



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

# **IMPLICACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LA PATOGÉNESIS BACTERIANA**

Jordi Corral Sábado

**Tesis Doctoral**

Octubre, 2020

Directores: Dr. Jordi Barbé García y Dr. Jesús Aranda Rodríguez

Departament de Genètica i Microbiologia - Facultat de Biociències



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**





Universitat Autònoma  
de Barcelona

Memoria presentada por **Jordi Corral Sábado** para optar al grado de  
Doctor en el Programa de Doctorado en Microbiología por la  
Universitat Autònoma de Barcelona.

Jordi Corral Sábado

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Jordi Barbé García y el Dr.  
Jesús Aranda Rodríguez.

Dr. Jordi Barbé García

Dr. Jesús Aranda Rodríguez

Bellaterra, octubre de 2020



*A mis padres y a mi hermano*



## RESUMEN

*Acinetobacter baumannii* y *Ralstonia solanacearum* son dos especies bacterianas patógenas, filogenéticamente no relacionadas, que en los últimos años han adquirido una gran relevancia debido al impacto sanitario y agroalimentario que, respectivamente, causan en todo el mundo. Por un lado, *A. baumannii* provoca infecciones nosocomiales que, junto al aumento de cepas multirresistentes, hacen que algunas de estas infecciones sean prácticamente intratables. Por otro lado, *R. solanacearum* es responsable de la marchitez bacteriana, una enfermedad letal que afecta a más de 200 especies vegetales, disminuyendo la producción de numerosos cultivos de interés para la industria agroalimentaria.

Una característica común de ambos microorganismos es su capacidad de moverse. *A. baumannii* puede desplazarse, en función de la cepa, a través del movimiento asociado a los pili de tipo IV, conocido como *twitching*; o mediante un movimiento independiente de apéndices denominado *surface-associated motility*. En el caso de *R. solanacearum*, esta especie exhibe los movimientos *twitching* y *swimming*, este último asociado a flagelos. Al ser la motilidad bacteriana determinante para la virulencia de muchos patógenos, el objetivo global de la presente Tesis Doctoral es la identificación de genes implicados en la motilidad de ambos microorganismos, permitiendo así establecer nuevas dianas terapéuticas.

En la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978, capaz de desplazarse exclusivamente mediante *surface-associated motility*, se evaluó la implicación en este proceso de las proteínas RecA (regulador positivo del sistema SOS) y A1S\_2813 (análoga al componente quimiotáctico CheW). Los estudios realizados mostraron que ambas proteínas están involucradas en el *surface-associated motility*, la respuesta quimiotáctica y la virulencia. Además, estas funciones son llevadas a cabo a través de la interacción específica entre ambas proteínas.

Por otro lado, en *R. solanacearum* GMI1000 se evaluó la función de las proteínas PilI y ChpA, ambas análogas a los componentes del sistema quimiotáctico flagelar CheW y CheA, respectivamente, y a su vez homólogas a componentes del sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV. Los resultados obtenidos determinaron la implicación de ambas proteínas en la motilidad *twitching*, la capacidad para incorporar DNA a través de la transformación natural, la formación de biofilm, la adherencia a raíces de tomatera y la virulencia. Paralelamente, los resultados obtenidos con los mutantes deficientes en los genes que codifican las subunidades de pilina (PilA) y flagelina (FliC) permitieron establecer que, PilA está involucrado en la motilidad *swimming*, mientras que FliC participa en la formación del biofilm y en la adhesión a raíces de tomatera.



Los resultados de la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia de la motilidad bacteriana en el proceso patogénico tanto de *A. baumannii* como de *R. solanacearum*, abriendo nuevos frentes de investigación para su utilización como dianas terapéuticas.

## RESUM

*Acinetobacter baumannii* i *Ralstonia solanacearum* són dues espècies de bacteris patògens filogenèticament no relacionats que, en els últims anys, han adquirit una gran rellevància a causa de l'impacte sanitari i agroalimentari que, respectivament, causen en tot el món. D'una banda, *A. baumannii* provoca infeccions nosocomials que, juntament amb l'augment de soques multiresistents, fan que algunes d'aquestes infeccions siguin pràcticament intractables. D'altra banda, *R. solanacearum* és l'agent causal del marciment bacterià, una malaltia letal que afecta a més de 200 espècies vegetals, disminuint la producció de nombrosos cultius d'interès per a la indústria agroalimentària.

Una característica comuna de tots dos microorganismes és la seva capacitat de moure's. *A. baumannii* pot desplaçar-se a través del moviment associat a pili de tipus IV, conegut com *twitching*; o mitjançant el moviment independent d'apèndixs, denominat *surface-associated motility*. En el cas de *R. solanacearum*, aquesta espècie exhibeix els moviments *twitching* i *swimming*, aquest últim associat a flagels. A l'ésser la motilitat bacteriana determinant per a la virulència de molts patògens, l'objectiu global de la present Tesi Doctoral és la identificació de gens implicats en la motilitat de tots dos microorganismes, permetent així identificar noves dianes terapèutiques.

A la soca d'*A. baumannii* ATCC 17978, capaç de desplaçar-se exclusivament mitjançant *surface-associated motility*, es va avaluar la implicació en aquest procés de les proteïnes RecA (regulador positiu de sistema SOS) i A1S\_2813 (anàloga al component quimiotàctic CheW). Els resultats obtinguts van mostrar que les dues proteïnes estan involucrades en la motilitat *surface-associated motility*, la resposta quimiotàctica i la virulència. A més, aquestes funcions són dutes a terme mitjançant la interacció específica entre les dues proteïnes.

D'altra banda, a la soca de *R. solanacearum* GMI1000 es va avaluar la funció de les proteïnes PilI i ChpA, totes dues anàlogues als components del sistema quimiotàctic flagel·lar CheW i CheA, respectivament, i alhora homòlogues a components de sistema quimiotàctic associat a pili de tipus IV. Els resultats obtinguts van evidenciar la implicació de totes dues proteïnes a la motilitat *twitching*, la capacitat per transformar DNA de forma natural, de formar biofilm, d'adherir-se a les arrels de tomaquera i a la virulència. Paral·lelament, els estudis realitzats amb els mutants deficientes dels gens que codifiquen les subunitats de pilina (PilA) i flagelina (FliC) van permetre determinar que, d'una banda, PilA està involucrat en la motilitat *swimming*, mentre que FliC participa en els processos de formació del biofilm i en l'adhesió a les arrels de tomaquera.

Els resultats de la present Tesi Doctoral posen de manifest la importància de la motilitat bacteriana en el procés patogènic tant d'*A. baumannii* com de *R. solanacearum*.

A més, la identificació de nous gens implicats en els sistemes descrits obre nous fronts de recerca per a la seva utilització com a dianes terapèutiques.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* and *Ralstonia solanacearum* are two pathogenic bacterial species that, despite not being phylogenetically related, have acquired a great relevance in recent years, due to the sanitary and agri-food impact worldwide, respectively. On the one hand, *A. baumannii* causes nosocomial infections that, with an increasing number of multidrug resistant strains, some of these infections turn practically intractable. On the other hand, *R. solanacearum* is responsible of bacterial wilt, a devastating disease that affects more than 200 plant species, decreasing the production of many crops of interest for the agri-food industry.

A common characteristic of both microorganisms is their ability to move. *A. baumannii* is able to move through type IV pili-associated motility called twitching, or by using an appendage-independent movement known as surface-associated motility. In the case of *R. solanacearum*, this species exhibits twitching and the flagella-associated motility called swimming. As bacterial motility is a determinant factor for the virulence of many pathogens, the main objective of this Doctoral Thesis is the identification of novel genes involved in the motility of both pathogens, which might allow the identification of therapeutic targets.

In *A. baumannii* strain ATCC 17978, which is able to move exclusively through surface-associated motility, the involvement in motility of the RecA (positive regulator of the SOS system) and the A1S\_2813 (analogous to the CheW chemotactic component) proteins was evaluated. Results obtained revealed that both proteins are involved in surface-associated motility, the chemotactic response and virulence. Furthermore, these functions are carried out through the specific interaction between both proteins.

On the other hand, in *R. solanacearum* strain GMI1000, the function of the PilI and ChpA proteins, both analogous to the CheW and CheA components of the flagellar-chemotactic system, respectively, and homologous to components of the type IV pili-associated chemotactic system, was evaluated. Results obtained determined the involvement of both proteins in twitching motility, the ability to transform DNA naturally, the biofilm formation, the root attachment and the virulence. Simultaneously, analysis of the mutants deficient for the genes encoding the pilin (PilA) and flagellin (FliC) subunits showed that, while PilA is involved in swimming motility, FliC participates in the biofilm formation and tomato-root attachment processes.

The results of this Doctoral Thesis demonstrate the importance of bacterial motility in the pathogenic process of both *A. baumannii* and *R. solanacearum*. Furthermore, the identification of new genes involved in the described systems opens up new research fronts for their usage as therapeutic targets.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Motilidad bacteriana</b> .....	3
<b>1.1.1. Sistemas de motilidad bacteriana</b> .....	3
<b>1.1.1.1. Movimientos asociados a flagelos bacterianos</b> .....	4
i) <i>Swimming</i> .....	6
ii) <i>Swarming</i> .....	6
<b>1.1.1.2. Pili de tipo IV y movimiento <i>twitching</i></b> .....	7
<b>1.1.1.3. Desplazamientos no dependientes de apéndices</b> .....	11
i) <i>Gliding</i> .....	11
ii) <i>Sliding</i> .....	12
iii) <i>Darting</i> .....	13
iv) <i>Kink propagation</i> .....	14
v) <i>Surface-associated motility</i> .....	14
<b>1.1.2. Regulación de la motilidad</b> .....	16
<b>1.1.2.1. <i>Quorum sensing</i></b> .....	16
<b>1.1.2.2. Diguanilato cíclico</b> .....	17
<b>1.1.2.3. Sistemas de dos componentes</b> .....	19
<b>1.1.2.4. El sistema quimiotáctico</b> .....	20
i) Quimiotaxis asociada a flagelos.....	21
ii) Quimiotaxis asociada a pili de tipo IV.....	24
iii) Otros sistemas de quimiotaxis no asociados a apéndices .....	25
<b>1.1.3. Papel de la motilidad en la virulencia bacteriana</b> .....	26
<b>1.2. Patogénesis bacteriana y la resistencia antimicrobiana</b> .....	27
<b>1.2.1. Los ESKAPE y otras bacterias multirresistentes</b> .....	28
<b>1.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i></b> .....	32
<b>1.2.2.1. El género <i>Acinetobacter</i></b> .....	32
<b>1.2.2.2. Patología asociada a infecciones por <i>A. baumannii</i></b> .....	33
<b>1.2.2.3. Determinantes de patogenicidad y regulación</b> .....	35
i) Factores de virulencia .....	35
ii) Regulación de la virulencia .....	40
<b>1.2.2.4. La motilidad en <i>A. baumannii</i></b> .....	42
<b>1.3. Fitopatogénesis bacteriana</b> .....	44
<b>1.3.1. Principales fitopatógenos de impacto agroalimentario</b> .....	44

<b>1.3.2. <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	47
<b>1.3.2.1.</b> El complejo de especies de <i>R. solanacearum</i> .....	47
<b>1.3.2.2.</b> Ciclo de vida y marchitez bacteriana .....	49
<b>1.3.2.3.</b> Determinantes de patogenicidad y regulación.....	52
<b>i)</b> Factores de virulencia .....	52
<b>ii)</b> Regulación de la virulencia .....	56
<b>1.3.2.4.</b> La motilidad en <i>R. solanacearum</i> .....	58
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	61
<b>3. RESULTADOS</b> .....	65
<b>3.1.</b> Importancia de la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like en la motilidad, quimiotaxis y virulencia de <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 .....	67
<b>3.2.</b> Papel de los movimientos <i>twitching</i> y <i>swimming</i> en la patogenicidad de <i>R.</i> <i>solanacearum</i> .....	86
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	113
<b>4.1.</b> Evaluación de la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like de <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 y su efecto en la motilidad, quimiotaxis y virulencia .....	116
<b>4.2.</b> Identificación del operón <i>pil-chp</i> en <i>R. solanacearum</i> involucrado en la motilidad <i>twitching</i> .....	120
<b>4.3.</b> Caracterización de los mutantes deficientes en motilidad y su efecto en la patogénesis de <i>R. solanacearum</i> .....	122
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>6. ANEXOS</b> .....	131
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	179
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b> .....	201

# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Motilidad bacteriana

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares percibidos comúnmente como individuos dispersos en ambientes plantónicos. Sin embargo, estos organismos son capaces de relacionarse como grupo y establecer colonias en superficies diversas, permitiendo optimizar su crecimiento, acceder más fácilmente a nutrientes y establecer mecanismos defensivos contra la desecación o compuestos adversos. Uno de los mecanismos por los cuales algunas bacterias son capaces de interaccionar dinámicamente con su alrededor es su capacidad de moverse (Miyata *et al.* 2020; Kearns 2010).

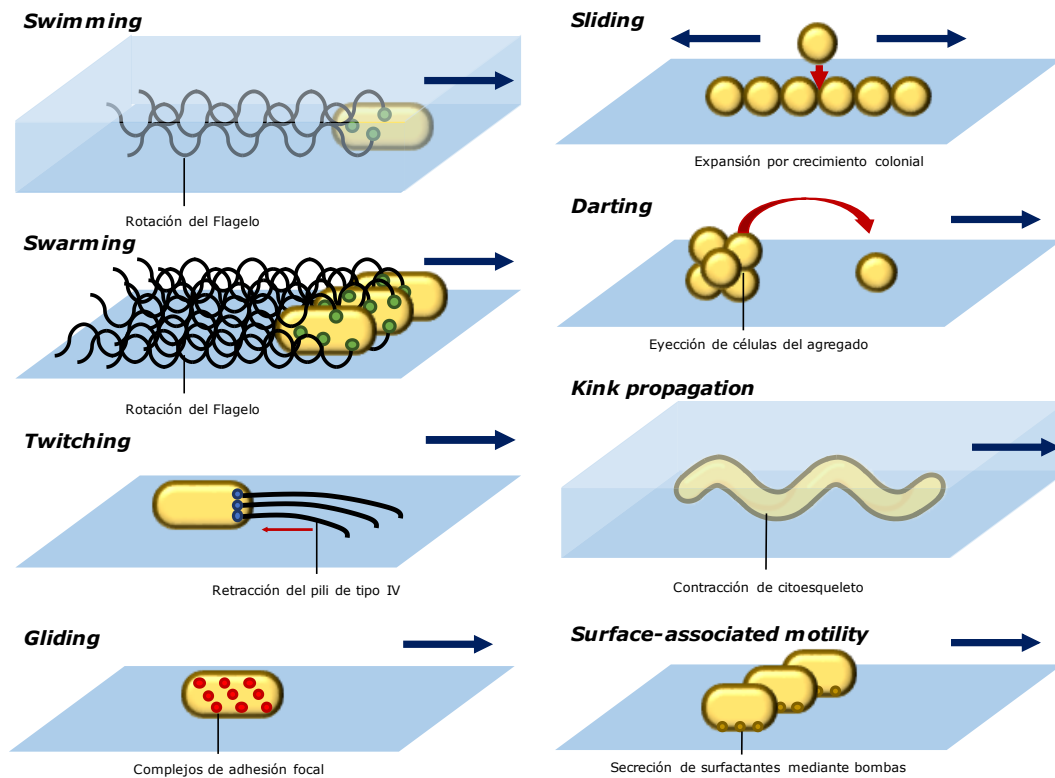
La motilidad bacteriana es el mecanismo que permite a las bacterias, establecerse en un nicho ecológico, colonizar regiones más favorables o evadir condiciones de estrés (Harshey 2003; Nan y Zusman 2016; Persat *et al.* 2015). Así pues, para muchas bacterias, la motilidad es esencial para el crecimiento, la supervivencia, la interacción con células de la misma o diferente especie y la virulencia (Persat *et al.* 2015; Nan y Zusman 2016; Jarrell y McBride 2008).

#### 1.1.1. Sistemas de motilidad bacteriana

Del mismo modo que la diversidad de entornos naturales es muy heterogénea, las bacterias pueden presentar diversos sistemas de motilidad para adaptarse a las distintas condiciones y, a su vez, la misma especie bacteriana puede presentar uno o varios de estos sistemas. A continuación, se detallan brevemente las características principales de los distintos mecanismos de motilidad bacteriana conocidos (Harshey 2003; Jarrell y McBride 2008; Miyata *et al.* 2020). Dicha clasificación se muestra en la Tabla 1.1, junto a la representación de cada tipo de movimiento en la Figura 1.1.

**Tabla 1.1** Clasificación de los diferentes tipos de motilidad en función de la maquinaria motriz. Basado en datos de Harshey (2003), Pollitt y Diggle (2017) y Harding (2018).

Estructura implicada	Tipo de motilidad	Velocidad ( $\mu\text{m/s}$ )	Géneros bacterianos representativos
<b>Flagelo</b>	<i>Swimming</i>	>40	<i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Ralstonia</i>
	<i>Swarming</i>	2-10	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> y <i>Yersinia</i>
<b>Pili de tipo IV</b>	<i>Twitching</i>	0,06-0,3	<i>Aeromonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Legionella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> y <i>Vibrio</i>
	<i>Gliding</i>	0,025-10	<i>Myxococcus</i> , <i>Flavobacterium</i> y <i>Mycoplasma</i>
<b>No asociado a apéndices</b>	<i>Sliding</i>	0,03-6	<i>Streptococcus</i> y <i>Staphylococcus</i>
	<i>Darting</i>	1-2	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Kink propagation</i>	12	<i>Spiroplasma</i>
	<i>Surface-associated motility</i>	0,5	<i>Acinetobacter</i>



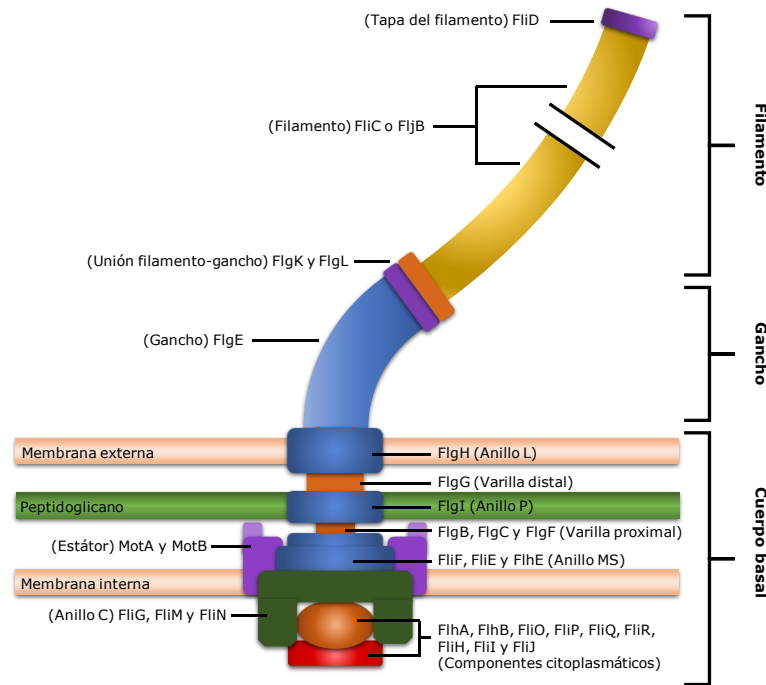
**Figura 1.1** Representación de los diferentes tipos de motilidad: dependiente de flagelos (*swimming* y *swarming*), pili de tipo IV (*twitching*) o independiente de apéndices (*gliding*, *sliding*, *darting*, *kink propagation* y *surface-associated motility*). Modificado de Kearns (2010).

