A	0.98557	4.7748	S	-
RSWS8N 13225	RSWS8N RS13160	WP 002722292.1	2.99732	1.33E-32	yes	10821.33	1356.6	H	pucB2
RSWS8N 13230	RSWS8N RS13165	WP 002722294.1	2.31025	1.45E-23	yes	2446.526	493.762	M	pucA2
RSWS8N 13365	RSWS8N RS13300	WP 037087324.1	-3.983	9.93E-46	yes	76.00024	1202.94	NT	cheA2
RSWS8N 13370	RSWS8N RS13305	WP 002722333.1	-4.4883	2.45E-63	yes	92.71433	2083.13	NT	cheW2
RSWS8N 13375	RSWS8N RS13310	WP 002722335.1	-3.8666	1.32E-31	yes	96.46267	1407.95	NT	cheW3
RSWS8N 13380	RSWS8N RS13315	WP 002722338.1	-3.9918	1.45E-35	yes	95.27393	1516.62	H	cheR2
RSWS8N 13385	RSWS8N RS13320	WP 002722341.1	-4.4255	1.69E-47	yes	36.98315	795.643	NT	cheB1
RSWS8N 13390	RSWS8N RS13325	WP 002722343.1	-4.0321	9.09E-27	yes	50.29441	823.384	NT	tlpC
RSWS8N 13395	RSWS8N RS13330	WP 037087337.1	-3.092	5.15E-45	#N/A	25.6565	218.78	O	yqiG
RSWS8N 13465	RSWS8N RS13400	WP 002722374.1	2.78759	3.45E-12	yes	50.37026	7.29894	H	-
RSWS8N 13630	RSWS8N RS13575	WP 002722426.1	-2.746	6.06E-20	#N/A	4.52965	30.511	C	med
RSWS8N 14220	RSWS8N RS14165	WP 002722645.1	-2.404	0.0057754	#N/A	0.59073	3.2784	P	sodC
RSWS8N 14310	RSWS8N RS14255	WP 002722669.1	-2.8069	7.45E-37	yes	8.651147	60.835	H	rsmI
RSWS8N 14315	RSWS8N RS14260	WP 002722671.1	-4.4924	6.63E-83	yes	13.49235	307.293	L	-
RSWS8N 14325	RSWS8N RS14270	WP 002722674.1	-3.2392	9.82E-24	yes	4.772706	45.4016	O	comM
RSWS8N 14330	RSWS8N RS14275	WP 002722676.1	2.50057	1.87E-21	yes	535.0727	94.6507	S	-
RSWS8N 14425	RSWS8N RS14365	WP 002722711.1	-2.141	0.0004935	#N/A	2.3407	10.496	S	-
RSWS8N 14555	RSWS8N RS14495	WP 002722757.1	-2.996	1.78E-37	yes	5.121308	40.6872	M	sleB
RSWS8N 14620	RSWS8N RS14560	WP 002722781.1	-3.0831	1.71E-29	yes	6.671774	56.3453	M	pulE/tp
RSWS8N 14665	RSWS8N RS14610	WP 002722799.1	-3.001	3.09E-23	yes	184.3752	1477.27	E	potD
RSWS8N 14670	RSWS8N RS14615	WP 002722801.1	-3.7679	1.50E-27	yes	90.60149	1235.12	P	potB
RSWS8N 14675	RSWS8N RS14620	WP 002722803.1	-3.6289	1.13E-28	yes	59.80503	740.334	P	potC

RSWS8N 14710	RSWS8N RS14655	WP 002722818.1	5.1042	8.65E-17	#N/A	78.4146	2.2853	K	-
RSWS8N 14745	RSWS8N RS14690	WP 002722830.1	-2.7535	5.97E-28	yes	13.96732	94.1088	O	-
RSWS8N 14770	RSWS8N RS14715	WP 002722840.1	-2.159	1.78E-09	yes	37.52399	167.596	U	tadB
RSWS8N 14775	RSWS8N RS14720	WP 002722842.1	-2.3504	5.12E-12	yes	40.27368	205.495	U	cpaF
RSWS8N 14780	RSWS8N RS14725	WP 002722844.1	-2.8166	1.99E-26	yes	14.59526	103.032	U	cpaE/min
RSWS8N 14885	RSWS8N RS14835	WP 002722876.1	-2.231	4.14E-09	#N/A	5.45306	25.247	S	-
RSWS8N 14895	RSWS8N RS14845	WP 002722880.1	-2.4769	1.06E-19	yes	7.474543	41.3305	H	dusA
	RSWS8N RS15160	WP 082242126.1	2.8677	3.28E-11	#N/A	23.2779	3.1873	K	-
RSWS8N 15314	RSWS8N RS15165	WP 002723078.1	4.3496	0.0012815	#N/A	60.4043	2.9663	M	-
RSWS8N 15319	RSWS8N RS15170	WP 002723080.1	4.4958	5.94E-12	#N/A	44.5577	1.9773	I	-
RSWS8N 15364	RSWS8N RS15215	WP 002723098.1	2.2776	4.20E-05	#N/A	6.38417	1.3211	P	-
RSWS8N 15379	RSWS8N RS15230	WP 002723104.1	-3.1015	1.04E-30	yes	6.241559	53.7785	C	steD
	RSWS8N RS21630	WP 082242128.1	-4.23	7.33E-55	#N/A	6.318	121.07	#N/D	#N/D
RSWS8N 15389	RSWS8N RS15235	WP 002723108.1	-4.1084	2.97E-13	yes	2.889107	50.4896	V	-
RSWS8N 15394	RSWS8N RS15240	WP 011339530.1	5.4349	4.15E-39	#N/A	46.3245	1.0701	K	-
	RSWS8N RS22505	WP 082242129.1	2.2238	1.19E-06	#N/A	65.1406	13.977	#N/D	#N/D
RSWS8N 15564	RSWS8N RS15410	WP 002723164.1	-2.622	1.80E-06	#N/A	0.52271	3.1965	E	-
RSWS8N 15764	RSWS8N RS15590	WP 002723238.1	-3.034	0.0007778	#N/A	0.33989	3.0176	S	-
	RSWS8N RS22515	WP 235697917.1	-3.154	8.31E-08	#N/A	1.78678	16.425	L	rep
RSWS8N 16384	RSWS8N RS16240	WP 002723456.1	2.416	0.0013957	#N/A	5.0099	0.9446	K	-
RSWS8N 16454	RSWS8N RS16310	WP 002723486.1	3.5671	4.76E-29	#N/A	108.792	9.1878	T	dorS
RSWS8N 16459	RSWS8N RS16315	WP 002723488.1	2.4612	5.48E-25	#N/A	26.5584	4.8347	K	torR
RSWS8N 16464	RSWS8N RS16320	WP 002723490.1	5.6613	6.69E-24	#N/A	414.059	8.1888	C	-
RSWS8N 16469	RSWS8N RS16325	WP 002723492.1	5.8863	8.57E-08	#N/A	133.093	2.2515	S	-
RSWS8N 16479	RSWS8N RS16335	WP 002723495.1	5.5414	0.0021085	#N/A	12.7462	0.2739	H	moeA
RSWS8N 16569	RSWS8N RS16425	WP 002723525.1	-2.258	0.0001636	#N/A	1.39529	6.7761	-	-
RSWS8N 16574	RSWS8N RS16430	WP 002723528.1	-2.485	0.0012637	#N/A	0.41895	2.4614	S	-
RSWS8N 16599	RSWS8N RS16455	WP 002723538.1	-4.01	5.17E-24	#N/A	4.17318	67.318	S	-
RSWS8N 16654	RSWS8N RS16505	WP 002723558.1	-2.435	2.63E-19	#N/A	3.08425	16.838	NT	mcrA
RSWS8N 16684	RSWS8N RS16540	WP 002723567.1	2.5486	1.41E-22	#N/A	148.902	25.454	P	phnA
RSWS8N 16769	RSWS8N RS16625	WP 002723595.1	-5.1781	2.95E-95	yes	5.941074	215.802	P	-
RSWS8N 16774	RSWS8N RS16630	WP 002723596.1	-5.6004	5.44E-65	yes	21.54171	1054.91	S	-
RSWS8N 16784	RSWS8N RS16640	WP 002723600.1	-6.1432	3.39E-158	yes	23.49908	1664.62	NI	mcpR
RSWS8N 16914	RSWS8N RS16775	WP 002723642.1	-2.159	1.10E-10	#N/A	13.6398	60.768	T	-
RSWS8N 16919	RSWS8N RS16780	WP 002723644.1	-3.224	5.09E-19	#N/A	1.86937	17.726	KLT	-
RSWS8N 16924	RSWS8N RS16785	WP 037087852.1	-2.907	5.12E-25	#N/A	2.0277	15.423	M	-
RSWS8N 16929	RSWS8N RS16790	WP 002723649.1	-2.854	3.03E-18	#N/A	1.58515	11.54	V	-
RSWS8N 16934	RSWS8N RS16795	WP 002723651.1	-2.581	1.08E-09	#N/A	2.00685	12.156	V	-
RSWS8N 16939	RSWS8N RS16800	WP 002723652.1	-3.23	4.72E-16	#N/A	3.21483	30.178	S	-
RSWS8N 16944	RSWS8N RS16805	WP 002723655.1	-2.476	0.0013613	#N/A	8.41016	46.715	#N/D	#N/D
RSWS8N 16949	RSWS8N RS16810	WP 002723657.1	-2.654	4.91E-06	#N/A	3.20518	20.147	KLT	-
RSWS8N 16954	RSWS8N RS16815	WP 002723660.1	-2.308	1.75E-11	#N/A	8.88011	44.005	S	-
RSWS8N 16959	RSWS8N RS16820	WP 002723661.1	-5.1409	1.39E-96	yes	6.940574	244.454	Q	-
RSWS8N 16969	RSWS8N RS16830	WP 002723664.1	-2.6685	0.00975228	yes	0.180048	1.16997	G	-
RSWS8N 17019	RSWS8N RS16880	WP 002723680.1	-3.904	0.0060445	#N/A	0.14034	2.0412	C	-
RSWS8N 17349	RSWS8N RS17210	WP 037087877.1	-5.4061	7.74E-60	yes	10.1935	434.55	#N/D	#N/D
RSWS8N 17719	RSWS8N RS17575	WP 002723944.1	2.158	1.70E-06	#N/A	240.206	53.878	E	MA20 2
RSWS8N 17729	RSWS8N RS17585	WP 037087907.1	-2.205	2.77E-12	#N/A	2.38307	11.086	S	-
RSWS8N 17734	RSWS8N RS17590	WP 002723950.1	-3.558	6.08E-17	#N/A	3.84926	45.834	S	-
RSWS8N 17739	RSWS8N RS17595	WP 002723952.1	-2.07	0.0003752	#N/A	1.24515	5.2385	S	-
RSWS8N 17774	RSWS8N RS17630	WP 002723961.1	-2.616	8.56E-27	#N/A	158.522	973.35	-	-
RSWS8N 17779	RSWS8N RS17635	WP 037088030.1	-2.477	1.07E-26	#N/A	337.403	1880.1	#N/D	#N/D
RSWS8N 17824	RSWS8N RS17685	WP 002723978.1	2.7237	1.28E-16	#N/A	96.5638	14.631	KI	-
RSWS8N 17844	RSWS8N RS17705	WP 002723982.1	2.4464	8.25E-32	#N/A	216.47	39.746	M	-
RSWS8N 17974	RSWS8N RS17825	WP 002724023.1	-7.188	3.54E-05	#N/A	0	2.1026	#N/D	#N/D
RSWS8N 18019	RSWS8N RS17885	WP 002724032.1	-3.163	0.0003777	#N/A	2.79098	25.603	-	-
RSWS8N 18024	RSWS8N RS17890	WP 002724033.1	-3.018	0.0010576	#N/A	1.60949	13.303	K	-