### 1.1.1.1. Movimientos asociados a flagelos bacterianos

El flagelo bacteriano es un apéndice anclado por un extremo a la pared bacteriana y libre por el otro. Está constituido por más treinta proteínas para que, en su conjunto, permitan la rotación del extremo libre, produciendo la fuerza de propulsión necesaria para el desplazamiento bacteriano (Erhardt 2016; Bardy *et al.* 2003). Tanto la localización como el número de flagelos puede variar en función de la especie bacteriana, presentando uno o varios flagelos distribuidos a lo largo de toda la superficie o bien concentrados en uno o los dos polos celulares (Bardy *et al.* 2003). Algunas especies del grupo de las espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* presentan un flagelo especializado conocido como filamento axial o flagelo periplasmático cuyo extremo libre se localiza dentro del espacio periplasmático (Charon y Goldstein 2002).

Dentro del dominio *Bacteria*, pueden encontrarse especies flageladas prácticamente en todos los filos descritos, lo que supondría la aparición evolutiva del flagelo bacteriano en etapas muy tempranas (Miyata *et al.* 2020). No obstante, la estructura modelo del flagelo más representativo es la descrita en las especies Gram-negativas *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, en las que se conoce detalladamente

su estructura y ensamblaje (Minamino y Imada 2015; Erhardt 2016). Así pues, el flagelo bacteriano se divide en tres estructuras principales: el filamento, el gancho y el cuerpo basal, tal como se muestra en la Figura 1.2.



**Figura 1.2** Representación esquemática del flagelo bacteriano tipo. Modificado de Chevance y Hughes (2008).

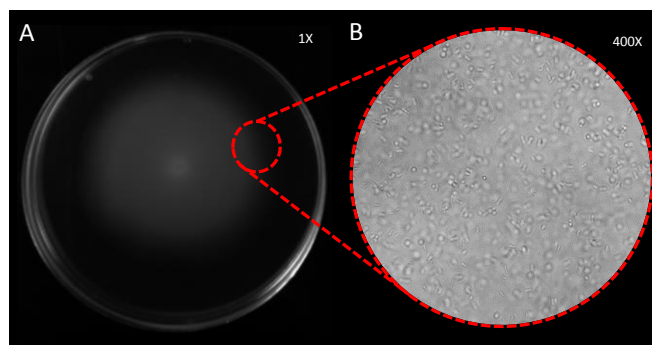
El cuerpo basal, también conocido como motor flagelar, está dividido en un rotor formado por un estátor, la varilla y varios anillos proteicos, todos ellos integrados en la pared bacteriana (Berg 2003). El estátor (MotA y MotB) es una bomba de protones que, mediante el flujo de iones de hidrógeno o sodio a través de la membrana citoplasmática, genera la fuerza motriz necesaria para la rotación flagelar (Erhardt 2016; Chaban *et al.* 2015). La varilla es un eje impulsor compuesto por cuatro proteínas (FlgG, FlgB, FlgC y FlgF) que forman la varilla proximal y distal, atravesando el espacio periplásmico y conectando los distintos anillos del cuerpo basal con el gancho y los componentes internos del citoplasma (FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliH, FliI y FliJ). Los anillos proteicos se encuentran ensamblados alrededor de la varilla y a su vez con la pared bacteriana. En el caso de las bacterias Gram-negativas hay presentes cuatro anillos: el anillo L (FlgH), el anillo P (FlgI), el anillo MS (FliF, FliE y FliH) y el anillo C (FliG, FliM y FliN), mientras que en el caso de bacterias Gram-positivas, el flagelo no contiene los componentes del anillo P ni del anillo L (Minamino y Imada 2015; Chevance y Hughes 2008; Nakamura y Minamino 2019). El gancho (FlgE), también llamado articulación o junta universal, transmite el movimiento del cuerpo basal al filamento. Por último, el filamento o hélice, se compone de hasta veintemil subunidades de flagelina (FliC o FljB) y de una tapa del filamento (FliD) (Chevance y Hughes 2008; Nakamura y Minamino 2019).

## INTRODUCCIÓN

Así pues, la presencia y acción de todos los componentes descritos es necesaria para el correcto ensamblaje y funcionamiento del flagelo, permitiendo el desplazamiento de las bacterias flageladas tanto en medios líquidos (*swimming*) como en superficies viscosas (*swarming*).

### i) *Swimming*

La motilidad *swimming*, o movimiento natatorio, es el primer sistema de motilidad descrito en bacterias que, mediante la rotación flagelar, permite su desplazamiento a velocidades superiores a 40  $\mu\text{m/s}$ , a través de medios líquidos o sobre fluidos superficiales (Henrichsen 1972). Este movimiento ha sido estudiado en detalle durante muchos años, principalmente en las especies *E. coli* y *S. enterica*, aunque también ha podido observarse en otras bacterias flageladas del dominio *Bacteria*; tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Ralstonia solanacearum* o *Vibrio harveyi*, entre otras (Sun *et al.* 2018; Harshey 2003).



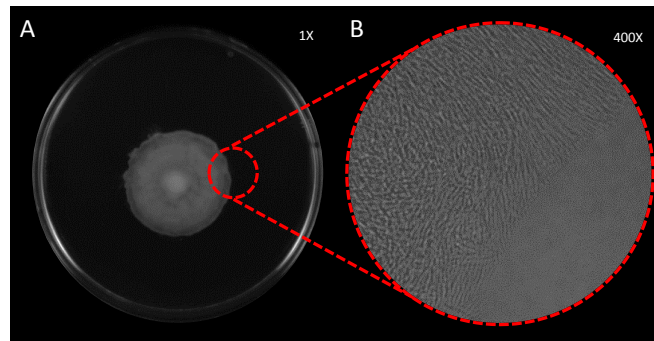
**Figura 1.3** Movimiento *swimming* de *R. solanacearum* GMI1000. (A) Patrón macroscópico del movimiento y (B) visualización mediante microscopía óptica (MO).

Este movimiento es visible macroscópicamente (Fig. 1.3A) en placas de Petri con medio semisólido a una concentración de agar de aproximadamente 0,3%, mostrando un halo de crecimiento que, dependiendo de la especie, puede llegar a cubrir toda la superficie del medio. El movimiento también puede ser visualizado mediante microscopía óptica (Fig. 1.3B), a partir de preparaciones líquidas o en las mismas placas con agar semisólido (Kearns 2010). A pesar de observarse un halo de crecimiento aparentemente homogéneo, las células bacterianas se mueven activamente de forma no organizada, es decir, individualmente dentro de la población (Henrichsen 1972; Harshey 2003).

### ii) *Swarming*

La motilidad *swarming*, o movimiento en enjambre, es un movimiento dependiente de flagelo que permite el desplazamiento bacteriano a través de superficies semisólidas o viscosas a una velocidad de entre 2 y 10  $\mu\text{m/s}$ . A diferencia del *swimming*,

la motilidad *swarming* es un desplazamiento multicelular donde se produce una coordinación de todas las células bacterianas de la población mediante interacciones intercelulares, promoviendo la secreción de compuestos surfactantes, la especialización celular y la formación de un frente de avance (Henrichsen 1972; Kearns 2010; Verstraeten *et al.* 2008). El *swarming*, al igual que el *swimming*, está muy extendido en el dominio *Bacteria*. Algunos ejemplos de especies bacterianas son: *Vibrio parahaemolyticus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *E. coli* y *B. subtilis* (Verstraeten *et al.* 2008).



**Figura 1.4** Movimiento *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1. (A) Patrón macroscópico del movimiento y (B) visualización mediante MO.

La visualización de este movimiento se realiza en placas de Petri con medio semisólido a unas concentraciones de agar variables, dependiendo de la especie. Este amplio rango de concentración de agar se debe a que, entre las bacterias capaces de realizar motilidad tipo *swarming*, existen dos clases: los *swarmers* robustos, capaces de moverse en medios con concentraciones de agar por encima del 1%; y los *swarmers* moderados, los cuales se mueven a concentraciones de agar de entre el 0,3 y el 0,8% (Partridge y Harshey 2013; Verstraeten *et al.* 2008).

Macroscópicamente (Fig. 1.4A), suele observarse un halo de crecimiento similar al movimiento *swimming*, pero con una opacidad mayor debido a la proximidad existente entre las células de la población bacteriana. A nivel microscópico (Fig. 1.4B), puede observarse un frente de avance, donde las células se encuentran alineadas de forma ordenada y, en función de la especie, más alargadas. Esta especialización celular es característica de los *swarmers* robustos, en los que las células que participan suprimen su división celular aumentando su longitud y número de flagelos por superficie (Sun *et al.* 2018; Harshey 2003; Kearns 2010; Rather 2005).

### 1.1.1.2. Pili de tipo IV y movimiento *twitching*

El otro mecanismo de motilidad bacteriana dependiente de apéndices es el asociado a pili de tipo IV, dentro del cual únicamente se encuentra el movimiento tipo *twitching*. Los pili de tipo IV son apéndices filamentosos retráctiles, anclados por un

## INTRODUCCIÓN

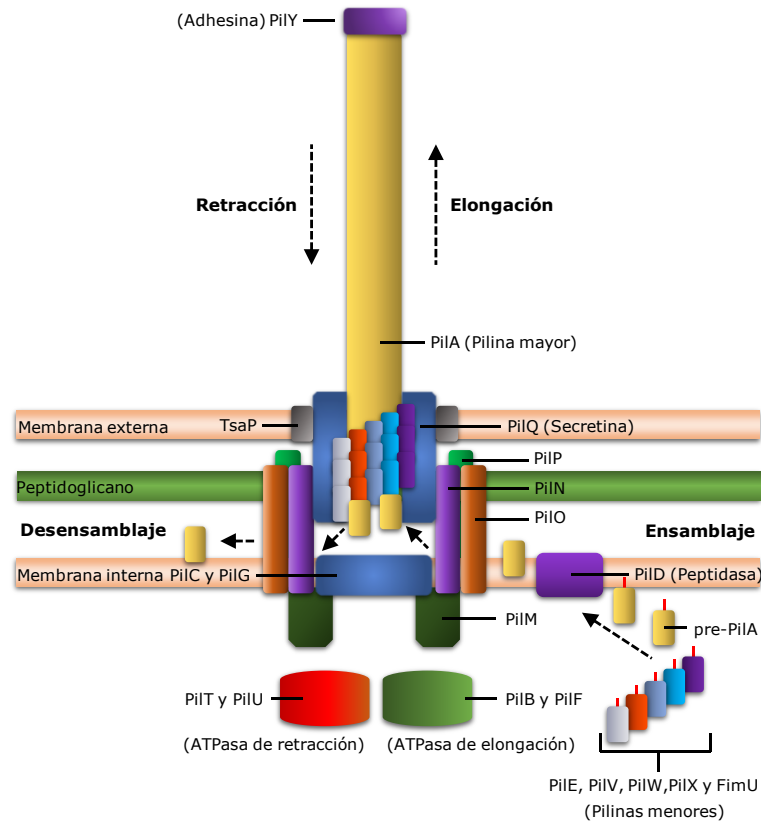
extremo a la pared bacteriana y que, comparados con los flagelos, suelen ser más delgados y de longitud variable, aunque su complejidad estructural es equiparable, conociéndose más de treinta proteínas implicadas en su estructura y biosíntesis (Gordon y Wang 2019; Bardy *et al.* 2003; Jarrell y McBride 2008; Merz *et al.* 2000). Además del movimiento *twitching*, los pili de tipo IV también están implicados en una amplia gama de funciones incluyendo: la adhesión, la formación de biofilms y la transferencia horizontal de DNA. Asimismo, este apéndice es una diana de reconocimiento para muchos bacteriófagos, estando su ausencia o mutación relacionada con la adquisición de resistencia a estos virus (McCallum *et al.* 2019; Mattick 2002).

Dentro del dominio *Bacteria*, este apéndice ha sido descrito en numerosos géneros bacterianos (Miyata *et al.* 2020). No obstante, su presencia se concentra en las bacterias Gram-negativas, principalmente del filo *Proteobacteria*. Algunos ejemplos son especies como: *Neisseria meningitidis*, *R. solanacearum*, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *V. cholerae*, *M. xanthus*, *A. baumannii* y la mayoría de enterobacterias. Otros grupos taxonómicos como los filos *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus* y *Acidobacteria* también incluyen bacterias con pili de tipo IV y, en el caso de bacterias Gram-positivas, el filo *Firmicutes* (Pelicic 2008; Mattick 2002). Del mismo modo que ocurre con los flagelos, el modelo más representativo de los pili de tipo IV es el descrito en bacterias Gram-negativas, concretamente en *P. aeruginosa* y *N. meningitidis* (Pelicic 2008; McCallum *et al.* 2019). Así pues, el pili de tipo IV bacteriano se divide en cuatro estructuras básicas: el filamento, las ATPasas, las proteínas integrales de membrana y la secretina, tal como se muestra en la Figura 1.5.

El filamento está formado por miles de subunidades de pilina en distribución helicoidal. Estas subunidades son sintetizadas en forma de prepilina, conteniendo un péptido señal que es reconocido por una peptidasa de membrana (PilD) que permite su migración y ensamblaje. Existen diversos tipos de subunidades capaces de polimerizarse y formar el pili de tipo IV, la pilina mayor (PILA) es la unidad más abundante que forma casi la totalidad del filamento. Por otro lado, existe un conjunto de subunidades funcionalmente equivalentes de abundancia reducida, conocidas como pilinas menores (PIL E, PIL V, PIL W, PIL X y FimU), las cuales optimizan el ensamblaje y retracción del pili. En el extremo del filamento se encuentra una proteína adhesina (PIL Y1) cuyo extremo N-terminal es relativamente variable, permitiendo la adherencia de los pili a distintas superficies (McCallum *et al.* 2019; Pelicic 2008; Mattick 2002).

Las proteínas integrales de membrana (PIL C y PIL G) forman la base del pili de tipo IV. La polimerización y despolimerización del filamento son llevadas a cabo por dos ATPasas con función inversa para polimerizar (PIL B y PIL F) o despolimerizar (PIL T y PIL U). Además, también existe un subcomplejo de alineamiento (PIL M, PIL N, PIL O y PIL P) el cual rodea la base de los pili y las ATPasas, estabilizando todo el complejo. Por último, la secretina (PIL Q), junto a proteínas accesorias de estabilización (PIL F, TsaP y FimV), forma el poro de membrana externa por el cual se prolonga el pili hacia el exterior del cuerpo

celular (Pelicic 2008; McCallum *et al.* 2019; Maier y Wong 2015). En bacterias Gram-positivas, la ausencia de los componentes PilP y PilQ se compensa con la extensión de las proteínas integrales de membrana (Melville y Craig 2013).



**Figura 1.5** Representación esquemática del pili de tipo IV. Modificado de Mattick (2002) y Maier y Wong (2015).

Como se ha dicho anteriormente, la motilidad *twitching*, o movimiento de contracción, es un desplazamiento dependiente de pili de tipo IV, producido sobre superficies sólidas menos hidratadas que aquellas en las que se producen los movimientos ya descritos (Harshey 2003; Henrichsen 1972). La base del desplazamiento se debe a que, en un primer periodo, durante la extensión del filamento mediante la polimerización de las subunidades de pilina, este se adhiere a una superficie sólida. Una vez adherido, se inicia la retracción del pili de tipo IV mediante la despolimerización del mismo, lo que produce un arrastre de la célula bacteriana, promoviendo su avance a una velocidad de entre 0,06 y 0,3  $\mu\text{m/s}$ . Una vez finalizado, el ciclo vuelve a repetirse mediante la extensión y adhesión de nuevos pili de tipo IV (Mattick 2002; Harshey 2003; Merz *et al.* 2000).

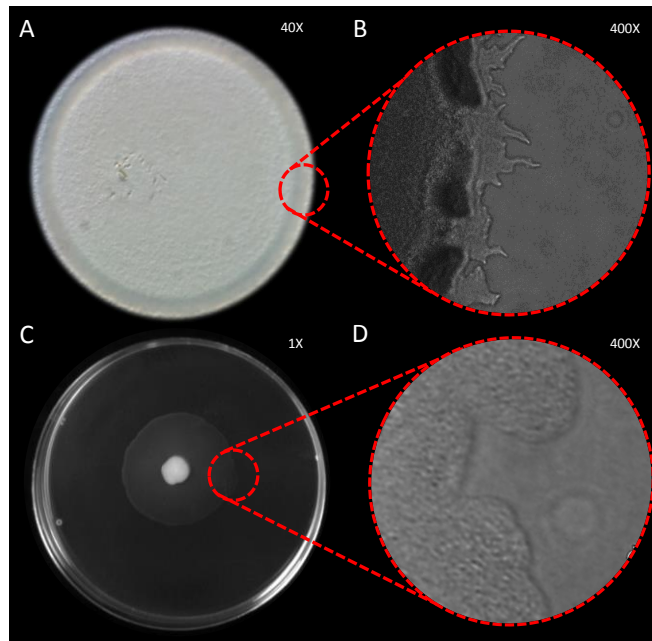
El movimiento *twitching*, al igual que la motilidad *swarming*, es un tipo de desplazamiento multicelular y organizado cuyo avance parece intermitente y desigual, sin ningún tipo de frente de avance a lo largo del eje celular. Por otro lado, a pesar de ser considerado un movimiento poblacional, se ha demostrado que células individuales también pueden realizar dicho movimiento de forma limitada (Skerker y Berg 2001;



## INTRODUCCIÓN

Mattick 2002). Este movimiento parece hallarse limitado taxonómicamente dentro del filo *Proteobacteria*, donde las especies más características son *P. aeruginosa*, *N. meningitidis* y *M. xhantus* (Mattick 2002; Harshey 2003; Burrows 2012). En lo referente a bacterias Gram-positivas, este tipo de movimiento se ha descrito en especies del genero *Streptococcus* y *Clostridium* (Piepenbrink y Sundberg 2016).

Para poder visualizar el movimiento *twitching*, se han descrito dos métodos de inoculación de la bacteria objeto de estudio: en superficie y profundidad. En ambas metodologías se utilizan placas de Petri con medio de cultivo a altas concentraciones de agar, generalmente por encima del 1%. El primer método de inoculación se realiza en la superficie del agar, en la que la visualización macroscópica es difícil de determinar debido a que la proliferación bacteriana se limita a un crecimiento colonial (Fig. 1.6A). Mediante microscopía óptica, con este método de inoculación el *twitching* se exhibe alrededor de la colonia donde se observan unas prolongaciones irregulares de crecimiento bacteriano formado por unas pocas capas de células (Fig. 1.6B).



**Figura 1.6** Movimiento tipo *twitching* mediante el método de inoculación en superficie para *R. solanacearum* GMI1000, (A) visto con lupa o (B) mediante MO; e inoculación en profundidad para *A. baumannii* MAR002, (C) bajo observación macroscópica o (D) mediante MO.