RSWS8N 18044	RSWS8N RS17905	WP 002724037.1	-3.2008	6.12E-10	yes	0.297033	2.82721	L	-
RSWS8N 18049	RSWS8N RS17910	WP 002724038.1	-4.644	3.33E-10	#N/A	0.47886	12.582	S	-
RSWS8N 18054	RSWS8N RS17915	WP 235697909.1	-4.8	9.81E-10	#N/A	0.26612	8.3497	-	-
RSWS8N 18059	RSWS8N RS17920	WP 002724042.1	-3.967	2.99E-06	#N/A	0.4306	7.1646	-	-
RSWS8N 18064	RSWS8N RS17925	WP 002724044.1	-4.889	4.25E-07	#N/A	0.25126	7.8029	#N/D	#N/D
RSWS8N 18069	RSWS8N RS17930	WP 002724046.1	-3.648	1.90E-05	#N/A	1.09075	14.885	#N/D	#N/D
RSWS8N 18074	RSWS8N RS17935	WP 002724047.1	-3.33	2.45E-06	yes	1.26168	12.3271	S	-
RSWS8N 18079	RSWS8N RS22265	WP 002724049.1	-5.064	1.45E-10	#N/A	0.43551	17.23	#N/D	#N/D
RSWS8N 18084	RSWS8N RS17945	WP 002724051.1	-2.6964	0.00029535	yes	2.413804	15.1007	#N/D	#N/D
RSWS8N 18094	RSWS8N RS17955	WP 002724054.1	-3.0404	0.0082009	yes	1.071269	8.41716	S	-
RSWS8N 18109	RSWS8N RS17970	WP 002724060.1	-4.45	8.64E-51	#N/A	1.80466	38.956	V	-
RSWS8N 18114	RSWS8N RS17975	WP 002724062.1	-4.366	7.11E-58	#N/A	5.89643	122.07	-	-
RSWS8N 18119	RSWS8N RS17980	WP 002724064.1	-4.327	2.27E-36	#N/A	4.53611	92.811	S	-
RSWS8N 18124	RSWS8N RS17985	WP 002724066.1	-3.357	7.89E-22	#N/A	4.87589	51.012	K	-
RSWS8N 18129	RSWS8N RS17990	WP 002724067.1	-3.66	3.74E-20	#N/A	1.69578	21.133	S	-
RSWS8N 18134	RSWS8N RS17995	WP 037087927.1	-4.479	1.70E-19	#N/A	0.43191	10.008	S	-
RSWS8N 18139	RSWS8N RS18000	WP 002724071.1	-2.915	0.0002862	#N/A	0.43356	3.116	S	-
RSWS8N 18144	RSWS8N RS18005	WP 002724073.1	-3.767	2.61E-17	#N/A	0.39925	5.124	S	-
RSWS8N 18149	RSWS8N RS21050	WP 002724075.1	-2.795	3.29E-06	#N/A	0.47046	3.3169	L	-
RSWS8N 18154	RSWS8N RS18015	WP 002724077.1	-4.505	9.76E-82	#N/A	4.43016	100.34	S	-
RSWS8N 18159	RSWS8N RS18020	WP 002724078.1	-4.931	6.97E-28	#N/A	3.55467	109.85	S	-
RSWS8N 18164	RSWS8N RS18025	WP 037087931.1	-6.852	1.25E-35	#N/A	0.55179	64.702	#N/D	#N/D
RSWS8N 18169	RSWS8N RS18030	WP 166486352.1	-5.158	2.26E-29	#N/A	1.69775	65.457	#N/D	#N/D
RSWS8N 18174	RSWS8N RS18035	WP 002724084.1	-4.041	3.05E-32	#N/A	1.72691	28.649	S	-
RSWS8N 18179	RSWS8N RS18040	WP 002724085.1	-3.715	1.94E-21	#N/A	1.26993	16.289	S	-
RSWS8N 18184	RSWS8N RS18045	WP 002724087.1	-7.183	1.50E-15	#N/A	0.05231	7.1135	-	-
RSWS8N 18189	RSWS8N RS18050	WP 002724089.1	-3.4398	0.00011241	yes	1.342572	14.153	S	-
RSWS8N 18204	RSWS8N RS18065	WP 002724096.1	-3.768	2.40E-09	#N/A	0.29429	4.0602	S	J
RSWS8N 18209	RSWS8N RS18070	WP 002724098.1	-4.968	1.26E-08	#N/A	0.19258	6.9156	S	-
RSWS8N 18214	RSWS8N RS22540	WP 002724100.1	-5.135	4.83E-21	#N/A	0.5836	21.316	S	-
RSWS8N 18219	RSWS8N RS22545	WP 002724103.1	-5.578	7.54E-15	#N/A	0.17828	7.0116	-	-
RSWS8N 18224	RSWS8N RS18090	WP 002724105.1	-4.343	1.86E-12	#N/A	2.91041	59.645	S	-
RSWS8N 18229	RSWS8N RS18095	WP 002724107.1	-4.036	1.28E-16	#N/A	6.10809	101.58	S	gpFH
RSWS8N 18234	RSWS8N RS18100	WP 002724109.1	-3.665	1.18E-25	#N/A	2.45195	30.656	S	-
RSWS8N 18239	RSWS8N RS18105	WP 002724111.1	-3.56	2.27E-12	#N/A	2.43931	27.723	#N/D	#N/D
RSWS8N 18244	RSWS8N RS18110	WP 002724113.1	-3.181	7.16E-14	#N/A	0.4523	4.0896	S	-
RSWS8N 18249	RSWS8N RS18115	WP 002724115.1	-6.679	2.01E-05	#N/A	0.01166	2.0563	S	gpU1
RSWS8N 18284	RSWS8N RS18145	WP 002724120.1	-3.806	6.81E-18	#N/A	2.46568	33.835	H	dam
RSWS8N 18574	RSWS8N RS18435	WP 002724213.1	-4.9163	3.23E-56	yes	24.13492	730.311	T	mcpV
	RSWS8N RS22555	WP 082242159.1	-5.032	3.13E-62	#N/A	30.4814	1001	#N/D	#N/D
RSWS8N 18584	RSWS8N RS22280	WP 002724217.1	-5.333	1.88E-73	#N/A	10.6937	439.95	-	-
RSWS8N 18589	RSWS8N RS18455	WP 002724219.1	-5.3315	6.77E-31	yes	6.112292	248.364	L	xth
RSWS8N 18594	RSWS8N RS18460	WP 002724221.1	-2.6311	9.08E-21	yes	4.942029	30.9291	IQ	csgA
RSWS8N 18609	RSWS8N RS18475	WP 002724226.1	-2.14	3.25E-05	#N/A	7.34042	32.455	S	-
RSWS8N 18619	RSWS8N RS18485	WP 002724230.1	-2.339	0.0007798	#N/A	0.34651	1.7015	S	-
RSWS8N 18644	RSWS8N RS22285	WP 002724241.1	2.4158	0.0003392	#N/A	11.3938	2.145	#N/D	#N/D
RSWS8N 18979	RSWS8N RS18845	WP 002724349.1	2.03672	1.22E-09	yes	52.42344	12.7797	G	-
RSWS8N 18994	RSWS8N RS18860	WP 002724352.1	2.0328	1.61E-06	#N/A	2.46009	0.6039	G	-
RSWS8N 19014	RSWS8N RS18880	WP 002724359.1	3.7289	5.09E-60	#N/A	26.9741	2.0365	C	MA20 0
RSWS8N 19364	RSWS8N RS19215	WP 002724495.1	2.0627	3.74E-09	#N/A	19.218	4.6073	C	dmgdh2
RSWS8N 19394	RSWS8N RS19245	WP 002724507.1	-4.0864	7.90E-63	yes	48.9222	835.923	S	gvpA1
RSWS8N 19399	RSWS8N RS19250	WP 002724509.1	-4.3273	1.01E-34	yes	14.88785	299.713	F	huH
RSWS8N 19404	RSWS8N RS19255	WP 002724511.1	-5.5356	5.13E-56	yes	14.16343	651.785	S	gvpK
RSWS8N 19409	RSWS8N RS19260	WP 002724512.1	-5.792	4.49E-50	yes	8.039109	446.626	#N/D	gvpL/F
RSWS8N 19414	RSWS8N RS19265	WP 002724513.1	-6.1674	4.96E-28	yes	9.826217	717.279	S	gvpS
RSWS8N 19419	RSWS8N RS19270	WP 002724514.1	-6.5484	4.85E-47	yes	9.460239	891.486	S	gvpL/F
RSWS8N 19424	RSWS8N RS19275	WP 002724515.1	-6.2015	3.41E-117	yes	13.14384	972.751	O	gvpL/F

RSWS8N 19429	RSWS8N RS19280	WP 002724516.1	-5.8087	3.44E-110	yes	35.69001	1992.75	S	gvpG
RSWS8N 19434	RSWS8N RS19285	WP 002724517.1	-5.8927	4.93E-129	yes	12.29521	729	J	gvpL/F
RSWS8N 19439	RSWS8N RS19290	WP 002724518.1	-5.7095	1.27E-93	yes	40.93124	2149	O	gvpH
RSWS8N 19444	RSWS8N RS19295	WP 002724519.1	-5.5597	8.70E-67	yes	46.45205	2200.6	S	gvpA2
RSWS8N 19449	RSWS8N RS19300	WP 011339430.1	-6.1725	2.95E-103	yes	24.11721	1753.15	S	gvpO
	RSWS8N RS21870	WP 081597915.1	-5.692	4.72E-96	#N/A	20.1309	1053	#N/D	#N/D
RSWS8N 19459	RSWS8N RS19305	WP 082242171.1	-4.7675	3.01E-41	yes	43.09839	1176	S	gvpN
RSWS8N 19519	RSWS8N RS19365	WP 002724556.1	-2.007	1.70E-05	#N/A	73.2935	295.06	M	-
RSWS8N 19709	RSWS8N RS19530	WP 002724636.1	-2.7869	1.57E-13	yes	1.840649	12.7964	#N/D	#N/D
RSWS8N 19719	RSWS8N RS19540	WP 002724638.1	-5.1221	4.94E-51	yes	9.959062	350.139	S	-
RSWS8N 19724	RSWS8N RS19545	WP 002724640.1	-5.4937	1.18E-69	yes	2.67181	118.462	M	-
RSWS8N 19729	RSWS8N RS19550	WP 002724642.1	-4.8379	2.33E-96	yes	3.660327	104.84	V	-
RSWS8N 19734	RSWS8N RS19555	WP 002724645.1	-5.3227	8.62E-132	yes	4.264884	171.817	O	-
RSWS8N 19739	RSWS8N RS22685	WP 002724648.1	-6.565	6.69E-71	#N/A	6.78437	643.47	#N/D	#N/D
RSWS8N 19744	RSWS8N RS19565	WP 002724649.1	-5.1979	1.52E-106	yes	0.921718	33.3761	Q	-
RSWS8N 19804	RSWS8N RS19625	WP 002724672.1	2.8613	0.00101041	yes	6.836253	0.95104	S	-
	RSWS8N RS19635		2.0777	0.0016789	#N/A	2.10783	0.4945	#N/D	#N/D
RSWS8N 19864	RSWS8N RS19680	WP 002724684.1	-6.4705	1.85E-128	yes	47.90039	4255.85	N	flaA
RSWS8N 19869	RSWS8N RS19685	WP 012642306.1	-6.59	4.11E-131	yes	13.93183	1349.07	N	flaF
RSWS8N 19874	RSWS8N RS19690	WP 002724687.1	-6.3949	4.18E-234	yes	9.136171	769.791	N	flbT
RSWS8N 19879	RSWS8N RS19695	WP 002724689.1	-6.7425	1.14E-92	yes	3.278629	358.521	S	-
RSWS8N 20139	RSWS8N RS19945	WP 002724790.1	-2.8362	0.00037226	yes	0.400024	2.70251	S	-
RSWS8N 20234	RSWS8N RS20035	WP 002724827.1	2.94817	8.60E-05	yes	5.621438	0.72625	C	-
RSWS8N 20404	RSWS8N RS20195	WP 002724880.1	-2.875	1.22E-07	#N/A	0.38149	2.8212	EP	-
RSWS8N 20409	RSWS8N RS20200	WP 002724882.1	-2.261	0.0001398	#N/A	1.21926	5.8896	F	-
RSWS8N 20524	RSWS8N RS20315	WP 002724921.1	-2.711	8.91E-15	yes	5.391843	35.6502	L	-
RSWS8N 20584	RSWS8N RS20375	WP 002724945.1	-3.3426	1.23E-10	yes	4.085498	42.3365	#N/D	mcp
RSWS8N 20589	RSWS8N RS20380	WP 002724946.1	-3.1754	7.57E-13	yes	10.29864	93.8106	T	-
RSWS8N 20674	RSWS8N RS20465	WP 002724964.1	2.4739	4.42E-39	#N/A	325.608	58.659	T	-
RSWS8N 20679	RSWS8N RS20470	WP 002724966.1	2.8646	1.32E-38	#N/A	240.551	33.058	K	-
RSWS8N 20744	RSWS8N RS20530	WP 002724990.1	3.02086	0.00035301	yes	9.398547	1.15762	-	-
RSWS8N 20904	RSWS8N RS20690	WP 002725022.1	-5.264	1.04E-06	#N/A	0.03706	1.7228	P	glnP
RSWS8N 21104	RSWS8N RS20890	WP 002725087.1	-2.381	0.0011328	#N/A	0.27592	1.5198	C	-
RSWS8N 21139	RSWS8N RS20925	WP 082242204.1	-3.4748	1.72E-16	yes	2.226491	25.0966	M	-
RSWS8N 21144	RSWS8N RS20930	WP 002725103.1	-3.0461	2.82E-23	yes	5.916975	48.5649	-	-
RSWS8N 21149	RSWS8N RS20935	WP 002725106.1	-3.2974	1.09E-37	yes	2.482765	24.48	M	-
RSWS8N 21154	RSWS8N RS20940	WP 002725108.1	-3.4	2.48E-45	#N/A	6.04037	64.465	#N/D	#N/D
RSWS8N 21159	RSWS8N RS20945	WP 011331295.1	-4.842	2.79E-54	#N/A	11.5208	332.31	M	-
RSWS8N 21189	RSWS8N RS20975	WP 002725122.1	-6.865	1.26E-05	#N/A	0.04547	2.9211	-	-