El otro método de inoculación consiste en atravesar el medio hasta poner en contacto la bacteria con la superficie plástica de la placa, teniendo lugar el crecimiento bacteriano en la interfase agar-plástico. Macroscópicamente (Fig. 1.6C), la motilidad *twitching* se manifiesta como un halo tenue situado en la interfase agar-plástico, por lo que se suelen utilizar tinciones para facilitar su visualización. Microscópicamente (Fig. 1.6D), el movimiento *twitching* se observa de forma similar al método anterior, pero con una mayor superficie de células activas. Se considera que las condiciones superficiales con este método de inoculación (base de plástico de la placa de Petri, suave y regular)

favorecen el desplazamiento *twitching* respecto al anterior (inoculación en la superficie del agar), donde el medio presenta irregularidades y porosidades que dificultan el movimiento mediado por pili de tipo IV (Mattick 2002; Harshey 2003).

### **1.1.1.3. Desplazamientos no dependientes de apéndices**

Teniendo en cuenta los distintos sistemas de motilidad bacteriana conocidos, este último grupo integra aquellos mecanismos independientes tanto de flagelo como de pili de tipo IV cuyas bases moleculares son poco conocidas en comparación con las de los dos apéndices.

La mayoría de estos movimientos han sido descritos en grupos taxonómicos concretos, cuya presencia podría deberse a los entornos de alta viscosidad donde estas bacterias habitan y que, probablemente, promovieron que los mecanismos de motilidad resultantes evolucionaran de los ya descritos, debido a la excesiva cantidad de energía requerida para mover los grandes apéndices (Miyata *et al.* 2020). Todo ello conlleva a un grupo muy heterogéneo, pudiendo incluir movimientos tanto individuales como colectivos, activos o pasivos. Así pues, este grupo incluye los movimientos *gliding*, *sliding*, *darting*, *kink propagation* y *surface-associated motility*.

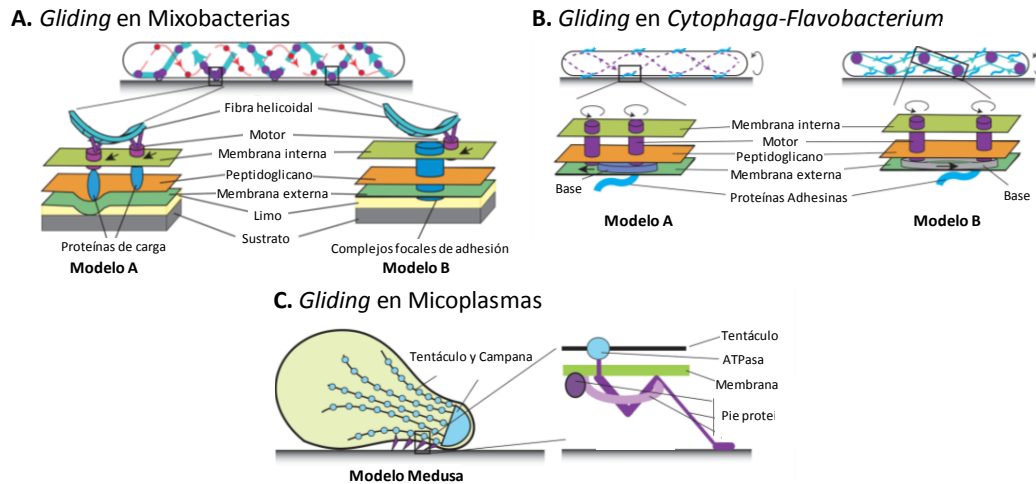
#### **i) *Gliding***

La motilidad *gliding*, o por deslizamiento, es un tipo de desplazamiento activo en superficies sólidas poco húmedas, caracterizado inicialmente por no utilizar apéndices celulares bien definidos. Las bases moleculares han sido durante largo tiempo desconocidas, sin embargo, gracias a los avances en técnicas moleculares y de microscopía, se ha podido caracterizar un conjunto de mecanismos que podrían mediar en todas las formas *gliding* conocidas, que permiten el avance bacteriano a velocidades muy variables, de 0,025 a 10  $\mu\text{m/s}$ , en función del mecanismo efector implicado (Henrichsen 1972; McBride 2001; Jarrell y McBride 2008). Este tipo de movimiento ha sido identificado en todo el dominio *Bacteria*. Sin embargo, su estudio más exhaustivo se centra en tres grandes grupos: las mixobacterias (miembro del filo *Proteobacteria*), el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* y las micobacterias (Harshey 2003; McBride 2001).

En el caso de las mixobacterias, el grupo más estudiado, se han descrito dos tipos de desplazamientos *gliding*. El primero, llamado *gliding* social, es un movimiento poblacional mediado por pili de tipo IV y que, a pesar de que algunos autores lo consideran motilidad *twitching*, otros lo separan por las peculiaridades en cuanto a sus componentes. El otro tipo de movimiento *gliding* descrito es el conocido como *gliding* aventurero, el cual difiere del anterior por ser un movimiento individual, independiente de pili de tipo IV y visible en placas de Petri con medio a concentraciones de agar al

## INTRODUCCIÓN

1,5% (Mignot *et al.* 2007). La fuerza motriz necesaria para este desplazamiento es llevada a cabo por unas bombas de protones, llamadas complejos focales de adhesión, similares al estátor de los flagelos y situados por toda la superficie celular en distribución helicoidal (Fig. 1.7A). Además, también se produce una secreción de surfactantes como material adherente para facilitar la propulsión bacteriana (Nan y Zusman 2016).



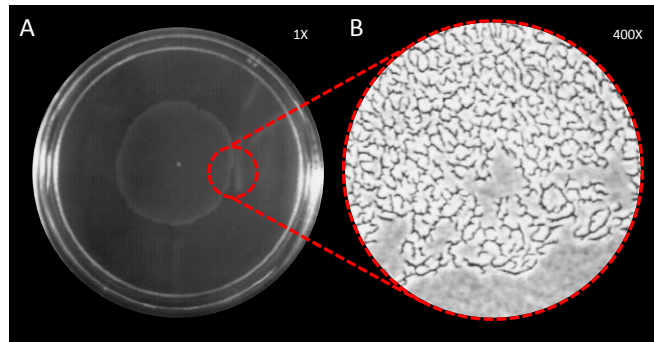
**Figura 1.7** Esquema representativo de los mecanismos de desplazamiento *gliding*, (A) descrito en mixobacterias, (B) el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* y (C) los micoplasmas. Imagen modificada de Nan y Zusman (2016).

Otros mecanismos son los descritos en el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* (Fig. 1.7B), basado en el transporte de adhesinas hacia la superficie, y en los micoplasmas (Fig. 1.7C), en los cuales una matriz con pequeños complejos proteicos se adhieren a una superficie para, posteriormente, impulsar a la célula y generar el movimiento (McBride 2001; Nan y Zusman 2016; Harshey 2003; Jarrell y McBride 2008).

### ii) *Sliding*

La motilidad *sliding* es un tipo de desplazamiento independiente de apéndices, cuyo avance se basa en el crecimiento bacteriano y la producción de compuestos surfactantes que reducen la fricción entre las células y el sustrato, generando un desplazamiento de entre 0,03 a 6  $\mu\text{m/s}$  (Henrichsen 1972; Jarrell y McBride 2008; Martínez *et al.* 1999). Este crecimiento, mediante división celular, genera un impulso expansivo que se transmite a los bordes de la colonia y que, combinado con compuestos tensioactivos como lipopéptidos, lipopolisacáridos y glucolípidos liberados, forma un halo de crecimiento laminar, compacto y uniforme de células que se desplaza lentamente como una unidad poblacional (Fig. 1.8A y B). A diferencia de los movimientos descritos anteriormente, el *sliding* es un movimiento pasivo. Esta diferencia se debe a que, en la motilidad activa se requiere un mecanismo dependiente de energía mediante el cual las bacterias pueden dirigir la direccionalidad de su desplazamiento, mientras que en la

motilidad pasiva el movimiento se basa en la modulación del entorno para generar el movimiento. Se han descrito muchos géneros bacterianos filogenéticamente dispersos capaces de realizar *sliding*, tales como: *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus* y *Staphylococcus* (Harshey 2003; Pollitt y Diggle 2017; Martínez *et al.* 1999).

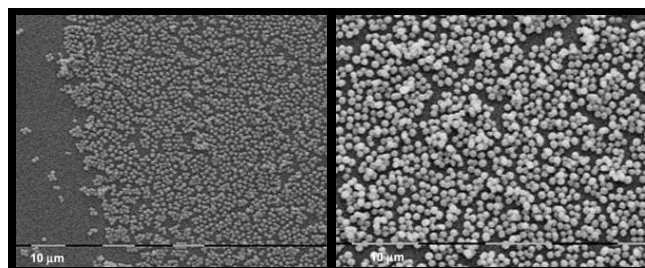


**Figura 1.8** Movimiento tipo *sliding* de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>. (A) Patrón macroscópico del movimiento y (B) su imagen mediante MO. Imagen modificada de Martínez *et al.* (1999).

A su vez, el movimiento *sliding* se divide en tres grupos en función de los compuestos secretados. En el primero se encuentran aquellos que requieren únicamente los surfactantes ya mencionados; el segundo grupo, requiere además una secreción adicional de exopolisacáridos y; en el último grupo, se encuentran aquellas bacterias cuyo *sliding* requiere compuestos no surfactantes. Al ser muchos de los componentes secretados necesarios para otros procesos como la formación de biofilms, se sugiere que este movimiento podría representar una etapa intermedia de desarrollo (Pollitt y Diggle 2017; Hölscher y Kovács 2017; Stewart *et al.* 2009).

### iii) *Darting*

La motilidad *darting* es otro sistema de desplazamiento pasivo, producido por las fuerzas expansivas desarrolladas en un agregado celular que, en un momento determinado, producen la eyección de una de las células del agregado hacia un área vacía, donde se formará un nuevo agregado celular.



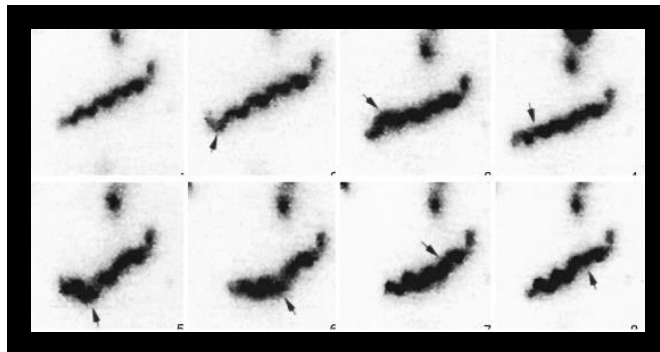
**Figura 1.9** Movimiento tipo *Darting* de *Staphylococcus xylosus* S04002 mediante microscópica electrónica. Imagen modificada de Dordet-Frisoni *et al.* (2008).

## INTRODUCCIÓN

A nivel microscópico, se pueden observar agregados inmóviles, distribuidos al azar sobre una superficie que, tras un lapso de tiempo, comporta la aparición de nuevas células individuales localizadas en zonas antes vacías cercanas al agregado (Fig. 1.9) (Henrichsen 1972). Este peculiar movimiento solo ha sido observado en las especies *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus xylosus*, alcanzando en condiciones óptimas unas velocidades de entre 1 y 2  $\mu\text{m/s}$  (Pollitt y Diggle 2017; Dordet-Frisoni *et al.* 2008).

### iv) *Kink propagation*

El movimiento descrito como *kink propagation* es un desplazamiento exclusivo de *Spiroplasma melliferum*, uno de los microorganismos sin pared bacteriana y de vida libre más pequeños que se conocen (Gilad *et al.* 2003). Esta bacteria no posee apéndices ni genes relacionados con los movimientos ya mencionados, sin embargo, *S. melliferum* presenta un citoesqueleto contráctil unido a la membrana, que actuaría como un motor lineal, formando una cinta de siete fibrillas que se extiende a lo largo de la célula (Fig. 1.10). La contracción del citoesqueleto produciría la fuerza motriz necesaria para el desplazamiento, transmitiéndose a la membrana y produciendo cambios en la longitud de *S. melliferum*, permitiendo un rápido avance a una velocidad media de unos 12  $\mu\text{m/s}$  (Bardy *et al.* 2003; Boudet *et al.* 2018).



**Figura 1.10** Imágenes seriadas de la transmisión de la contracción de la célula a lo largo del tiempo en el movimiento tipo *kink propagation* de *S. melliferum* BC3. La flecha señala el punto de contracción de la célula. Imagen modificada de Gilad *et al.* (2003).

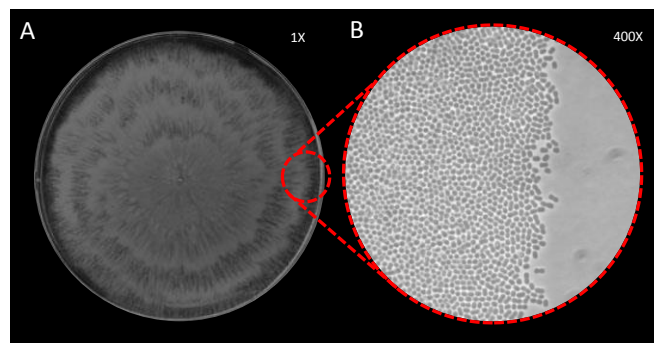
### v) *Surface-associated motility*

El movimiento denominado *surface-associated motility*, o motilidad asociada a la superficie, es un desplazamiento poblacional independiente de apéndices, producido en superficies semisólidas y exclusivo del género *Acinetobacter*. Inicialmente se catalogó como motilidad *swarming*, a pesar de ser un género que no posee flagelos. De hecho, existe cierta confusión en la literatura ya que también se le ha nombrado erróneamente

como *twitching*, aunque más adelante se demostró que el movimiento era independiente de pili de tipo IV (Barker y Maxted 1975; Clemmer *et al.* 2011; Harding *et al.* 2013).

A pesar de ser un movimiento poco estudiado, la importancia clínica de este género, principalmente de *A. baumannii*, ha motivado su investigación, logrando avances en su comprensión. Por ejemplo, se ha establecido una relación de este desplazamiento con la síntesis de 1,3-diaminopropano (DAP), una poliamina secretada y de función desconocida cuya ausencia produce una deficiencia en la motilidad (Skiebe *et al.* 2012). También se ha relacionado con la alteración en la producción de lipopolisacáridos, tanto por estrés como por mutaciones (Carretero-Ledesma *et al.* 2018; McQueary *et al.* 2012). Recientemente, se ha descrito distintos componentes celulares como porinas, proteínas de membrana externa y bombas de eflujo, que parecen estar implicados en el *surface-associated motility*, sugiriendo un posible mecanismo de secreción de compuestos al medio (Harding *et al.* 2018; Pérez-Varela *et al.* 2018, 2019).

Macroscópicamente (Fig. 1.11A), este movimiento es visible tras la inoculación de la cepa de estudio en el centro de placas de Petri con medio semisólido a una concentración de agar de entre 0,2 y 0,5%. En función de la concentración y del tipo de agar empleado en el medio (Difco o Eiken), los halos de crecimiento producidos tras la incubación pueden adoptar una gran variedad de patrones morfológicos. En algunos casos, el movimiento producido recuerda en parte al *swarming* de *P. aeruginosa*, mientras que en otros casos el halo de crecimiento es ramificado, formando los canales que caracterizaron inicialmente este desplazamiento (Clemmer *et al.* 2011).



**Figura 1.11** Movimiento tipo *surface-associated motility* de *A. baumannii* M2. (A) Patrón macroscópico del movimiento y (B) visualización microscópica. Imagen modificada de Clemmer *et al.* (2011).

A nivel microscópico (Fig. 1.11B), se puede observar un frente de avance más o menos alineado, similar a los observados en las motilidades *swarming* y *sliding*, con una sola capa de células muy compactas, favoreciendo la secreción de compuestos para el desplazamiento y la interacción entre células que avanzan conjuntamente a una velocidad media de unos 0,5  $\mu\text{m/s}$  (Clemmer *et al.* 2011; Harding *et al.* 2013).

### **1.1.2. Regulación de la motilidad**

La gran diversidad de mecanismos para el desplazamiento bacteriano permite a los microorganismos colonizar una gran variedad de nichos ecológicos y acceder así a una mayor disponibilidad de nutrientes. No obstante, este desplazamiento requiere por lo general un gran gasto energético, principalmente el dependiente de apéndices. Por ello, no es de extrañar que exista una amplia variedad de mecanismos de regulación para casi todos los tipos de motilidad descritos.

La mayoría de los sistemas que regulan la motilidad han sido descritos para los grandes apéndices, concretamente flagelos, aunque actualmente se conocen algunos sistemas de regulación comunes en casi todos los tipos de motilidad, estando muchos de ellos conectados entre sí. A continuación, se detallan los sistemas de regulación de la motilidad más conocidos.

#### **1.1.2.1. *Quorum sensing***

El *quorum sensing* (QS) es un proceso de comunicación intercelular característico de las células bacterianas, mediante el cual se produce una regulación de la expresión génica colectiva en respuesta a variaciones en la densidad de la población microbiana circundante. En este sentido, las bacterias producen un compuesto químico que actúa como molécula señal llamado autoinductor, el cual es secretado al medio externo donde su concentración va aumentando a medida que la población bacteriana crece y libera más autoinductor (Bassler y Losick 2006). Este fenómeno alcanza un punto umbral cuando la concentración de autoinductor es suficiente como para ser detectada por las células de la población, produciendo cambios en la expresión de genes bajo control del autoinductor y efectuando así una respuesta colectiva.

Para la comunicación mediante QS, las bacterias Gram-negativas utilizan como autoinductor derivados de la N-Acilo Homoserin Lactonas (AHLs), estando el sistema compuesto por dos proteínas: la enzima responsable de la síntesis de AHL (LuxI) y un regulador transcripcional (LuxR), cuya actividad está modulada por las AHLs, que difunden pasivamente hacia el interior de la célula. En el caso de las bacterias Gram-positivas, oligopéptidos procesados actuarían de manera homóloga a las AHLs, pero necesitando de un transporte activo para traspasar la pared bacteriana (Miller y Bassler 2001; Fuqua *et al.* 2001; Nasser y Reverchon 2007).

La respuesta al QS incluye una amplia gama de actividades fisiológicas, entre las que se incluye la bioluminiscencia, la formación de biofilm, la secreción de factores de virulencia y la regulación de la motilidad. La mayoría de estas actividades son improductivas y costosas energéticamente cuando son ejecutadas individualmente, pero se vuelven efectivas cuando son realizadas por toda la comunidad (Miller y Bassler 2001; Nasser y Reverchon 2007; Bassler y Losick 2006).

La implicación del QS como uno de los reguladores del desplazamiento bacteriano ha sido ampliamente descrito. En bacterias como *P. aeruginosa*, capaz de realizar los movimientos tipo *swimming*, *swarming*, *twitching* y *sliding*, se ha descrito como el QS es capaz de regular a todos ellos mediante el sistema RhlR (Hölscher y Kovács 2017; Khan *et al.* 2020). En *Lysobacter enzymogenes*, el QS controla la motilidad tipo *twitching* a través de la regulación indirecta de genes responsables de la biosíntesis del pili de tipo IV, entre ellos *pilA* (Feng *et al.* 2019). El movimiento *sliding* también está regulado por el QS a través de la formación de surfactantes que favorecen este desplazamiento pasivo, como en la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Lin *et al.* 2016; Tsompanidou *et al.* 2013). Por otro lado, en la bacteria Gram-negativa *Sinorhizobium meliloti*, la motilidad *sliding* se encuentra modulada por el QS, a través del regulador transcripcional ExpR (análogo a LuxR) responsable de la producción de exopolisacáridos (Nogales *et al.* 2012). Por el contrario, se ha visto que, en la misma bacteria, que presenta tanto flagelos como pili de tipo IV, el efecto por acción de regulador ExpR inhibe la motilidad tipo *swarming* y la expresión de pili de tipo IV cuando la densidad celular es alta (Zatakia *et al.* 2014; Gurich y González 2009). Por último, en *A. baumannii*, el *surface-associated motility* también está regulado por el QS, a través de AbaI y AbaR (LuxI y LuxR, respectivamente) (Clemmer *et al.* 2011; Niu *et al.* 2008).

Además de una regulación directa sobre componentes efectores del desplazamiento bacteriano, el QS está también conectado con otros mecanismos de regulación bacteriana, como el diguanilato cíclico y algunos sistemas de dos componentes (Kalia *et al.* 2013). Por ejemplo, los sistemas QseC/QseB que modulan la transcripción del operón *flhDC* y que a su vez regulan la síntesis del flagelo, o la vía de señalización Frz y los sistemas quimiotácticos para el movimiento dependiente de pili de tipo IV o el *surface-associated motility* (Sperandio *et al.* 2002; Shi *et al.* 1996; Chen *et al.* 2017a; González Barrios *et al.* 2006).

### 1.1.2.2. Diguanilato cíclico

Los dinucleótidos cíclicos, o segundos mensajeros, son pequeñas moléculas de señalización intracelular altamente versátiles, capaces de regular una gran variedad de procesos fisiológicos en bacterias, entre los cuales, el diguanilato cíclico o c-di-GMP es el más conocido y estudiado. El c-di-GMP es una molécula dedicada a la señalización intracelular que promueve cambios en el crecimiento celular, la virulencia, la formación de biofilms y la motilidad bacteriana. El mecanismo de acción del c-di-GMP se basa en su unión a proteínas específicas, influyendo así en su actividad, estabilidad, interacción con otras proteínas o su localización subcelular. Los niveles intracelulares de c-di-GMP están controlados por dos tipos de enzimas con funciones antagónicas, las diguanilato ciclasas, por un lado, que sintetizan el c-di-GMP, y las fosfodiesterasas que lo degradan. A su vez, una bacteria puede presentar más de una pareja enzimática, permitiendo un



## INTRODUCCIÓN

mayor control y un efecto biológico más preciso en el momento indicado (Jenal *et al.* 2017).

Uno de los papeles clave del c-di-GMP es la transición de bacterias móviles o planctónicas a bacterias adheridas o sésiles. En general, niveles bajos de c-di-GMP están asociados con el desarrollo de la motilidad, mientras que un aumento intracelular del dinucleótido cíclico promueve la adhesión a superficies y posterior formación de biofilm (Jenal *et al.* 2017). En lo referente al *swimming* y *swarming*, el c-di-GMP regula en gran medida el ensamblaje y la actividad del motor flagelar. Por ejemplo, en bacterias como *E. coli*, *S. enterica*, *Rhodobacter capsulatus*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, el aumento de los niveles de c-di-GMP origina su unión con la proteína efectora YcgR u homólogos, promoviendo su interacción con el rotor-estator flagelar bloqueándolo. (Nesper *et al.* 2017; Fang y Gomelsky 2010; Baker *et al.* 2016; Chen *et al.* 2012; Hou *et al.* 2019; Pallegar *et al.* 2020).

En *P. aeruginosa* la secreción de exopolisacáridos, como compuesto surfactante para los desplazamientos *swarming* y *sliding*, está regulada por el c-di-GMP, mediante el control de las mismas proteínas, SadC y BifA, que regulan la concentración intracelular de esta, promoviendo su síntesis y degradación, respectivamente. Además, PilY1, la adhesina del pili de tipo IV, es capaz de regular la producción de c-di-GMP a través del subcomplejo de alineación (PilM, PilN, PilO y PilP) y de SadC, reprimiendo el movimiento *swarming* (Hölscher y Kovács 2017; Luo *et al.* 2015). También se ha descrito en *E. coli* o *P. aeruginosa* la regulación de la respuesta quimiotáctica mediada por c-di-GMP, en la que esta se une a MapZ, que a su vez se asocia a CheR, alterando su actividad metiltransferasa y disminuyendo así la respuesta quimiotáctica. Esto podría estar justificado debido a que, en ausencia de quimiotaxis, las bacterias permanecen más tiempo sobre una superficie concreta, facilitando así la adhesión a estas para iniciar la formación del biofilm (Xin *et al.* 2019; Suchanek *et al.* 2019; Prüß 2017; Orr y Lee 2016).

Por otro lado, el c-di-GMP junto con otro segundo mensajero, el adenosín monofosfato cíclico o cAMP, también regula la biogénesis del pili de tipo IV, no solo influyendo en el movimiento *twitching*, sino también en el desarrollo de componentes extracelulares o adhesinas para la formación del biofilm (Serra *et al.* 2013; Kazmierczak *et al.* 2006; Burrows 2012). Uno de los ejemplos mejor estudiados es el producido cuando c-di-GMP se une a FimX o a PilZ. FimX regula positivamente el ensamblaje de pili de tipo IV y el movimiento *twitching* al promover la actividad de la ATPasa PilB. Cuando el c-di-GMP se une a FimX produce un incremento del ensamblaje pili de tipo IV, promoviendo la adhesión a superficie en contrapartida con el movimiento *twitching*. En lo referente a PilZ, proteína que estimula la elongación del filamento de pilina, muchas de las proteínas efectoras de c-di-GMP contienen una secuencia aminoacídica común de unión a este dinucleótido, conocido como dominio de unión PilZ, (Kazmierczak *et al.* 2006; McCarthy *et al.* 2008; Orr y Lee 2016; Jain *et al.* 2017).

En relación con el movimiento *gliding*, en *M. xanthus* se ha descrito como el c-di-GMP regula la motilidad dependiente de pili de tipo IV, *twitching* o *gliding* social. Sin embargo, no parece tener efecto sobre el desplazamiento independiente de apéndice *gliding* aventurero. Por otro lado, en *Bdellovibrio bacteriovorus*, bacteria capaz de realizar el desplazamiento *gliding* independiente de pili de tipo IV, se ha descrito como el c-di-GMP regula su ciclo celular, siendo los niveles de este segundo mensajero altos en fases de depredación, momento de actividad *gliding*, y bajos en estado planctónico, cuando la motilidad *swimming* es predominante (Skotnicka *et al.* 2016; Skotnicka y Sogaard-Andersen 2017; Hobley *et al.* 2012).

Por último, recientemente se ha identificado la vía de señalización del c-di-GMP en *A. baumannii*, observándose cómo el incremento de este inhibe el *surface-associated motility* y favorece la formación de biofilm (Ahmad *et al.* 2020).

### 1.1.2.3. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son mecanismos de detección-respuesta muy extendidos en bacterias, utilizados como método de regulación en función de estímulos fisicoquímicos internos o ambientales. Típicamente, estos sistemas están formados por un sensor histidina quinasa, el cual se encuentra situado en la membrana, y un regulador de respuesta citoplasmático. Cuando la proteína quinasa detecta un estímulo específico, esta transmite la señal en forma de grupo fosfato al regulador de respuesta que, en función del sistema, finaliza con un cambio de expresión génica. A pesar de que en la mayoría de casos no se conoce el ligando reconocido por el sensor, numerosos estudios moleculares implicados en la disrupción o inactivación de genes han demostrado cómo estos sistemas regulan la mayoría de mecanismos implicados en la motilidad bacteriana (West y Stock 2001; Prüß 2017).

En los movimientos asociados a flagelos se han descrito la mayoría de sistemas de dos componentes, concretamente en *E. coli* y *P. aeruginosa*, siendo el operón *flhDC* el centro de acción. Este operón se encarga de la formación del flagelo bacteriano, tanto de su biosíntesis y ensamblaje, así como de la formación de algunos componentes del sistema quimiotáctico. La expresión del operón *flhDC* se encuentran bajo el riguroso control de varios sistemas de dos componentes.

El sistema de dos componentes EnvZ/OmpR responde a cambios osmóticos, modulando un conjunto de procesos de forma inversa. Por un lado, activa la síntesis de las porinas OmpF y OmpC, la síntesis de proteínas *curl* y la formación de fimbrias, mientras que OmpR inhibe la transcripción del operón *flhDC* (Prüß 2017). El sistema RcsCDB, formado por tres componentes, contribuye a la maduración del biofilm frente al estrés producido en ambientes acidificados, en contraposición con el movimiento, regulando negativamente la expresión de *flhD* (Krin *et al.* 2010; Francez-Charlot *et al.*

## INTRODUCCIÓN

2003). Otro sistema de dos componentes es el ya mencionado sistema QseC/QseB, el cual controla la expresión de *flhD*, junto con otros genes responsables de la formación de biofilm y que, a su vez, está coordinado con el QS. Sin embargo, a diferencia de los sistemas EnvZ/OmpR y RcsCDB, el sistema QseC/QseB regula positivamente tanto la motilidad dependiente de flagelo como la formación de biofilm (Sperandio *et al.* 2002).

También se han descrito otros sistemas de dos componentes, como el formado por FleS/FleR, implicado en la biosíntesis del flagelo, que a su vez está regulado por el factor transcripcional FleQ y por el c-di-GMP; y el sistema Bar/UvrY, que regula el almacenamiento de carbono en la célula mediante la transcripción de moléculas reguladoras de RNA (sRNA) y el regulador transcripcional CsrA, siendo este último activador del operón *flhDC*, regulando positivamente la motilidad (Wei *et al.* 2001; West y Stock 2001).

En el movimiento *twitching* también se han descrito distintos sistemas de dos componentes homólogos a los sistemas de regulación flagelar. En *P. aeruginosa* y *M. xanthus*, se han descrito los sistemas Frz y el Chp, que controlan la biogénesis y orientación de los pili de tipo IV. Además, el sistema Frz podría estar co-regulado por QS (Harshey 2003). En *Lysobacter enzymogenes*, el sistema homólogo a QseC/QseB regula la motilidad tipo *twitching*, provocando un aumento en la velocidad de este movimiento en presencia de indol, mediante el aumento de expresión de pilinas menores (Feng *et al.* 2019). De forma más notoria, la síntesis de la subunidad mayor de pilina, PilA, se encuentra regulada por el sistema PilS/PilR y, en *P. aeruginosa*, se ha demostrado que también regula positivamente la transcripción de FleS/FleR, es decir, la biosíntesis del flagelo (Burrows 2012; Kilmury y Burrows 2018).

En cuanto a la regulación de movimientos no asociados a apéndices, también se han descrito sistemas de dos componentes. En *P. aeruginosa* se ha identificado el sistema GacA/GacS, que promueve la secreción de ramnolípidos para favorecer la formación de biofilm y, a su vez, inhibe los movimientos *sliding* y *swarming* (Murray y Kazmierczak 2008). En el caso de *S. enterica*, a concentraciones bajas de magnesio en el medio se activa el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, regulando la expresión de la proteína PagM, que parece facilitar este desplazamiento (Park *et al.* 2015). Por último, en el *surface-associated motility* se ha descrito un sistema de dos componentes, homólogo al sistema EnvZ/OmpR flagelar (Tipton y Rather 2017).

### 1.1.2.3. El sistema quimiotáctico

La quimiotaxis es el fenómeno mediante el cual las bacterias son capaces de dirigir su movimiento en función de la concentración de compuestos químicos concretos presentes en el medio externo. Esto permite que las células se desplacen por ejemplo hacia regiones con una mayor concentración de nutrientes reconocidos como

quimioatrayentes, mediante quimiotaxis positiva, o bien alejarse de compuestos tóxicos reconocidos como quimiorepelentes, mediante una quimiotaxis negativa. Para reconocer estos compuestos químicos, las bacterias poseen un sistema de dos componentes complejo llamado sistema quimiotáctico que permite detectar el estímulo externo y producir un cambio en el comportamiento basado en la modulación de los patrones de motilidad (Waite *et al.* 2018; Harshey 2003).

Las especies bacterianas en las que el sistema quimiotáctico y sus componentes básicos se han descrito de forma más exhaustiva son *E. coli* y *P. aeruginosa*, estableciendo el mecanismo por el cual la quimiotaxis regula la dirección de rotación del flagelo bacteriano, afectando así a los desplazamientos *swimming* y *swarming* (Colin y Sourjik 2017; Prüb 2017; Waite *et al.* 2018). A pesar de que la mayoría de estudios relacionados con el sistema quimiotáctico hacen referencia a la modulación del sistema flagelar, en especies como *P. aeruginosa*, *M. xhantus* o *A. baumannii*, se han descrito vías homólogas al sistema quimiotáctico asociadas a otros mecanismos de desplazamiento bacteriano, como la motilidad dependiente de pili de tipo IV, los desplazamientos independientes de apéndices como el *gliding* y el *surface-associated motility*, e incluso a otros procesos fisiológicos no relacionados con la propia motilidad bacteriana, como por ejemplo la formación de biofilms o de cuerpos fructíferos (Sampedro *et al.* 2015; Zusman *et al.* 2007; Chen *et al.* 2017a).

### **i) Quimiotaxis asociada a flagelos**

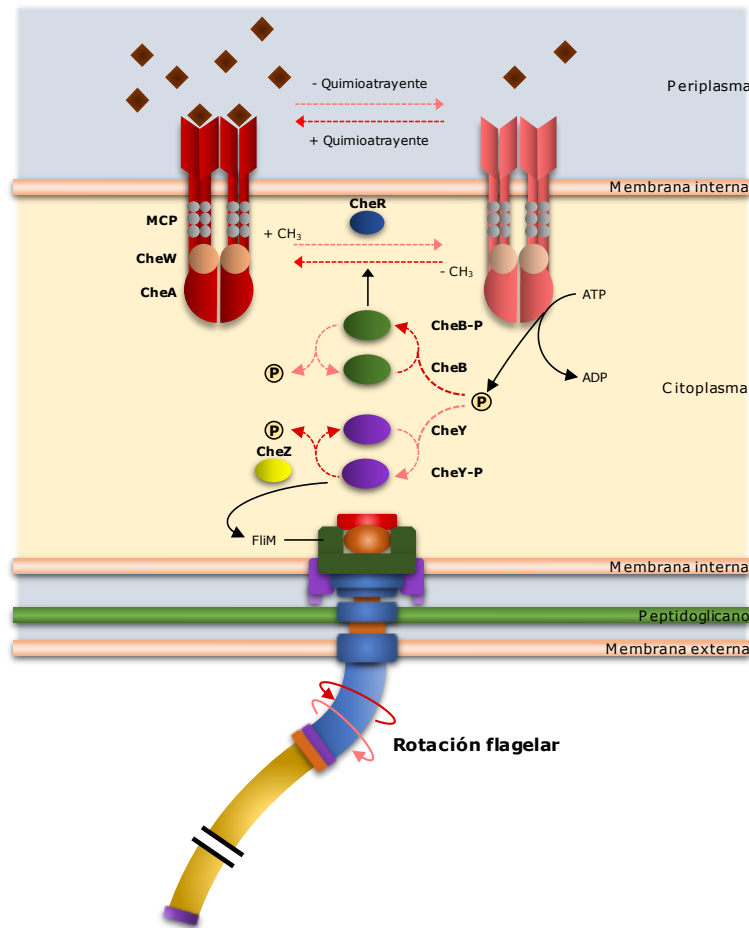
En la quimiotaxis asociada al flagelo bacteriano, los componentes básicos que lo constituyen y su arquitectura molecular se encuentran altamente conservados, siendo el sistema de *E. coli* el más representativo. Así pues, el sistema quimiotáctico básico de la vía de señalización Che, puede dividirse en cuatro módulos: un módulo sensor, un módulo transductor, un módulo integral de retroalimentación y un módulo efector, representados en la Figura 1.12.

El módulo sensor está formado por los quimiorreceptores, constituidos por la proteína MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*). Los MCPs son proteínas generalmente bien estructuradas con un dominio externo periplasmático, donde se produce la unión con el ligando, un conector citosólico y un dominio de señalización, el cual se inicia la transducción de la respuesta. Existe una gran diversidad de MCPs, por ejemplo, en *P. aeruginosa* PAO1 y *P. putida* se han identificado más de veinticinco proteínas MCP de los que para la mayoría se desconoce su ligando y, de los conocidos, muchos están relacionados con la respuesta positiva al oxígeno, fosfato inorgánico, malato, aminoácidos y etileno, entre otros (Kato *et al.* 2008; Sampedro *et al.* 2015; Sourjik y Wingreen 2012).

El módulo transductor se encuentra formado por un conjunto de proteínas que transmiten la señal del módulo sensor hacia el módulo efector mediante una cadena de

## INTRODUCCIÓN

fosforilación. Esta cadena se inicia en el complejo formado por el dominio de señalización de los MCPs, la histidina quinasa CheA y la proteína de acoplamiento CheW. Como transductores de la señal, los MCPs modulan, en función de su grado de metilación, la actividad de autofosforilación de CheA. La interacción MCP-CheA, se produce gracias a la proteína CheW, que actúa como conector de ambas proteínas. Cuando CheA se autofosforila, CheA-P transmite su grupo fosfato al regulador de respuesta CheY. Cuando CheA se autofosforila, CheA-P transmite su grupo fosfato al regulador de respuesta CheY.



**Figura 1.12** Representación esquemática del sistema quimiotáctico asociado a flagelo. Modificado de Hazelbauer (2008).

Junto al módulo transductor, existe otra vía de señalización cinéticamente más lenta, conocida como módulo integral de retroalimentación, cuyo propósito es integrar las señales de la vía de fosforilación y proporcionar un tiempo de respuesta a la célula bacteriana cuando se encuentra en una concentración de ligando detectable. Este período de tiempo depende del grado de metilación de los MCPs, el cual está modulado de forma competitiva por las proteínas metiltransferasa CheR y metiltransferasa CheB. Por un lado, CheR convierte los residuos de glutamilo de la región citoplasmática de los MCPs en ésteres de glutamilo-metil, utilizando moléculas de S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. Por otro lado, CheB se activa cuando es fosforilada por CheA-P y es entonces cuando CheB-P elimina los grupos metilo de los MCPs. Cuando aumenta el número de residuos metilados en los MCPs, se produce un cambio conformacional que

aumenta la actividad de la histidina quinasa CheA, favoreciendo su propia autofosforilación. Esta modulación de los MCPs permite obtener un registro del pasado químico reciente en función del grado de metilación, modulando la respuesta quimiotáctica a través de la comparación de las condiciones químicas pasadas con las presentes (Waite *et al.* 2018; Sourjik y Wingreen 2012; Colin y Sourjik 2017).