Tabla S3. Reguladores transcripcionales que forman parte del regulón de CerN

Se indican los genes que son parte del regulón de CtrA (Log2FC = +/-1).

old_ID	new_ID	prot_ID	log2FC	padj	*CtrA	FPKM			Name	Description
						DcerN/ cerM	AM1/ pRK	COG		

RSWS8N_03 320	RSWS8N_RS0 3290	WP_00271977 0.1	-3.664	1.19E-19	#N/A	170.29469	2160.8405	K	ctrA	Two component transcriptional regulator, winged helix family
RSWS8N_09 675	RSWS8N_RS0 9615	WP_00272103 9.1	2.3154	4.06E-07	#N/A	110.6934	22.263182	K	acnR	AefR-like transcriptional repressor, C-terminal region
RSWS8N_14 710	RSWS8N_RS1 4655	WP_00272281 8.1	5.1042	8.65E-17	#N/A	78.414648	2.2853425	K	-	Transcriptional regulator
	RSWS8N_RS1 5160	WP_08224212 6.1	2.8677	3.28E-11	#N/A	23.277871	3.1872514	K	-	LuxR transcriptional regulator
RSWS8N_15 394	RSWS8N_RS1 5240	WP_01133953 0.1	5.4349	4.15E-39	#N/A	46.324541	1.0700723	K	-	LuxR transcriptional regulator
RSWS8N_16 384	RSWS8N_RS1 6240	WP_00272345 6.1	2.416	0.0013957	#N/A	5.0098956	0.9445769	K	-	Transcriptional regulator, gntR family
RSWS8N_16 459	RSWS8N_RS1 6315	WP_00272348 8.1	2.4612	5.48E-25	#N/A	26.558368	4.8346941	K	torR	Transcriptional regulatory protein, C terminal
RSWS8N_17 824	RSWS8N_RS1 7685	WP_00272397 8.1	2.7237	1.28E-16	#N/A	96.56379	14.631048	KT	-	Transcriptional regulator with a LuxR-type HTH domain
RSWS8N_20 679	RSWS8N_RS2 0470	WP_00272496 6.1	2.8646	1.32E-38	#N/A	240.55141	33.057979	K	-	Transcriptional regulator
RSWS8N_18 024	RSWS8N_RS1 7890	WP_00272403 3.1	-3.018	0.0010576	#N/A	1.6094858	13.303488	K	-	Prophage antirepressor