La transducción de la señal finaliza en el módulo efector, donde se regula el cambio de rotación del flagelo, ya sea en sentido antihorario u horario, produciendo el desplazamiento bacteriano o su detención, respectivamente. Este cambio de rotación es mediado por el grado de fosforilación de la proteína CheY. En ausencia de CheY-P, se favorece la rotación en sentido antihorario, mientras que el aumento de CheY-P favorece su unión a FliM, produciendo un cambio conformacional de este último y originando el cambio de rotación flagelar en el sentido horario, deteniendo así el desplazamiento. Por último, la fosfatasa CheZ media la desfosforilación de CheY-P (Hazelbauer *et al.* 2008; Waite *et al.* 2018; Sourjik y Wingreen 2012).

Así pues, tal y se como muestra en la Figura 1.12, un aumento en la concentración de quimioatrayente desactiva la autofosforilación de CheA, deteniendo la cadena de fosforilación y aumentando la frecuencia de rotación flagelar en sentido antihorario (flechas rojas), promoviendo el avance bacteriano. Por el contrario, una disminución de quimioatrayente o, en su defecto, un aumento en la concentración de repelente, activa la autofosforilación de CheA, la transducción de señal hasta CheY-P unido a FliM y un aumento de la frecuencia de rotación flagelar en sentido horario (flechas rosas), deteniéndose el avance bacteriano. Paralelamente, la parada en la cadena de fosforilación desplaza la balanza metilación-desmetilación a favor de CheR, aumentando el número de residuos glutamil metilados y la actividad futura de la histidina quinasa CheA, mientras que, el aumento de CheB-P elimina los grupos metilo de los MCP, disminuyendo la sensibilidad de CheA. (Hazelbauer *et al.* 2008).

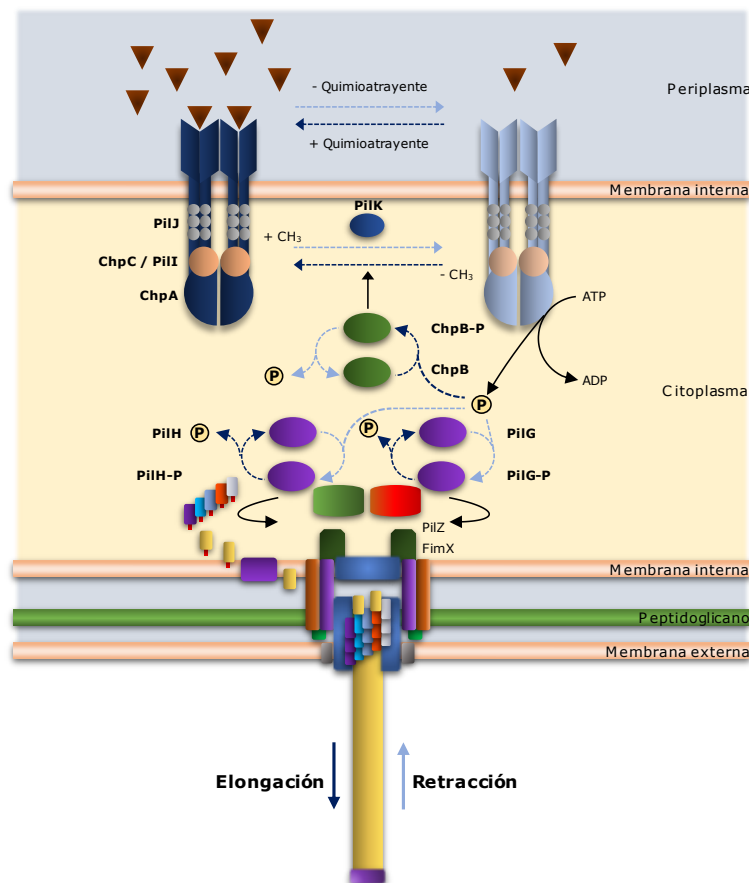
Además de los componentes básicos del sistema quimiotáctico flagelar que conforman el *core* del sistema, existe una diversidad en cuanto a la composición exacta de los componentes del sistema y a las especificidades de los quimiorreceptores. En algunos grupos bacterianos, coexisten un conjunto de proteínas auxiliares que suelen desempeñar funciones reguladoras secundarias, como son las proteínas accesorias CheC, CheD, CheV, CheX o CheZ. Por ejemplo, CheV consta de un dominio proteico similar a CheW y otro a CheY, cuya función hipotética es la de, junto a CheW, favorecer la unión MCP-CheA de forma más eficiente. Por otro lado, las proteínas CheC, CheD y CheX modifican el acoplamiento entre los quimiorreceptores y CheA, actuando como inactivadores de CheA cuando esta se encuentra en un estado de sobreestimulación por ciertos tipos de quimiorreceptores (Bi y Sourjik 2018). Por último, recientemente se ha descrito que, dentro del complejo MCP-CheA-CheW, la recombinasa RecA podría estar también implicada en el sistema quimiotáctico, teniendo esta proteína un papel primordial tanto en la reparación del DNA dentro del sistema SOS, como participante en

## INTRODUCCIÓN

la motilidad bacteriana, a través de su interacción tanto con CheA (Frutos-Grilo *et al.* 2020) como con CheW (Irazoki *et al.* 2016a, 2016b).

### ii) Quimiotaxis asociada a pili de tipo IV

La quimiotaxis asociada a pili de tipo IV es un fenómeno mediante el cual los componentes básicos que constituyen el sistema quimiotáctico modulan la extensión y retracción de los pili de tipo IV. Inicialmente, esta vía de señalización se descubrió en *M. xanthus* que, a pesar de carecer de flagelos, contiene una batería de genes homólogos que codifican los componentes del *core* quimiotáctico necesarios para el *gliding* social (Mauriello *et al.* 2010; Zusman 1982). Posteriormente, en *P. aeruginosa* también se identificaron genes homólogos del *core* quimiotáctico, agrupados en el *cluster IV* u operón *pil-chp* (Whitchurch *et al.* 2004; Burrows 2012). Así pues, tal y como se muestra en la Figura 1.13, el sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV descrito en *P. aeruginosa* PAO1, también se divide en cuatro módulos análogos a los descritos en el caso del sistema flagelar.



**Figura 1.13** Representación esquemática del sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV de *P. aeruginosa* PAO1. Modificado de Sampedro (2015).

El módulo sensor, donde se localizan los quimiorreceptores, está constituido por la proteína PilJ, homóloga a la proteína MCP. A su vez, el grado de metilación de PilJ está bajo control de la metiltransferasa PilK y de la metilesterasa ChpB, proteínas homólogas a CheR y CheB, respectivamente. Este módulo integral de retroalimentación modularía el grado de metilación de PilJ para obtener un registro del pasado químico reciente, variando la sensibilidad de ChpA (proteína homóloga a CheA) a autofosforilarse (Sampedro *et al.* 2015).

El módulo transductor está compuesto por un conjunto de componentes homólogos con ciertas variantes al sistema descrito en *E. coli*. La señal es transmitida del dominio periplasmático de pilJ hasta el complejo formado por la histidina quinasa ChpA, PilI y ChpC (siendo los dos últimos, homólogos a la proteína de acoplamiento CheW) (Sampedro *et al.* 2015). Otra diferencia con la vía de señalización flagelar es la presencia de dos reguladores de respuesta, PilG y PilH, ambos homólogos a CheY, aunque no se desconoce si compiten por los grupos fosfato de ChpA-P (Sampedro *et al.* 2015; Bertrand *et al.* 2010). Por un lado, PilG-P media la extensión del filamento de pilina mediante su interacción con el complejo formado la ATPasa de elongación PilB, la proteína PilZ y la diguanilato ciclase FimX (formadora de c-di-GMP). Por otro lado, PilH-P media la retracción del filamento de pilina mediante su interacción con la ATPasa de retracción PilT/PilU. En el caso de la fosfatasa CheZ del sistema flagelar, el operón *pil-chp* carece de homólogo (Bertrand *et al.* 2010).

Así pues, tal y como se muestra en la Figura 1.13, un aumento en la concentración de quimioatrayente desactiva la autofosforilación de ChpA, deteniendo la cadena de fosforilación y aumentando la extensión del filamento de pilina (flechas azules). Por el contrario, la disminución de quimioatrayente o el aumento de quimiorepelente, activa la autofosforilación de ChpA, aumentando la frecuencia de retracción del pili de tipo IV (flechas cian) (Sampedro *et al.* 2015). Pese a no conocerse el papel que desempeña la vía de señalización Pil-Chp en la regulación del pili de tipo IV, se sabe que la ausencia de alguno de sus componentes abole la motilidad *twitching* (Miller *et al.* 2008; Kearns *et al.* 2001).

### iii) Otros sistemas de quimiotaxis no asociados a apéndices

Además de la modulación de la motilidad dependiente de apéndices, se han descrito sistemas quimiotácticos homólogos, con funciones similares o desconocidas. Por ejemplo, en *M. xanthus*, se han identificado un total de ocho *clusters* codificantes de vías quimiotácticas (Zusman *et al.* 2007). El primer *cluster* identificado, la vía de señalización Frz, regula la motilidad dependiente de pili de tipo IV (*twitching* o *gliding* social) y presenta un homólogo a MCP (FrzCD) citosólico (Mauriello *et al.* 2010). El segundo *cluster* es la vía de señalización Dif, que parece regular el *gliding* social, la producción de exopolisacáridos y el *gliding* aventurero, a través de los complejos focales



## INTRODUCCIÓN

de adhesión (Ward *et al.* 2000; Mauriello *et al.* 2010). En *Porphyromonas gingivalis*, otra especie capaz de realizar desplazamiento *gliding*, se ha identificado un sistema de dos componentes PorXY que, por su homología, se cree que podría estar involucrado en el desplazamiento de *P. gingivales* a través de la regulación del sistema de secreción tipo 9 (T9SS) (Vincent *et al.* 2016).

Otro caso de regulación quimiotáctica no asociada a apéndices es el descrito en *A. baumannii*, en el que se identificó un operón homólogo al operón *pil-chp* de *P. aeruginosa*, el cual incluía todos los componentes *core* del sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV. Concretamente, se identificó una proteína híbrida homóloga a CheA y CheY, cuya disrupción inhibe el desplazamiento mediante *surface-associated motility* debido a cambios en la expresión del pili de tipo I y del QS (Chen *et al.* 2017a).

Por último, algunas vías de señalización homólogas al sistema quimiotáctico canónico parecen no estar relacionadas con el desplazamiento bacteriano. Por ejemplo, en *M. xanthus*, la tercera vía de señalización, Che3, parece regular la formación de cuerpos fructíferos, estructuras multicelulares de especialización (Kirby y Zusman 2003). De los siete sistemas restantes, los sistemas Che4 y Che6 parecen regular en cierta manera el desarrollo de cuerpos fructíferos, Che7 se considera esencial frente al estrés por temperatura, regulando la composición de ácidos grasos de la célula, y, en lo referente a los sistemas Che5 y Che8, se desconoce su función reguladora (Zusman *et al.* 2007).

### 1.1.3. Papel de la motilidad en la virulencia bacteriana

Tal como se ha narrado hasta el momento, el movimiento bacteriano es un fenómeno muy heterogéneo y está regulado por un gran conjunto de proteínas y sistemas interconectados. No es de extrañar que exista esta gran maraña de mecanismos reguladores, ya que, muchas de las bacterias en las que se ha caracterizado el movimiento bacteriano infectan a humanos, animales o plantas. Por lo tanto, el desplazamiento eficiente puede determinar la supervivencia de estos microorganismos dentro o fuera del hospedador (Josenhans y Suerbaum 2002).

Desde hace años, la relación entre motilidad y patogenicidad bacteriana ha sido demostrada en muchas ocasiones, para la mayoría de patógenos móviles descritos. La existencia del vínculo movimiento-virulencia ha abierto la posibilidad de explotar la motilidad bacteriana como diana terapéutica antibacteriana específica, ya sea para tratar o prevenir enfermedades infecciosas (Erhardt 2016).

El movimiento asociado a flagelos fue el primer sistema de desplazamiento que pudo vincularse inequívocamente a la patogenicidad bacteriana. Por lo general, esta evidencia es derivada de estudios con modelos animales, los cuales son infectados con una cepa de estudio mutada, ya sea por interrupción o delección génica de componentes

relacionados con la biogénesis, estructura o vía quimiotáctica del flagelo. De este modo, los resultados obtenidos demostraban que los mutantes asociados a componentes flagelares o relacionados eran menos virulentos que sus respectivas cepas parentales.

En lo referente al sistema quimiotáctico, la eliminación de alguno de sus componentes no siempre va acompañado con una abolición del desplazamiento bacteriano, sin embargo, sí se produce un descontrol de esta, que resulta en la disminución de la virulencia bacteriana (Erhardt 2016). Al mismo tiempo, los flagelos también pueden actuar como apéndices adhesivos en etapas iniciales de colonización de superficies, promoviendo la interacción bacteria-hospedador y facilitando la formación de biofilms (Josenhans y Suerbaum 2002; Chaban *et al.* 2015). Algunas especies flageladas en las que se ha podido demostrar la relación motilidad-virulencia son: *E. coli*, *S. enterica*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *Pseudomonas syringae*, *P. aeruginosa*, *R. solanacearum*, *Campylobacter jejuni*, *L. pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *B. burgdorferi*, *Proteus spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Bordetella spp.* y *Treponema spp.* (Mansfield *et al.* 2012; Josenhans y Suerbaum 2002; Erhardt 2016).

El pili de tipo IV y el desplazamiento tipo *twitching* también ha sido relacionado con la patogenicidad bacteriana. En lo referente a su función en el proceso patogénico, los pili de tipo IV desarrollan un papel primordial en la adhesión y formación de biofilm, permitiendo resistir condiciones desfavorables durante largos períodos de tiempo dentro de sus hospedadores (Craig *et al.* 2004; Burrows 2012). La relación entre el pili de tipo IV, responsable del movimiento *twitching* con la virulencia ha sido demostrada en especies como *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *V. cholerae*, *Acidovorax avenae*, *R. solanacearum*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium bovis*, *M. xanthus* y *Xylella fastidiosa* (Harshey 2003; Erhardt 2016; Mansfield *et al.* 2012; Craig *et al.* 2004; Burrows 2012; Varga *et al.* 2006).

En menor número, algunos sistemas independientes de apéndices también han sido relacionados con la virulencia. Como el movimiento *gliding* en patógenos bacterianos como *P. gingivalis*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Riemerella anatipestifer* (Chen *et al.* 2019; Veith *et al.* 2017; Pérez-Pascual *et al.* 2017); o la implicación del *surface-associated motility* en la virulencia de *A. baumannii* (Skiebe *et al.* 2012).

## 1.2. Patogénesis bacteriana y la resistencia antimicrobiana

Tras más de un siglo desde que el médico alemán Robert Koch descubriese la relación entre bacterias y algunas enfermedades como la tuberculosis, el ántrax y el cólera, el estudio de bacterias patógenas ha avanzado considerablemente (Blevins y Bronze 2010). Años más tarde, el científico británico Alexander Fleming descubrió accidentalmente el efecto de la penicilina como agente antimicrobiano, iniciando la era de los antibióticos y con ellos la medicina moderna para el tratamiento de enfermedades

## INTRODUCCIÓN

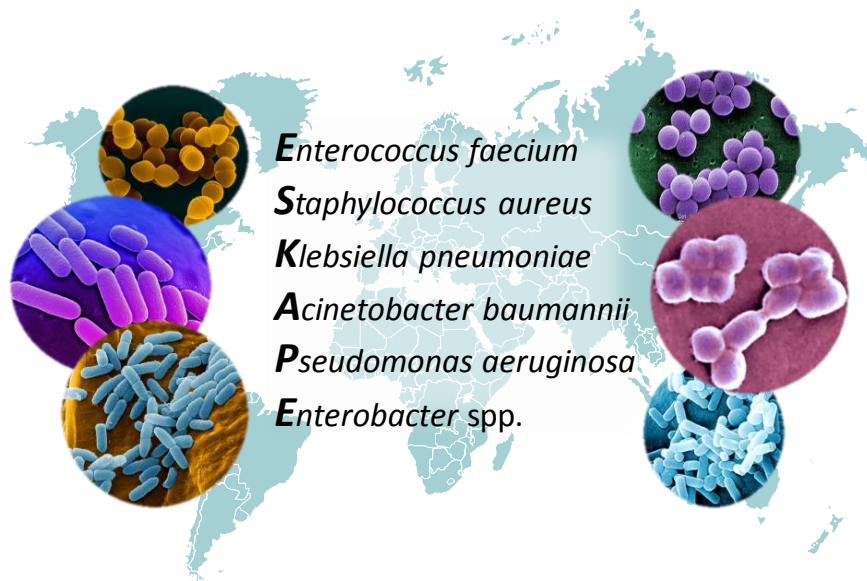
infecciosas, tanto en humanos como animales. Las enfermedades infecciosas han constituido una de las principales causas de mortalidad en la historia de la humanidad, por lo que el descubrimiento y comercialización de nuevos antibióticos ha reducido significativamente la morbilidad y mortalidad de muchas patologías que antaño se asociaban a pronósticos fatales, resultando en una considerable mejora en la calidad de vida de las personas. Sin embargo, el uso de los antibióticos durante casi un siglo ha inducido la aparición de uno de los problemas más importantes a los que las autoridades sanitarias se enfrentan actualmente, la resistencia antimicrobiana (Mulani *et al.* 2019).

### 1.2.1. Los ESKAPE y otras bacterias multirresistentes

La adquisición de una resistencia antimicrobiana no es un hecho aislado en la actualidad, ya que desde el descubrimiento de los antibióticos se han descrito casos de nuevas cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos concretos. Sin embargo, la plasticidad evolutiva de las bacterias junto con la selección natural, principalmente dada en ambientes hospitalarios, y el uso indebido de los antibióticos, ha desencadenado un aumento alarmante de la aparición de resistencias antimicrobianas a nivel global (Rice 2008; Mulani *et al.* 2019). Así pues, el aumento de cepas resistentes a los antimicrobianos comúnmente utilizados para el tratamiento de estas infecciones, junto con la disminución del descubrimiento y uso de nuevos antibióticos, hace que cada vez sea más difícil tratar las infecciones producidas por este conjunto de bacterias, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad, junto con la prolongación de los tratamientos dados a los pacientes ingresados y, finalmente, un aumento de los costes derivados (Zhen *et al.* 2019).

Anualmente, se estima el 15% de las infecciones hospitalarias adquiridas (o infecciones nosocomiales) son debidas a bacterias multirresistentes y que las pérdidas derivadas de la lucha contra este tipo de infecciones ascienden a unos 20 mil millones de dólares solo en los Estados Unidos y de la mitad en la Unión Europea. Además, para el 2050, se pronostica que los gastos derivados a causa de las infecciones provocadas por bacterias multirresistentes equivaldrán a entre el 1,1 y el 3,8% del producto interior bruto (PIB) mundial, siendo los países subdesarrollados los que sufrirán un efecto más devastador (Zhen *et al.* 2019; Mulani *et al.* 2019).

La aparición de cepas multirresistentes está estrechamente asociada a seis especies bacterianas, las cuales representan la mayoría de casos diagnosticados como infecciones hospitalarias. Este grupo fue denominado con el acrónimo "ESKAPE" (Fig. 1.14), debido a su capacidad de "escapar" de la acción biocida de los antimicrobianos comúnmente utilizados: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Rice 2008; Boucher *et al.* 2009).