**Tabla S4. Regiones regulatorias con sitios de unión similares a GtaR**

Las regiones probadas por EMSA están resaltadas con un fondo amarillo. Los motivos utilizados para la construcción de los LOGOs están indicados con una "X".

Región	New_ID	Old_ID	start	end	score	strand	Motif	log2FC	Figure 9	Figure A9
1	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	170	191	14.3	+	GACATATCCAAAAAGACAGGTT	5.104	X	X
	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	170	191	14.2	-	AACCTGTCTTTTGGATATGTC	5.104		
	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	156	177	10.7	-	GATATGCCATTCATACAAGCT	5.104		
	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	156	177	10.6	+	AGCTTGTATGAATGGACATAIC	5.104	X	
	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	186	207	8	-	AACTTGTCTTGAAACAAACCTG	5.104		
	RSWS8N_RS14655	RSWS8N_14710	186	207	7.5	+	CAGGTTTGTTCGAAGACAAGTT	5.104	X	

2	RSWS8N RS17685	RSWS8N 17824	129	150	11.4	+	ACCGGGTCTTTTAGACAGGTC	2.724	X	X
	RSWS8N RS17685	RSWS8N 17824	129	150	11.8	-	GACCTGTCTAAAAAGACCCGGT	2.724		
3	RSWS8N RS07420	RSWS8N 07465	197	218	8.8	+	GGCTGTCCGTTTGGGCAGGTC	3.866	X	X
	RSWS8N RS07420	RSWS8N 07465	197	218	8.6	-	GACCTGCCCAAACCGACAGGC C	3.866		
4	RSWS8N RS06335	RSWS8N 06370	18	39	8.3	-	GACATGACGGTCTCGACCCGGTC	-3.319		X
	RSWS8N RS06335	RSWS8N 06370	18	39	8.2	+	GACCCGGTCGAGACCCGTCATGTC	-3.319		
	RSWS8N RS06335	RSWS8N 06370	51	72	8.1	-	TATGTGTCCACTTAACCTTCTT	-3.319		
	RSWS8N RS06335	RSWS8N 06370	51	72	8	+	AAGAAGGTTAAGTGGACACATA	-3.319		
5	RSWS8N RS09680	RSWS8N 09740	157	178	7.8	+	TATACCTCACAAAAGGTIAGCTT	2.104		X
	RSWS8N RS09680	RSWS8N 09740	157	178	7.8	-	AAGCTAACCTTTGTGAGGTATA	2.104		
6	RSWS8N RS15240	RSWS8N 15394	175	196	7.7	-	CAICTGGTCAAAAAATAAGTT	5.435	X	X
	RSWS8N RS15240	RSWS8N 15394	163	184	7.6	-	AAAATAAGTTATTACATGGGCT	5.435		
	RSWS8N RS15240	RSWS8N 15394	163	184	7.3	+	AGCCCAITGAATAACTIATTTT	5.435		
7	RSWS8N RS17885	RSWS8N 18019	240	261	7.6	+	TACCTATCCTTTAACCGTAATC	-3.163		X
	RSWS8N RS17885	RSWS8N 18019	240	261	7.5	-	GATACGGTTAAAGGATAGGTA	-3.163		
8	RSWS8N RS20940	RSWS8N 21154	106	127	7.1	-	AACATGTGATGAAAGTTCTGGT	-3.4		X
	RSWS8N RS20945	RSWS8N 21159	215	236	7.1	+	AACATGTGATGAAAGTTCTGGT	-3.4		
9	RSWS8N RS02960	RSWS8N 02995	22	43	6.9	-	TCTACGGCCTATAGGACCGATC	2.594		X
INCLUDED	RSWS8N RS13885	RSWS8N 13935	127	148	5.1	+	CACCATTGCCAAAAACGTGTT	-1.5828	X	X

## Referencias

1. Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165><https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>
2. Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(9), 685–695.  
<https://doi.org/10.1038/nrm907>
3. Kempner, E. S., & Hanson, F. E. (1968). Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 95(3), 975–979.  
<https://doi.org/10.1128/jb.95.3.975-979.1968>
4. Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313–322. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>
5. Eberhard, A. (1972). Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 109(3), 1101–1105.
6. Nealson, K. H. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Archives of Microbiology*, 112(1), 73–79.  
<https://doi.org/10.1007/BF00446657>
7. Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20(9), 2444–2449.  
<https://doi.org/10.1021/bi00512a013>
8. Monnet, V., & Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: “cherchez le peptide.” *Molecular Microbiology*, 97(2), 181–184.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13060>
9. Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., & Greenberg, E. P. (1996).

- Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9505–9509.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9505>
10. Lupp, C., & Ruby, E. G. (2005). *Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3620–3629. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3620-3629.2005>
  11. West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 369–376. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01852-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01852-7)
  12. Le, K. Y., & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1174. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
  13. Engebrecht, J., Nealson, K., & Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32(3), 773–781. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90063-6)
  14. Hanzelka, B. L., & Greenberg, E. P. (1995). Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 815–817.
  15. Verma, S. C., & Miyashiro, T. (2013). Quorum Sensing in the Squid-*Vibrio* Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16386–16401. <https://doi.org/10.3390/ijms140816386>
  16. Ray, V. A., & Visick, K. L. (2012). LuxU Connects Quorum Sensing to Biofilm Formation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 86(4), 954–970. <https://doi.org/10.1111/mmi.12035>
  17. Lorenz, N., Shin, J. Y., & Jung, K. (2017). Activity, Abundance, and Localization of Quorum Sensing Receptors in *Vibrio harveyi*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 634. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00634>
  18. Zhang, L., Li, S., Liu, X., Wang, Z., Jiang, M., Wang, R., Xie, L., Liu, Q., Xie, X., Shang,

- D., Li, M., Wei, Z., Wang, Y., Fan, C., Luo, Z.-Q., & Shen, X. (2020). Sensing of autoinducer-2 by functionally distinct receptors in prokaryotes. *Nature Communications*, 11(1), 5371. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19243-5>
19. Miyashiro, T., Wollenberg, M. S., Cao, X., Oehlert, D., & Ruby, E. G. (2010). A single qrr gene is necessary and sufficient for LuxO-mediated regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1556–1567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07309.x>
20. Fidopiastis, P. M., Miyamoto, C. M., Jobling, M. G., Meighen, E. A., & Ruby, E. G. (2002). LitR, a new transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. *Molecular Microbiology*, 45(1), 131–143. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02996.x>
21. Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2006). Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing. *Cell*, 126(6), 1095–1108. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.032>
22. Lang, J., & Faure, D. (2014). Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00014>
23. Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P., & Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *The EMBO Journal*, 21(17), 4393–4401. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf459>
24. Zhu, J., & Winans, S. C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1507–1512. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1507>
25. Swiderska, A., Berndtson, A. K., Cha, M. R., Li, L., Beaudoin, G. M., Zhu, J., & Fuqua, C. (2001). Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator.

- Interactions with the TraM anti-activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49449–49458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107881200>
26. Costa, E. D., Chai, Y., & Winans, S. C. (2012). The quorum-sensing protein TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is susceptible to intrinsic and TraM-mediated proteolytic instability. *Molecular Microbiology*, 84(5), 807–815. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08037.x>
27. Chai, Y., Zhu, J., & Winans, S. C. (2001). TrlR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrlR:TraR dimers. *Molecular Microbiology*, 40(2), 414–421. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02385.x>
28. Miranda, S. W., Asfahl, K. L., Dandekar, A. A., & Greenberg, E. P. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1386, 95–115. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_4)
29. Ding, F., Oinuma, K.-I., Smalley, N. E., Schaefer, A. L., Hamwy, O., Greenberg, E. P., & Dandekar, A. A. (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* Orphan Quorum Sensing Signal Receptor QscR Regulates Global Quorum Sensing Gene Expression by Activating a Single Linked Operon. *mBio*, 9(4), e01274-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01274-18>
30. Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N., & Lazdunski, A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: Interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Molecular Microbiology*, 48(1), 199–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03423.x>
31. Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N., & Chatterjee, A. K. (2005). ExpR, a LuxR Homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*, Activates Transcription of *rsmA*, Which Specifies a Global Regulatory RNA-Binding Protein. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4792–4803. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4792-4803.2005>
32. Brilli, M., Fondi, M., Fani, R., Mengoni, A., Ferri, L., Bazzicalupo, M., & Biondi, E. G.

- (2010). The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: A comparative genomic analysis. *BMC Systems Biology*, 4, 52.  
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-52>
33. Mann, T. H., Seth Childers, W., Blair, J. A., Eckart, M. R., & Shapiro, L. (2016). A cell cycle kinase with tandem sensory PAS domains integrates cell fate cues. *Nature Communications*, 7, 11454. <https://doi.org/10.1038/ncomms11454>
34. Quon, K. C., Marczyński, G. T., & Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, 84(1), 83–93.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80995-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80995-2)
35. Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L., & McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4632–4637. <https://doi.org/10.1073/pnas.062065699>
36. Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L., & Marczyński, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 120–125. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.120>
37. Mercer, R. G., Callister, S. J., Lipton, M. S., Pasa-Tolic, L., Strnad, H., Paces, V., Beatty, J. T., & Lang, A. S. (2010). Loss of the response regulator CtrA causes pleiotropic effects on gene expression but does not affect growth phase regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2701–2710.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00160-10>
38. Urvoy, M., Labry, C., L'Helguen, S., & Lami, R. (2022). Quorum Sensing Regulates Bacterial Processes That Play a Major Role in Marine Biogeochemical Cycles. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.834337>
39. Koppenhöfer, S., Wang, H., Scharfe, M., Kaefer, V., Wagner-Döbler, I., & Tomasch, J. (2019). Integrated Transcriptional Regulatory Network of Quorum Sensing, Replication Control, and SOS Response in *Dinoroseobacter shibae*. *Frontiers in*