**Figura 1.14** Grupo de los ESKAPE, primer conjunto de especies con importancia clínica por la adquisición de resistencias antimicrobianas.

La infección por alguno de los ESKAPE aumenta la probabilidad de recibir una terapia antibiótica inapropiada, resultando en un incremento de la tasa de mortalidad y la oportunidad de estos a propagarse a nivel hospitalario entre pacientes o personal sanitario (Zhen *et al.* 2019; Boucher *et al.* 2009). A continuación, se detallan brevemente las características y repercusiones de cada uno de los miembros ESKAPE.

Las especies del género *Enterococcus* se caracterizan por ser cocos Gram-positivos, agrupados en forma de diplococo o cadenas, cuyo hábitat común es el intestino de humanos o de otros animales y, de las más de 20 especies que conforman el género, *E. faecium* y *Enterococcus faecalis* son las de mayor relevancia clínica. Generalmente, las infecciones causadas por patógenos de este género son endógenas, aunque la infección cruzada puede ocurrir en pacientes hospitalizados. En este segundo caso y durante la última década, el número de infecciones causadas por cepas resistentes a ampicilina o vancomicina ha aumentado considerablemente, siendo las cepas VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus*) las más preocupantes. Las infecciones causadas por VRE fueron detectados inicialmente en los Estados Unidos, donde actualmente más de la mitad de los aislados descritos de *E. faecium* son resistentes a vancomicina, y en la Unión Europea, a pesar de haber una incidencia mucho menor, los casos siguen aumentando (Santajit y Indrawattana 2016; Arias y Murray 2012).

*S. aureus* es otro coco Gram-positivo, agrupado en forma de racimo de uva, que forma parte de la microbiota normal de humanos y animales, principalmente en la piel nariz y perineo. La transmisión entre humanos es relativamente fácil, por contacto directo o por vía aérea. Antiguamente, infecciones causadas por esta especie eran fácilmente tratables mediante la penicilina, sin embargo, el aumento de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas degradadoras de este antibiótico ha aumentado a tal nivel

## INTRODUCCIÓN

que actualmente la inmensa mayoría de aislados clínicos son resistentes a este, por lo que ha sido sustituido por la meticilina. A pesar de ello, la incidencia de infecciones causadas por cepas MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) también ha aumentado con los años. Para el tratamiento de las infecciones provocadas por estas cepas, los antibióticos de primera línea recomendados han sido los glucopeptidos como la vancomicina y la teicoplanina. No obstante, también se han aislado numerosas cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina y con menor sensibilidad a la teicoplanina. Además, la transmisión de genes que confieren resistencia a vancomicina es frecuente, extendiendo los casos de infecciones provocadas por cepas VRSA (*Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) en todo el mundo (Santajit y Indrawattana 2016; Chambers y DeLeo 2009).

*K. pneumoniae* es un bacilo Gram-negativo generalmente encapsulado y causante de una gran fracción de las infecciones nosocomiales descritas, principalmente neumonías. La problemática de este patógeno se centra en su capacidad de adquirir una gran variedad de genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas, aumentando así el número de cepas resistentes a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. En este tercer grupo de antibióticos, usados para el tratamiento de infecciones persistentes provocadas por bacterias Gram-negativas, ha surgido un conjunto de cepas con una relativa prevalencia conocidas como CRKP (*Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*). Las cepas CRKP han ocasionado una importante alarma referente a la resistencia antimicrobiana, ya que estas cepas productoras de carbapenemasas son prácticamente imposibles de eliminar tras su colonización e infección, y otros antimicrobianos como los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas podrían verse también afectados (Queenan y Bush 2007; Santajit y Indrawattana 2016).

Las especies del género *Acinetobacter* son cocobacilos Gram-negativos cuya distribución mundial es ubicua, siendo *A. baumannii* la que presenta mayor notoriedad. Esta especie presenta una gran resistencia al estrés ambiental, facilitando su transmisión por contacto directo y produciendo infecciones nosocomiales. *A. baumannii* es causante de diversas infecciones en humanos, principalmente del tracto respiratorio. Además, las cepas aisladas son frecuentemente resistentes a varios antibióticos, siendo muy problemático para las salas de cirugía y unidades de cuidados intensivos (UCI). Las cepas de mayor relevancia clínica son aquellas productoras de carbapenemasas, presentando resistencia a colistina e imipenem, siendo ambos antimicrobianos de última elección (Boucher *et al.* 2009; Santajit y Indrawattana 2016). Dado que una de las bacterias de estudio en esta Tesis es *A. baumannii*, más adelante se profundizará en las características de este patógeno nosocomial.

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo, propio de la microbiota intestinal y dérmica humana, de baja transmisión salvo en pacientes hospitalizados, los cuales son infectados por contacto directo, fómites o de forma endógena. La mayoría de cepas son intrínsecamente menos susceptibles a muchos antimicrobianos y muchas son capaces

de desarrollar resistencia antimicrobiana durante el tratamiento del paciente, especialmente a carbapenemas como el imipenem, mediante la combinación de bombas de eflujo y producción de carbapenemasas. Al igual que en *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* puede adquirir fácilmente nuevas resistencias y, a pesar de la emergencia clínica provocada, la colistina parece seguir siendo efectiva contra la mayoría de cepas multirresistentes (Boucher *et al.* 2009; Santajit y Indrawattana 2016).

Por último, *Enterobacter* spp. es un género de bacilos Gram-negativos que incluye especies bacterianas con capacidad de producir infecciones nosocomiales, presentando un amplio abanico de mecanismos de resistencia antimicrobiana mediante la expresión de varias enzimas degradadoras de antibióticos y que, en su conjunto, hace que algunas cepas multirresistentes solo sean sensibles al tratamiento por colistina y tigeciclina (Boucher *et al.* 2009; Santajit y Indrawattana 2016).

En 2016, la OMS (Organización Mundial de la Salud) recopiló un conjunto de datos referentes a la aparición de cepas multirresistentes, no solo dentro de los miembros del grupo ESKAPE, sino también de otras especies bacterianas. Con ello se creó una lista con las especies bacterianas prioritarias para su investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. Esta lista incluye a doce grupos taxonómicos, divididos a su vez en tres grupos de prioridad, ordenados de mayor a menor relevancia (Tacconelli *et al.* 2018).

En prioridad 1, o crítica, se encuentra *A. baumannii*, *P. aeruginosa* (ambas resistentes a carbapenemas) y especies de la familia *Enterobacteriaceae* (resistentes a carbapenemas y tercera generación de cefalosporinas), que incluyen a *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp.. En prioridad 2, o alta, se encuentra *E. faecium* (resistente a vancomicina), *S. aureus* (resistente a meticilina y vancomicina), *H. pylori* (resistente a claritromicina), *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. (resistentes a fluoroquinolonas) y *N. gonorrhoeae* (resistente a fluoroquinolonas y tercera generación de cefalosporinas). Por último, en el grupo de prioridad 3, o media, se encuentra *S. pneumoniae* (no susceptible a penicilina), *Haemophilus influenzae* (resistente ampilicina) y *Shigella* spp. (resistente a fluoroquinolonas). Cabe destacar que, *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, no se encontraba en esta lista de prioridad de la OMS, debido a que ya se había establecido previamente la emergencia en el desarrollo de nuevos tratamientos frente a cepas multirresistentes (Tacconelli *et al.* 2018).

En este contexto, existe un esfuerzo en la investigación centrada en nuevos tratamientos terapéuticos alternativos al uso de antibióticos para solventar la problemática de las multirresistencias, incluyendo los péptidos antimicrobianos, las nanopartículas de plata, la terapia con bacteriófagos o con sus lisinas, el uso de probióticos, los anticuerpos terapéuticos, los inhibidores sintéticos específicos para las enzimas de resistencia o las bombas de eflujo bacterianas y la inhibición de la formación de biofilms (Santajit y Indrawattana 2016; Mulani *et al.* 2019).

### 1.2.2. *Acinetobacter baumannii*

El patógeno nosocomial *A. baumannii* es una de las dos especies bacterianas con las que se han realizado los estudios pertinentes mostrados en esta Tesis Doctoral. A continuación, se detalla de forma exhaustiva las características principales de esta bacteria, incluyendo los descubrimientos relacionados con sus sistemas de motilidad y mecanismos reguladores.

#### 1.2.2.1. El género *Acinetobacter*

*A. baumannii*, junto a las demás especies del género, son bacterias Gram-negativas con una morfología coco-bacilar agrupadas en diplococos o en pequeñas cadenas. A pesar de ello, la tinción de Gram no es muy eficiente debido a la resistencia a la decoloración por etanol, pudiendo quedar células teñidas de forma positiva. Otra característica es su patrón bioquímico, utilizado antiguamente como método de identificación: aerobio estricto, no fermentador, oxidasa e indol negativo, catalasa positivo y sin capacidad de reducir los nitritos (Baumann *et al.* 1968; Bergogne-Bérézin y Towner 1996).

La taxonomía del género *Acinetobacter* ha variado enormemente desde su descubrimiento. En un principio, el primer dato descrito sobre este grupo fue en 1911, denominándolo *Micrococcus calcoaceticus*, destacándose la capacidad de este microorganismo de crecer en medio mínimo con acetato de calcio. Más tarde, se acuñó el término *Acinetobacter* para distinguir las especies del género *Achromobacter*, y en 1968 se agruparían estas cepas con características nutricionales y pruebas bioquímicas similares en un grupo cercano al grupo *Moraxella* (Brisou y Prevot 1954; Baumann *et al.* 1968). No fue hasta 1971 cuando el género *Acinetobacter* sería catalogado de forma oficial incluyendo las especies *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter anitratus* y *Acinetobacter lwoffii*. Posteriormente, con la introducción de las técnicas de hibridación se pudieron describir más especies dentro del género, entre las que se incluyen *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii* (Bouvet y Grimont 1986).

En la actualidad, se han identificado nuevas especies asociadas tanto a humanos como al medioambiente: *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter grimontii*, *Acinetobacter tjernhergiae*, *Acinetobacter townneri*, *Acinetobacter tandoii* y *Acinetobacter gernerii* (Peleg *et al.* 2008; Nemeč *et al.* 2003; Carr *et al.* 2003). De todas las especies, *A. baumannii* es la especie más característica del género, debido a su repercusión sanitaria, clasificándose filogenéticamente dentro del dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase  $\gamma$ -*Proteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Moraxellaceae*, junto a los géneros *Moraxella* y

*Psychrobacter* (Rossau *et al.* 1991). Así pues, la clasificación dentro del género sigue siendo difícil de determinar, estando conformado por 17 especies y 14 más pendientes de validación, destacando *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis* por ser patógenos humanos (L. Dijkshoorn 2008; Visca *et al.* 2011).

#### **1.2.2.2. Patología asociada a infecciones por *A. baumannii***

*A. baumannii* fue catalogado como patógeno nosocomial a finales de la década de los setenta y, con los años, su repercusión a nivel sanitario ha ido aumentando hasta ser considerado por la OMS como el patógeno multirresistente con mayor prioridad para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos (Tacconelli *et al.* 2018). Actualmente, *A. baumannii* es causa habitual de brotes en centros sanitarios, los cuales representan aproximadamente el 2% de todas las infecciones asociadas a la atención médica en los Estados Unidos y Europa, sin embargo, estas tasas son dos veces más altas en Asia y Medio Oriente (Harding *et al.* 2018). Además, el número de aislamientos de cepas multirresistentes durante estos brotes ha ido aumentando en distintas regiones del globo, generalmente en pacientes con enfermedades subyacentes, principalmente en aquellos que precisan ventilación mecánica (Towner 2009).

La preocupación sanitaria por *A. baumannii* viene dada por su persistencia en el ambiente y la dificultad de tratar a los infectados debido a las multirresistencias exhibidas. La predisposición a infectarse por *A. baumannii* radica esencialmente en el ingreso en un centro hospitalario, debido a una cirugía mayor, presentar heridas como quemaduras o tener una enfermedad base que predisponga un estado inmunocomprometido. Por ejemplo, estar ingresado en la UCI durante un periodo de tiempo relativamente largo y en contacto con material médico aumenta considerablemente la exposición a este patógeno. Por otro lado, la ventilación mecánica, el uso de catéteres, los procedimientos invasivos o el uso previo de antibióticos son factores de riesgo clave para desarrollar la infección. Otros grupos de riesgo son los inmunodeprimidos como ancianos, niños o trasplantados (García-Garmendia *et al.* 2001).

La transmisión de *A. baumannii* en este ambiente es relativamente fácil, ya sea a través del contacto directo entre pacientes y/o personal sanitario, mediante aerosoles por vía aérea, fómites o mediante cualquier tipo de superficie abiótica susceptible de contener al microorganismo (Wieland *et al.* 2018; Dijkshoorn *et al.* 2007). Respecto a su persistencia, *A. baumannii* es capaz de resistir condiciones adversas del ambiente en el que se encuentra, como la temperatura, el pH y la humedad, lo que hace muy complicada su erradicación y permite su supervivencia largos periodos de tiempo en fómites que pueden actuar como focos de infección. Además, tanto las personas sanas como el personal sanitario pueden actuar como vectores del patógeno, trasladándolo a



## INTRODUCCIÓN

pacientes no infectados del centro hospitalario o incluso a la comunidad (Peleg *et al.* 2008; McConnell *et al.* 2013).

En lo referente a la patología asociada a este microorganismo, *A. baumannii* ha sido considerado un patógeno de baja virulencia, principalmente porque no supone *per se* una amenaza para personas sanas. Sin embargo, en hospedadores susceptibles como pacientes ingresados en hospitales, el cuadro clínico puede ser diverso y muy grave, en función de la vía de entrada al organismo. Las manifestaciones clínicas más comunes son la neumonía, seguido por la bacteriemia, infecciones de heridas o quemaduras y, finalmente, infecciones del tracto urinario y meningitis (McConnell *et al.* 2013).

La neumonía es el cuadro clínico más común en las infecciones causadas por *A. baumannii*, cuya gravedad suele depender del estado del afectado y de las complicaciones del tratamiento con antibióticos (Luna y Aruj 2007; McConnell *et al.* 2013). La bacteriemia se produce cuando la bacteria alcanza el torrente sanguíneo, tras la progresión del patógeno desde la vía de entrada hasta la colonización y diseminación del sistema circulatorio, llegando a ser mortal sin el tratamiento adecuado. Los pacientes más afectados son aquellos que se encuentran ingresados en la UCI (Cisneros y Rodríguez-Baño 2002). En heridas y quemaduras la infección por *A. baumannii* suele ser muy persistente y difícil de tratar. Curiosamente, este cuadro se da más comúnmente en el ámbito militar más que en la unidad de quemados, siendo los brotes de *A. baumannii* ocurridos en la guerra de Irak y Afganistán los casos más conocidos (Petersen *et al.* 2007; Scott *et al.* 2007). Por último, las infecciones del tracto urinario son poco frecuentes, pero si no se tratan adecuadamente pueden llegar a producir un cuadro de bacteriemia, y en lo referente a la meningitis, estas suelen adquirirse tras una cirugía del sistema nervioso central.

En su conjunto, se estima que la tasa de mortalidad en estas infecciones hospitalarias oscila entre el 23 y el 68% (Metan *et al.* 2007; McConnell *et al.* 2013; Maragakis y Perl 2008). A pesar de que los brotes producidos por *A. baumannii* suelen centrarse dentro del ambiente hospitalario, también se han reportado infecciones a nivel comunitario, en países con climas cálidos y húmedos, o bien en personas con enfermedades subyacentes como la diabetes mellitus, enfermedad obstructiva crónica, fumadores o alcohólicos. En este caso, la tasa de mortalidad por *A. baumannii* comunitario se estima próxima al 64% (Dexter *et al.* 2015; Falagas *et al.* 2007; Patamatamkul *et al.* 2017).

Por último, como se ha dicho anteriormente, la dificultad en el tratamiento por infecciones causadas por *A. baumannii* radica, como en los otros miembros del grupo ESKAPE, en la aparición cada vez más frecuente de cepas multirresistentes que limitan la diversidad y cantidad de antimicrobianos disponibles (Boucher *et al.* 2009).

En la actualidad, el tratamiento más efectivo para erradicar infecciones de este patógeno es el uso combinado de carbapenemas y sulbactam (un  $\beta$ -lactámico y un

inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, respectivamente) (Peleg *et al.* 2008). En caso de aislarse cepas resistentes, como tratamiento de última elección suele administrarse colistina o tigeciclina, siendo la primera una polimixina con efectos nefrotóxicos y la segunda una tetraciclina derivada de la minociclina (Plachouras *et al.* 2007; Mutlu Yilmaz *et al.* 2012).

### 1.2.2.3. Determinantes patogénicos y regulación

Además de los mecanismos de resistencia antimicrobiana, *A. baumannii* ostenta una variedad de componentes que favorecen su virulencia, junto a sistemas reguladores que controlan su expresión (Skariyachan *et al.* 2019; De Silva y Kumar 2019).

#### i) Factores de virulencia

A continuación, se describen los principales factores de virulencia de *A. baumannii*, también resumidos en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2** Principales factores de virulencia en *A. baumannii*. Modificado de Skariyachan (2019).

Factor de virulencia	Efectores	Implicación en patogénesis	
<b>Porinas</b>	OmpA	Adherencia e invasión, inducción de apoptosis, resistencia sérica y antimicrobiana, motilidad, persistencia y formación OMV y biofilm	
<b>Bombas de eflujo</b>	Bombas ABC, MATE, SMR, MFS, RND y PACE	Resistencia antimicrobiana, motilidad y secreción de sideróforos	
<b>Vesículas de membrana externa</b>	Componentes de membrana, DNA, RNA y otros factores de virulencia	Transferencia horizontal génica y secreción de varios componentes efectores	
<b>Fosfolipasas</b>	PLC y PLD	Efecto citotóxico, invasión, evasión respuesta inmune y resistencia sérica	
<b>Lipopolisacáridos y lipooligosacáridos</b>	LPS y LOS	Integridad de la membrana, evasión respuesta inmune, inducción a apoptosis celular y resistencia antimicrobiana y sérica	
<b>Cápsula polisacárida</b>	<i>locus</i> K1, EPS, PglC, PglL y BfmRS	Formación de biofilm y resistencia antimicrobiana y sérica	
<b>Sistemas de secreción</b>	<b>T1SS</b>	Efectores RTX y Bap	Formación de biofilm y efecto citotóxico
	<b>T2SS</b>	Lipasas, elastasas, fosfatasa y fosfolipasas	Secreción de enzimas degradadoras
	<b>T4SS</b>	Plásmidos pACICU2 y pAB-CC	Transferencia de resistencias antimicrobianas
	<b>T5SS</b>	AbFhaBC, CdiABI y Ata	Efecto citotóxico, adhesión y formación de biofilm
	<b>T6SS</b>	Peptidoglicano hidrolasas y nucleasas	Competencia con otras bacterias
<b>Proteínas implicadas en la captación de nutrientes</b>	Sistemas de adquisición de hierro, zinc y manganeso	Invasión, persistencia y estrés oxidativo	
<b>Proteínas implicadas en la formación de biofilm</b>	Pili de tipo I y IV, Bap, OmpA, cápsula polisacárida, T1SS y T5SS	Resistencia antimicrobiana, estrés ambiental, evasión sistema inmune, motilidad y formación de biofilm	

#### Porinas

Las porinas son proteínas de la membrana externa asociadas a la modulación de la permeabilidad celular. OmpA (*Outer membrane protein Acinetobacter*) es la porina

## INTRODUCCIÓN

con estructura de barril  $\beta$  más abundante en la membrana externa de *A. baumannii* y, además, un importante factor de virulencia y mecanismo de resistencia, ya que la disminución de la expresión de esta proteína dificulta la absorción de antimicrobianos (Smani *et al.* 2014; McConnell *et al.* 2013). Además, OmpA juega un papel clave en otros procesos patogénicos, como la inducción de la apoptosis de células epiteliales al liberar moléculas proapoptóticas, la persistencia de *A. baumannii* en pulmones, facilita la motilidad, adherencia e invasión al interactuar con la fibronectina e interfiere en la respuesta inmune mediada por el complemento (Smani *et al.* 2014; Lee *et al.* 2017; Li *et al.* 2018; Clemmer *et al.* 2011).

### **Bombas de eflujo**

Una de las principales características de *A. baumannii* es su gran capacidad para la adquisición de mecanismos de resistencia a prácticamente cualquier tipo de antimicrobiano. Entre ellos, destacan las  $\beta$ -lactamasas, los AME (*Aminoglycoside-Modifying Enzymes*), la modificación de dianas como las PBP (*Penicillin-binding proteins*), modificaciones en GyrA, ParC (que confieren resistencia a quinolonas), en el rRNA 16S ArmA y en RpoB (confiriendo resistencia a aminoglucoSIDOS y rifampicina, respectivamente) (Santajit y Indrawattana 2016; Lee *et al.* 2017; NemeC *et al.* 2004; Lin 2014). Además de los mecanismos mencionados, las bombas de eflujo también son un importante mecanismo de resistencia en *A. baumannii*.

Las bombas de eflujo son estructuras multiproteicas, localizadas en la pared bacteriana, que expulsan de forma activa compuestos al medio extracelular, entre ellos muchos antimicrobianos, evitando así su acumulación intracelular (Fernández y Hancock, 2012). Las bombas se clasifican en seis superfamilias; en función de su estructura, fuente de energía y tipo de sustrato: ABC (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette*), MATE (*Multidrug and Toxic compound Extrusion*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance Nodulation Division*) y PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*). En *A. baumannii* se han identificado bombas pertenecientes a todas las familias descritas (Du *et al.* 2018; Hassan *et al.* 2015; Piddock 2006). Además de su papel en la adquisición de resistencias a los antimicrobianos, también se ha reportado su implicación en otros procesos esenciales para la patogénesis de *A. baumannii*, como la acción de algunas bombas en la captación de hierro, a través de la secreción de sideróforos; o en la motilidad *surface-associated motility*, mediante la extrusión de surfactantes que mediarían en la virulencia de este patógeno nosocomial (Pérez-Varela *et al.* 2019; Lee *et al.* 2017; Morris *et al.* 2019).

### **Vesículas de membrana externa**

Las vesículas de membrana externa, también llamadas OMV (*Outer Membrane Vesicle*), son vesículas de entre 20 y 200 nm de diámetro secretadas por muchos patógenos que se componen de lipopolisacáridos, proteínas periplasmáticas, fosfolípidos, DNA, RNA y otros compuestos efectores. Las OMVs permiten al patógeno interactuar con las células del hospedador sin necesidad de un contacto directo y lanzar diversos factores de virulencia, como OmpA, fosfolipasas y proteasas que inducen un efecto citotóxico prominente. Las OMVs de *A. baumannii* también están relacionadas con la propagación de la resistencia a los antibióticos e inducen la transferencia horizontal de genes, como por ejemplo aquellos codificantes de carbapenemasas (Rumbo *et al.* 2011; Skariyachan *et al.* 2019).

### **Fosfolipasas**

Las fosfolipasas son enzimas lipolíticas esenciales para el metabolismo de los fosfolípidos y, además, un factor de virulencia en muchas bacterias. En *A. baumannii* se han identificado las fosfolipasas PLC y PLD, que desestabilizan la membrana celular eucariota, interfieren en la respuesta inmune, producen un efecto citotóxico y ayudan a la invasión y a la resistencia sérica (Lee *et al.* 2017; Skariyachan *et al.* 2019).

### **Lipopolisacáridos y lipooligosacáridos**

Tanto el lipopolisacárido (LPS) como el lipooligosacárido (LOS) son componentes esenciales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y juegan un papel primordial ejerciendo como endotoxinas bacterianas. Tanto los LPS como LOS están compuestos de un lípido A, glicosilado con oligosacáridos centrales y, en el caso del LPS, de repeticiones del antígeno O en el extremo libre. En ambos componentes, el lípido A es la región más antigénica siendo también la diana terapéutica de la colistina (Whitfield y Trent 2014).

Algunas enzimas de *A. baumannii* son capaces de modificar regiones del lípido A mediante la adición de fosfoetanolamina o galactosamina, adquiriendo evasión frente a la acción del sistema inmune y disminuyendo la susceptibilidad a colistina. Además, *A. baumannii*, junto con *N. meningitidis* y *Moraxella catarrhalis* son las únicas bacterias conocidas capaces de disminuir los niveles de LOS en la membrana externa hasta su pérdida completa. Esta adaptación extrema es conferida por mutaciones en los genes biosintéticos del lípido A y precisa de mecanismos compensatorios, como la sobreexpresión de lipoproteínas para estabilizar la membrana externa (Skariyachan *et al.* 2019; Harding *et al.* 2018).

### **Cápsula polisacárida**

Los polisacáridos capsulares están formados por una gran variedad de componentes y, en el caso de *A. baumannii*, genes como *ptk*, *epsA*, *pglC* y *pglL* deben estar correctamente expresados ya que cualquier cambio por disrupción génica altera negativamente la supervivencia y virulencia de este patógeno. Este polisacárido capsular juega un papel clave en la resistencia antimicrobiana, la respuesta inmune mediada por el complemento y la formación de biofilm (Geisinger y Isberg 2015; Russo *et al.* 2010; Harding *et al.* 2018).

### **Sistemas de secreción**

Como se ha descrito anteriormente, los mecanismos para secretar componentes efectores fuera de la célula bacteriana son muy diversos. En *A. baumannii*, se han identificado cinco de los nueve sistemas descritos (Elhosseiny y Attia 2018).

El T1SS (*Type 1 Secretion System*) se ha asociado a la extrusión de efectores tóxicos como RTX y a la formación de biofilm mediante la proteína Bap (Harding *et al.* 2017; Skariyachan *et al.* 2019).

El T2SS (*Type 2 Secretion System*) está formado por un complejo de proteínas Gsp dependiente de sistemas de translocación de sustrato Sec, cuyos principales efectores son enzimas degradadoras, críticas para la virulencia de este patógeno, como lipasas (LipA y LipH), peptidasas (CpaA), elastasas, fosfatasas y fosfolipasas (Skariyachan *et al.* 2019; Elhosseiny y Attia 2018).

El T4SS (*Type 4 Secretion System*) de *A. baumannii* apenas ha sido caracterizado. De los pocos estudios realizados, se han identificado genes homólogos presentes en plásmidos como pACICU2 y pAB-CC, los cuales contienen genes homólogos al sistema T4SS de otros patógenos, como *Legionella* o *Coxiella*, cuya función hipotética sería la transmisión de genes de resistencia a antimicrobianos (Liu *et al.* 2014; Morris *et al.* 2019).

El T5SS (*Type 5 Secretion System*), también llamado de autotransporte, es el mecanismo de secreción más simple descrito, cuyos elementos están dirigidos por secuencias señales que indican la localización subcelular donde establecerse. El T5SS se subdivide en cinco familias, de las cuales, en *A. baumannii*, se han identificado dos sistemas del grupo Vb, AbFhaBC y CdiABI, y uno del grupo Vc, Ata (Morris *et al.* 2019). En el sistema Fha, AbFhaC forma un poro de membrana que permite la translocación de AbFhaB al exterior que actuaría como una adhesina (Pérez *et al.* 2017). El sistema CDI (*Contact-Dependent Inhibition*), a diferencia de los sistemas Vb canónicos, consta de tres componentes: la proteína formadora del poro CdiB, la toxina hemaglutinina de secreción CdiA y CdiI, la proteína de inmunidad frente a la inhibición de CdiA (Harding *et al.* 2017). Por último, el sistema Ata (*Acinetobacter trimeric autotransporter*), actúa

como adhesina en matrices extracelulares de tipo colágeno y facilita la formación de biofilms (Bentancor *et al.* 2012).

El último sistema descrito en *A. baumannii* es el T6SS (*Type 6 Secretion System*), que actúa exclusivamente sobre otras células bacterianas y permite la secreción de una variedad de toxinas, incluidas peptidoglicano hidrolasas y nucleasas, cuyo efecto bactericida supondría una ventaja frente a otros patógenos competidores (Morris *et al.* 2019). Se ha observado que, en cepas que contienen plásmidos con genes que codifican resistencias a antimicrobianos, estos sistemas suelen estar inhibidos, sugiriéndose un mecanismo de captación de multirresistencias desde otras células bacterianas (Weber *et al.* 2015).

### **Proteínas implicadas en la captación de nutrientes**

Los metales de transición como el hierro, el manganeso y el zinc son indispensables para la mayoría de seres vivos, incluidos los microorganismos patógenos. Para ello, las bacterias patógenas como *A. baumannii* han desarrollado sistemas para poder captar estos micronutrientes una vez han infectado a sus hospedadores.

El hierro es un micronutriente esencial en la mayoría de organismos superiores, implicado en la captación y transporte de oxígeno en sangre. *A. baumannii* dispone de dos mecanismos para la adquisición de este ion, mediante la captación directa por el sistema Feo, o bien mediante la secreción de moléculas quelantes de alta afinidad para el hierro conocidas como sideróforos (Morris *et al.* 2019). Se conocen cinco grupos de sideróforos distintos en este patógeno, siendo la acinetobactina la más representativa. Muchos de los genes implicados en la síntesis de sideróforos se localizan en unidades transcripcionales junto con genes codificados de bombas de eflujo que los secretan y que, a su vez, se encuentran bajo el control de Fur, principal regulador transcripcional implicado en el control de la captación de hierro (Antunes *et al.* 2011; Eijkelkamp *et al.* 2011a). A su vez, la limitación de hierro, por interrupción de alguno de estos mecanismos de captación, conduce a una atenuación de la virulencia de este patógeno, como la desregulación de los pili de tipo I y IV, la disminución en la capacidad de formar biofilm y la resistencia al estrés oxidativo (Ajiboye *et al.* 2018; Morris *et al.* 2019).

El zinc es otro micronutriente indispensable para los seres vivos que, durante una infección, producen calprotectina, un quelante de zinc que limita su biodisponibilidad como mecanismo de inmunidad nutricional. A su vez, *A. baumannii* contrarresta los efectos de la calprotectina mediante sistemas de captación de zinc; el sistema ZnuABC, que se encarga de captar zinc exógeno; y ZigA, que regula los niveles intracelulares de este ion. Al mismo tiempo, ambos sistemas están bajo control del regulador Zur (Nairn *et al.* 2016; Lee *et al.* 2017).

## INTRODUCCIÓN

Por último, en el caso del manganeso, la infección provocada por *A. baumannii* también desencadena la disminución de su biodisponibilidad, debido a la producción de calprotectina. En este patógeno, los sistemas de captación han sido poco estudiados, conociéndose el transportador MumT y la urea carboxilasa MumC, encargados de la acumulación de este ion en respuesta frente a la inmunidad nutricional del hospedador (Juttukonda *et al.* 2016; Morris *et al.* 2019; Tomaras *et al.* 2003).

### **Proteínas implicadas en la formación de biofilm**

Los biofilms, o biopelículas, son comunidades microbianas complejas que viven adheridas sobre superficies bióticas o abióticas y establecidas en una matriz de diversas sustancias poliméricas. Hay tres pasos clave para la formación de biofilm: la adhesión, el crecimiento o maduración y el desprendimiento o salida de las células bacterianas del biofilm (Santajit y Indrawattana 2016).

En *A. baumannii*, la formación de biofilm favorece su supervivencia en ambientes adversos, al dificultar la acción de los antimicrobianos, conferir resistencia a la desecación y al estrés nutricional o evadir la respuesta inmune del hospedador (Di Domenico *et al.* 2017). La formación de estas comunidades microbianas precisa de un conjunto de factores, muchos de ellos mencionados anteriormente. Por ejemplo, la porina OmpA y la cápsula polisacárida facilitan la adhesión a superficie durante la primera etapa de formación del biofilm, mientras que componentes efectores del T1SS (proteínas Bap) y T5SS (poli- $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamina) parecen estar implicados en su mantenimiento (Di Domenico *et al.* 2017; Choi *et al.* 2009).

Otros elementos primordiales son los pili de tipo IV y los pili de tipo I. El primero, además de estar involucrado en la motilidad *twitching*, se encuentra implicado en adherencia y la formación de biofilm (Dhabaan *et al.* 2016). El segundo, el pili de tipo I o Csu, también se ha relacionado con la motilidad, la adhesión y la formación de biofilm (Moon *et al.* 2017).

### **ii) Regulación de la virulencia**

Como en otras bacterias patógenas, la expresión de los factores de virulencia está rigurosamente bajo el control de sistemas reguladores. En *A. baumannii*, se han caracterizado algunos de estos sistemas, como el diguanilato cíclico, el QS o los sistemas de dos componentes.

Como se dijo anteriormente, el QS en *A. baumannii* está regulado por las proteínas AbaI y AbaR (LuxI y LuxR, respectivamente), cuya implicación en virulencia viene dada por el control de la motilidad y la capacidad de formar biofilm en este patógeno (Clemmer *et al.* 2011; Niu *et al.* 2008). Por otro lado, la vía de señalización

del c-di-GMP, recientemente identificada en *A. baumannii*, regula negativamente el *surface-associated motility* y favorece la formación de biofilm (Ahmad *et al.* 2020). En lo referente a los sistemas de dos componentes, estudios realizados en este patógeno estiman unos veinte operones que codifican estos reguladores, sin embargo, el número de sistemas caracterizados es menor (De Silva y Kumar 2019).

El sistema AdeR/AdeS fue el primer mecanismo regulatorio descrito en *A. baumannii*. Este sistema se encarga del control de la expresión de la bomba de eflujo AdeABC de la familia RND, siendo partícipe de la resistencia a los aminoglucósidos y la tigeclina (Marchand *et al.* 2004). Estudios transcriptómicos han mostrado que AdeR/AdeS también controla la expresión de casi seiscientos genes, algunos de ellos posibles factores de virulencia implicados en la formación de biofilm u otras bombas de eflujo (Richmond *et al.* 2016). A pesar de desconocerse la señal ambiental del sistema, se evidencia que este podría responder a cambios en la concentración de sales en el medio, modulando en cierta manera la susceptibilidad del patógeno a los antibióticos, mediante AdeABC, así como a otros factores de virulencia como el *surface-associated motility* o la formación de biofilm (De Silva y Kumar 2018).

El sistema BaeS/BaeR es un regulador que media con otros sistemas de dos componentes, como AdeR/AdeS, para el control de la expresión de la bomba AdeABC. También regula la expresión de las bombas de eflujo AdeIJK y MacAB-ToIC, y la tolerancia de *A. baumannii* al ácido tánico (Lin *et al.* 2015; De Silva y Kumar 2019). En lo referente al estímulo ambiental, se cree que BaeS/BaeR puede estar involucrado en la regulación frente al estrés osmótico, como se observó en respuesta a altas concentraciones de sacarosa (Lin *et al.* 2014).

Otro mecanismo regulador de interés es el sistema PmrA/PmrB, debido a su implicación en la resistencia a colistina (Adams *et al.* 2009). Además del receptor de membrana PmrA y la histidina quinasa PmrB, el sistema consta de un tercer componente, PmrC, que se encargaría de la modificación del lípido A, diana de la colistina, disminuyendo la susceptibilidad a esta y eludiendo la respuesta inmune (Skariyachan *et al.* 2019; De Silva y Kumar 2019).

El sistema GacS/GacA en *A. baumannii* es considerado un regulador global de virulencia, cuya implicación en la patogénesis abarca diferentes procesos, como el metabolismo del citrato y de compuestos aromáticos, la síntesis del pili de tipo I, la motilidad tipo *twitching*, la formación de biofilm y la resistencia sérica (Cerqueira *et al.* 2014; De Silva y Kumar 2019). Otro sistema regulador es BfmR/BfmS, responsable del control del biofilm, vía pili de tipo I, y de la producción de exopolisacáridos, a través de la expresión de genes en el locus K, repercutiendo así en la resistencia del patógeno a antimicrobianos y ambientes adversos (Geisinger y Isberg 2015; Geisinger *et al.* 2018).

Respecto al sistema quimiotáctico, en *A. baumannii* se ha identificado un homólogo híbrido de los componentes CheA y CheY, cuyo papel en la virulencia sería el



## INTRODUCCIÓN

de regular el desplazamiento por *surface-associated motility* y la formación de biofilm vía pili de tipo I y QS a través de AbaI (Chen *et al.* 2017a).

Otro regulador implicado en el control de factores de virulencia es el factor transcripcional H-NS, que media en la inhibición de la expresión de genes asociados al *surface-associated motility*, la resistencia a colistina y la adhesión, además de la sobreexpresión de genes asociados a QS, OmpA, T5SS y T6SS (Morris *et al.* 2019). Por otro lado, el regulador post-transcripcional Hfq, una chaperona de RNA, modula la traducción de diversos mRNAs, incluidos aquellos implicados en la producción de OMVs, fimbrias, formación de biofilm, adhesión y estrés ambiental (Kuo *et al.* 2017).

Por último, *A. baumannii* consta de otros dos sistemas de regulación con ciertas peculiaridades, debido a las características que los definen. El primero es un homólogo al sistema de dos componentes EnvZ/OmpR cuya función principal, junto al control osmótico, es el cambio en la opacidad de las colonias de *A. baumannii*. Este fenómeno fue identificado en la cepa AB5075, en la cual se ha observado que, las colonias en fase translúcida son menos virulentas y tienen un patrón de motilidad disminuido, en comparación con la misma cepa cuando se encuentra en fase opaca (Tipton y Rather 2017). El otro mecanismo descrito en esta bacteria es el llevado a cabo por la proteína BlsA, un regulador global que detecta la luz azul como estímulo, modulando una gran cantidad de procesos fisiológicos, muchos de ellos implicados en virulencia, como los sistemas de captación del hierro, la motilidad, la formación de biofilm y el metabolismo de varios compuestos. Sin embargo, algunos componentes intermedios del sistema BlsA siguen siendo desconocidos, al igual que su implicación en otros procesos como la competencia entre bacterias vía T6SS y la tolerancia a antimicrobianos u otros ambientes adversos (Pezza *et al.* 2019; Mussi *et al.* 2010).