- Microbiology*, 10, 803. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00803>
40. Leung, M. M., Brimacombe, C. A., & Beatty, J. T. (2013). Transcriptional regulation of the *Rhodobacter capsulatus* response regulator CtrA. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 1), 96–106. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062349-0>
41. Zan, J., Heindl, J. E., Liu, Y., Fuqua, C., & Hill, R. T. (2013). The CckA-ChpT-CtrA phosphorelay system is regulated by quorum sensing and controls flagellar motility in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *PLoS One*, 8(6), e66346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066346>
42. Zan, J., Cicirelli, E. M., Mohamed, N. M., Sibhatu, H., Kroll, S., Choi, O., Uhlson, C. L., Wysoczynski, C. L., Murphy, R. C., Churchill, M. E. A., Hill, R. T., & Fuqua, C. (2012). A complex LuxR-LuxI type quorum sensing network in a roseobacterial marine sponge symbiont activates flagellar motility and inhibits biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 85(5), 916–933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08149.x>
43. Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B. J., Koblizek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., & Wagner-Döbler, I. (2005). *Dinoroseobacter shibae* gen. Nov., sp. Nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 3), 1089–1096. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63511-0>
44. Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerdt, G., Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.-P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., ... Simon, M. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: A hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME Journal*, 4(1), 61–77. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.94>
45. Patzelt, D., Wang, H., Buchholz, I., Rohde, M., Gröbe, L., Pradella, S., Neumann, A., Schulz, S., Heyber, S., Münch, K., Münch, R., Jahn, D., Wagner-Döbler, I., & Tomasch, J. (2013). You are what you talk: Quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *The ISME Journal*,

- 7(12), 2274–2286. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.107>
46. I, W.-D., V, T., L, E., M, A., A, B., S, M., S, E., A, H., R, P., & S, S. (2005). Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1002/cbic.200500189>
47. Wang, H., Ziesche, L., Frank, O., Michael, V., Martin, M., Petersen, J., Schulz, S., Wagner-Döbler, I., & Tomasch, J. (2014). The CtrA phosphorelay integrates differentiation and communication in the marine alphaproteobacterium *Dinoroseobacter shibae*. *BMC Genomics*, 15(1), 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-130>
48. Schaefer, A. L., Taylor, T. A., Beatty, J. T., & Greenberg, E. P. (2002). Long-Chain Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Regulation of *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Production. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6515–6521. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6515-6521.2002>
49. Leung, M. M., Brimacombe, C. A., Spiegelman, G. B., & Beatty, J. T. (2012). The GtaR protein negatively regulates transcription of the gtaRI operon and modulates gene transfer agent (RcGTA) expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, 83(4), 759–774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07963.x>
50. Fogg, P. C. M. (2019). Identification and characterization of a direct activator of a gene transfer agent. *Nature Communications*, 10(1), 595. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08526-1>
51. Brimacombe, C. A., Stevens, A., Jun, D., Mercer, R., Lang, A. S., & Beatty, J. T. (2013). Quorum-sensing regulation of a capsular polysaccharide receptor for the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent (RcGTA). *Molecular Microbiology*, 87(4), 802–817. <https://doi.org/10.1111/mmi.12132>
52. Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S., & Schaefer, A. L. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7530–7537.

<https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7530-7537.1997>

53. McIntosh, M., Eisenhardt, K., Remes, B., Konzer, A., & Klug, G. (2019). Adaptation of the Alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* to stationary phase. *Environmental Microbiology*, 21(11), 4425–4445. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14809>
54. Lee, J.-K., Kho, D.-H., Jang, J.-H., Kim, H.-S., & Kim, K.-S. (2003). Quorum Sensing of *Rhodobacter sphaeroides* Negatively Regulates Cellular Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Content Under Aerobic Growth Conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(3), 477–481.
55. Ye, J.-Y., Liu, T., Chen, Y., Liao, Q., Wang, Z.-K., & Chen, G.-C. (2013). Effect of Al crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15770–15776. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.141>
56. Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G., Vinuesa, P., & Camarena, L. (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3208–3216. <https://doi.org/10.1128/JB.01681-06>
57. Armitage, J. P., & Macnab, R. M. (1987). Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 169(2), 514–518. <https://doi.org/10.1128/jb.169.2.514-518.1987>
58. Vega-Baray, B., Domenzain, C., Rivera, A., Alfaro-López, R., Gómez-César, E., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2015). The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 833–847. <https://doi.org/10.1128/JB.02429-14>
59. Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Molecular Microbiology*, 58(4), 969–983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04900.x>

60. del Campo, A. M., Ballado, T., de la Mora, J., Poggio, S., Camarena, L., & Dreyfus, G. (2007). Chemotactic Control of the Two Flagellar Systems of *Rhodobacter sphaeroides* Is Mediated by Different Sets of CheY and FliM Proteins. *Journal of Bacteriology*, *189*(22), 8397–8401. <https://doi.org/10.1128/JB.00730-07>
61. Rivera-Osorio, A., Osorio, A., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2018). Architecture of divergent flagellar promoters controlled by CtrA in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Microbiology*, *18*, 129. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1264-y>
62. Hernandez-Valle, J., Domenzain, C., de la Mora, J., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2017). The Master Regulators of the Fla1 and Fla2 Flagella of *Rhodobacter sphaeroides* Control the Expression of Their Cognate CheY Proteins. *Journal of Bacteriology*, *199*(5), e00670-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00670-16>
63. Hernández-Valle, J., Sanchez-Flores, A., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2020). The CtrA Regulon of *Rhodobacter sphaeroides* Favors Adaptation to a Particular Lifestyle. *Journal of Bacteriology*, *202*(7), e00678-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00678-19>
64. Siström, W. R. (1962). The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of General Microbiology*, *28*, 607–616. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-4-607>
65. Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, *2*(8), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
66. Eddy, S. R. (2009). A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics*, *23*(1), 205–211.
67. Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology*, *20*(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>
68. Oberto, J. (2013). SyntTax: A web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC*

*Bioinformatics*, 14, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>

69. Harlow, E., Lane, D.P., 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.