### **1.2.2.4. La motilidad en *A. baumannii***

La motilidad en *A. baumannii* juega un papel clave durante la patogénesis bacteriana, observándose que mutantes hipermóviles tienen una virulencia exacerbada en contraposición con otros mutantes con patrones de motilidad y virulencia abolidos (Harding *et al.* 2018). Paradójicamente, a pesar de que el nombre del género *Acinetobacter* proviene del griego "akinetos" que se traduce como "inmóvil", muchas cepas de las especies de *A. baumannii* y *A. nosocomialis* son capaces de desplazarse por dos mecanismos de locomoción independientes: el movimiento tipo *twitching* y el *surface-associated motility*, estando presentes, en función de la cepa, ambos mecanismos, uno o ninguno. Por ejemplo, la cepa MAR002 es capaz de moverse mediante los dos patrones de motilidad, la cepa modelo ATCC 17978 solo es capaz de desplazarse mediante *surface-associated motility*, la cepa AYE solo por *twitching*, mientras que otras cepas como ATCC 19606 son inmóviles (Eijkelkamp *et al.* 2011b; Pérez-Varela *et al.* 2017).

La motilidad de tipo *twitching* es un sistema de desplazamiento bien caracterizado en muchos géneros bacterianos, dependiente de la integridad del pili de tipo IV y de sus fases cíclicas de extensión, adhesión y retracción. Sin embargo, a pesar de haberse caracterizado el vínculo entre los pili de tipo IV con el movimiento *twitching*, la adhesión a superficies y la formación de biofilm, mediante disrupción génica de *pilA*, *pilD* y *pilT* en *A. baumannii*, la relación directa entre *twitching* y virulencia sigue sin estar esclarecida (Dhabaan *et al.* 2016; Harding *et al.* 2013).

No obstante, estudios transcriptómicos han demostrado un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de pili de tipo IV durante el crecimiento en suero humano, denotando la importancia de este apéndice durante un cuadro clínico de bacteriemia (Jacobs *et al.* 2012a; Harding *et al.* 2018; Cerqueira *et al.* 2014). Por otro lado, se ha visto que la subunidad principal del filamento de pilina, PilA, muestra una enorme divergencia de secuencia entre distintas cepas de *A. baumannii*, muy por encima de lo esperado en una especie bacteriana, lo que podría justificar la variación en cuanto a la presencia de cepas capaces de desplazarse mediante *twitching*, además de otros fenotipos asociados (Piepenbrink *et al.* 2016; Harding *et al.* 2018; Eijkelkamp *et al.* 2011b).

La otra forma de motilidad característica de algunas cepas de *A. baumannii* es la denominada *surface-associated motility*, o motilidad asociada a superficie. Aunque inicialmente se consideró un movimiento dependiente de pili de tipo IV, posteriormente se rechazó esta teoría, corroborando la independencia de este desplazamiento con el apéndice en cuestión (Clemmer *et al.* 2011; Harding *et al.* 2013). Del mismo modo, por similitudes macroscópicas, el *surface-associated motility* también ha sido descrito erróneamente como desplazamiento *swarming* en *A. baumannii*, a pesar de que este microorganismo carece de flagelos (Harding *et al.* 2018).

Actualmente, a pesar de ser un movimiento vagamente caracterizado, se sabe que la síntesis de 1,3-diaminopropano (DAP), la producción de LOS, la porina OmpA y cinco de las seis superfamilias de bombas de eflujo participan en cierto grado este tipo de motilidad (Skiebe *et al.* 2012; McQueary *et al.* 2012; Pérez-Varela *et al.* 2019). Por otro lado, la regulación del *surface-associated motility* en *A. baumannii* comprende una amplia gama de mecanismos, muchos de ellos sorprendentemente peculiares como son: el fenómeno de opacidad variable, el c-di-GMP, el sistema QS, el sistema AdeR/AdeS, la detección de luz azul mediada por BlsA y el componente del sistema quimiotáctico CheA-like (Clemmer *et al.* 2011; Mussi *et al.* 2010; Chen *et al.* 2017a; Tipton y Rather 2017; Ahmad *et al.* 2020). Por último, el *surface-associated motility* ha podido ser vinculado a un efecto directo en la virulencia, de ahí la importancia de comprender este desplazamiento característico del patógeno nosocomial *A. baumannii* (Eijkelkamp *et al.* 2013; Pérez-Varela *et al.* 2017; Skiebe *et al.* 2012).

### 1.3. Fitopatogénesis bacteriana

Las bacterias fitopatógenas son un conjunto de microorganismos capaces de colonizar a plantas y producirles una patología asociada. Esta infección desencadena un conjunto de efectos perniciosos específicos que, en función de cada patógeno, incluye desde una reducción del bienestar de la planta, hasta su muerte (Pfeilmeier *et al.* 2016).

La infección bacteriana en plantas y patogénesis consecuente requiere de un proceso complejo altamente orquestado, a lo largo del tiempo requerido para completar el ciclo biológico de la bacteria fitopatógena dentro de su hospedador. El proceso infectivo en la mayoría de estas bacterias suele iniciarse en el ambiente exterior donde la bacteria ha de migrar hasta las raíces de la planta hospedadora. En este punto, la bacteria fitopatógena se adhiere a ella, pudiendo formar un biofilm o bien penetrar hasta el apoplasto, aprovechando aberturas naturales o producidas. Dentro del apoplasto, la bacteria puede migrar y colonizar otros espacios intra o intercelulares, como el xilema y demás tejidos; estableciendo una sintomatología que dependerá de la maquinaria patogénica disponible (Melotto y Kunkel 2013; Boucher *et al.* 2001; Khokhani *et al.* 2017; Fatima y Senthil-Kumar 2015).

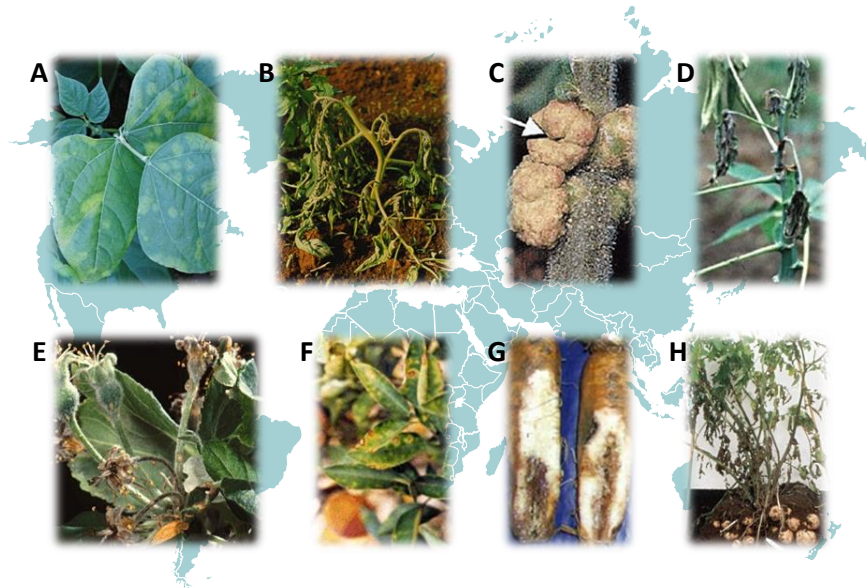
El reconocimiento de las condiciones fisicoquímicas externas es indispensable para poder establecer la infección a largo plazo. Esta detección fuera y dentro del hospedador, mediante el uso vías de transducción de señales u otros sensores, permite desencadenar respuestas apropiadas tanto en una célula bacteriana individual como a nivel poblacional, permitiendo modular los factores de virulencia en el momento indicado (Pfeilmeier *et al.* 2016; Boucher *et al.* 2001; Loh *et al.* 2002; Melotto y Kunkel 2013).

Las bacterias fitopatógenas no producen *per se* un efecto adverso sobre la salud humana. Sin embargo, algunos grupos de fitopatógenos son capaces de infectar especies vegetales de interés para la industria agroalimentaria, provocando importantes pérdidas en cultivos y, consecuentemente, un aumento del coste de producción. El impacto sufrido es tan grande que la disminución de la productividad puede llegar a provocar consecuencias alarmantes en el suministro alimentario ya que, para gran parte de la población mundial, los alimentos obtenidos de la agricultura son prácticamente el único sustento (Strange y Scott 2005; Sundin *et al.* 2016).

#### 1.3.1. Principales fitopatógenos de impacto agroalimentario

Actualmente, la lista de bacterias fitopatógenas de mayor interés incluye a las siguientes especies o géneros: *P. syringae*, *R. solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas* spp., *Erwinia amylovora*, *X. fastidiosa*, *Dickeya* spp. y *Pectobacterium carotovorum*; siendo responsables de la mayor parte de la pérdidas en productividad y merma económica (Mansfield *et al.* 2012). A continuación, se detallan

brevemente las características y repercusiones de cada una de estas bacterias fitopatógenas (Fig. 1.15).



**Figura 1.15** Principales fitopatógenos bacterianos y efectos adversos: (A) lesiones foliares de *Phaseolus vulgaris* (alubia) producidos por *P. syringae* pv. *phaseolicola*, (B) marchitez bacteriana en cultivos de tomate causada por *R. solanacearum*, (C) tumoraciones del tallo de tomaters infectadas por *A. tumefaciens*, (D) marchitez foliar en *Manihot esculenta* (yuca) producida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, (E) racimo de flor de manzana infectado por *Erwinia amylovora*, (F) clorosis en hojas de naranjo producido por *X. fastidiosa*, (G) síntomas de podredumbre en patatas provocada por *Dickeya* sp. y (H) podredumbre blanda en patatera causada por *P. atrosepticum*. Imágenes modificadas de Arnold *et al.*, (2011), Mansfield *et al.*, (2012) y Reverchon y Nasser (2013).

*P. syringae* es uno de los patógenos de plantas mejor estudiados, utilizado como modelo de investigación para entender las interacciones bacteria-planta, los mecanismos de virulencia y la adaptación del hospedador frente a fitopatógenos. *P. syringae* presenta dos mecanismos principales de virulencia: el primero es la supresión de la inmunidad del huésped y el segundo es la creación de un apoplasto acuoso para formar su nicho en las hojas de la planta infectada, además de poseer toda una maquinaria de factores de virulencia como los efectores Hrp (*Hypersensitive Reaction and Pathogenicity*), el T3SS (*Type 3 Secretion System*) y la producción de proteínas INA (*Ice Nucleation-Active*) (Xin *et al.* 2018; Jovanovic *et al.* 2011; Maki *et al.* 1974; Arnold *et al.* 2011). En los últimos años, los cultivos de tomate, alubia, olivo, avena y la industria del kiwi han sido los más afectados, con pérdidas económicas millonarias (Vanneste 2017; Mansfield *et al.* 2012).

*R. solanacearum* es una de las bacterias fitopatógenas más destructivas del mundo, causante de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana que causa la muerte de la planta infectada en pocos días. La especie abarca un rango de hospedadores de más de 200 especies de plantas que, junto con su distribución

## INTRODUCCIÓN

geográfica mundial, produce pérdidas económicas y de productividad en cultivos de patata, tomate, tabaco, jengibre, eucalipto, cacahuete y plátano en todo el mundo. (Allen *et al.* 2005; Mansfield *et al.* 2012; Elphinstone 2005). Dado que *R. solanacearum* es la otra bacteria de estudio en esta Tesis, más adelante se profundizará en las características de este patógeno vegetal.

*A. tumefaciens* es otro fitopatógeno particular que produce unos crecimientos neoplásicos llamados agallas, que disminuyen la productividad de los cultivos infectados, principalmente nueces, vides y frutas con hueso. Una de las características principales es su capacidad única para transferir material genético (T-DNA) de la bacteria a la planta infectada, el cual se integra en el genoma de la planta produciendo cambios fisiológicos en esta (Chilton *et al.* 1977). Esta propiedad ha sido muy estudiada no solo por ser un fenómeno de interacción patógeno-hospedador único, sino por sus aplicaciones biotecnológicas (Mansfield *et al.* 2012; Bourras *et al.* 2015).

El género *Xanthomonas* incluye las especies de importancia agroalimentaria *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* y *Xanthomonas campestris*, las cuales afectan, severa y respectivamente, a la producción de arroz y yuca, entre otros cultivos. Este grupo de fitopatógenos produce daños severos en sus hospedadores mediante los efectores secretados y la gran producción de exopolisacáridos (Mansfield *et al.* 2012; Strange y Scott 2005).

*E. amylovora* es la especie causante de la enfermedad conocida como fuego bacteriano, que afecta a cultivos de manzanos, perales, membrillos, nísperos y otras plantas ornamentales (Cothier 2001). Como curiosidad, fue la primera especie bacteriana descrita como agente causal de enfermedades en organismos vegetales, además de presentar uno de los genomas más pequeños dentro del grupo de bacterias fitopatógenas (Mansfield *et al.* 2012).

El fitopatógeno *X. fastidiosa* es el agente causal de la clorosis en cítricos y la enfermedad de Pierce en viñedos, además de afectar a cultivos de café, melocotoneros y perales. También fue la primera bacteria fitopatógena en tener su genoma secuenciado (Simpson *et al.* 2000; Mansfield *et al.* 2012).

Todas las especies del género *Dickeya* son capaces de infectar a una amplia diversidad de angiospermas, siendo *Dickeya dadantii* la que cuenta con mayor notoriedad debido a los efectos que produce en cultivos de patata a nivel europeo, causando la enfermedad conocida como podredumbre blanda que produce la marchitez del tubérculo (Ma *et al.* 2007; Mansfield *et al.* 2012).

Por último, otra bacteria fitopatógena de interés económico es la especie *P. carotovorum*, también causante de la podredumbre blanda en cultivos de patata a través de la secreción de varias enzimas hidrolíticas (Ma *et al.* 2007; Mansfield *et al.* 2012).

### 1.3.2. *Ralstonia solanacearum*

La bacteria fitopatógena *R. solanacearum* es la segunda especie bacteriana en la cual se han realizado los estudios pertinentes mostrados en esta Tesis Doctoral. A continuación, se detalla de forma exhaustiva las características principales de esta bacteria, incluyendo los mecanismos reguladores implicados en el desarrollo de su ciclo de vida, así como los descubrimientos relacionados con su sistema de motilidad.

#### 1.3.2.1. El complejo de especies de *R. solanacearum*

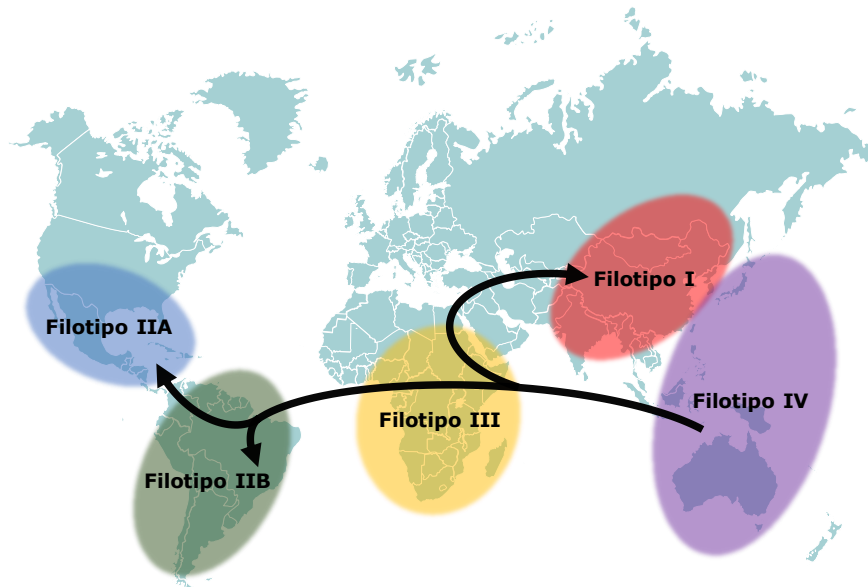
*R. solanacearum* es una bacteria Gram-negativa, con morfología bacilar cuya clasificación taxonómica ha variado a lo largo del tiempo. Tras su descubrimiento en 1896, la especie fue bautizada como *Bacillus solanacearum*, en 1914 se renombró a *Pseudomonas solanacearum* y años más tarde (1992) a *Burkholderia solanacearum*; no siendo hasta 1995 cuando recibió el nombre con el que se la conoce a día de hoy (Yabuuchi *et al.* 1995). En la actualidad, la especie *R. solanacearum* se encuentra clasificada filogenéticamente dentro del dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase  $\beta$ -*Proteobacteria*, orden *Burkholderiales* y familia *Burkholderiaceae*; junto a otras especies descritas como *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia syzygii*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia celebensis* y *Ralstonia pseudosolanacearum* (Safni *et al.* 2014; Genin 2010). Asimismo, la especie también se subdividió: primero en función del rango de hospedadores de cada cepa (Buddenhagen *et al.* 1962); posteriormente en cinco biovariedades, dependiendo de su rango de metabolización de azúcares (Hayward 1964); y finalmente, tras el inicio de la era genómica, en cuatro filotipos, concordando esta última con la distribución geográfica del conjunto de cepas que forman cada filotipo (Fegan y Prior 2005; Safni *et al.* 2014). El filotipo I está formado por el conjunto de cepas originarias de Asia, el filotipo II (actualmente subdividido en IIA y IIB) de cepas de origen americano, el filotipo III de África y el filotipo IV de Indonesia, Australia y Japón (Peeters *et al.* 2013; Safni *et al.* 2014; Wicker *et al.* 2012).

El complejo de una especie se define como un grupo de aislados estrechamente relacionados cuyos miembros individuales pueden representar a más de una especie. De acuerdo con este punto de vista, las cepas de especies relacionadas *R. syzygii* y *R. celebensis* pertenecen al complejo de la especie *R. solanacearum* dentro del filotipo IV (Genin 2010). Así pues, y como se muestra en la Figura 1.16, la clasificación de filotipos conforma el complejo de especies de *R. solanacearum* que, junto con estudios de reconstrucción genealógica, ha permitido predecir el origen de este fitopatógeno y su consecuente distribución global.

Se hipotetiza que la especie *R. solanacearum* se originó antes de la fragmentación de Gondwana (hace aproximadamente 200 millones de años) en las regiones actuales de Australia/Indonesia (filotipo IV), la cual se diseminó primero por África Oriental y,

## INTRODUCCIÓN

posteriormente, por la región asiática (filotipos III y I, respectivamente). Al mismo tiempo, *R. solanacearum* se diseminó también por la actual región de Brasil, esparciéndose posteriormente por todo el continente americano (filotipos IIA y IIB) (Wicker *et al.* 2012; Castillo y Greenberg 2007).



**Figura 1.16** Distribución geográfica de los filotipos que conforman el complejo de especies de *R. solanacearum* y su diseminación mundial. Modificado de Wicker *et al.*, (2012).

En su conjunto, el complejo de especies de *R. solanacearum* abarca prácticamente la totalidad del globo, predominando en zonas tropicales y subtropicales, y emergiendo en climas más templados como América del Norte y Europa. Dada la amplia distribución que presenta *R. solanacearum*, no es de extrañar que presente un rango de hospedadores tan amplio, estimado en más de 250 especies de plantas clasificadas en un total de 54 familias de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, muchas de importancia para la industria agroalimentaria (Elphinstone 2005; Hayward 1991).

Las pérdidas económicas directas causadas por *R. solanacearum* son difíciles de determinar, ya que varían enormemente en función de la cepa, el cultivo afectado y la región del mundo donde se producen. Por ejemplo, se ha estimado que en los cultivos de tomate existe un rango de pérdidas de rendimiento en la producción del 0 al 91%, en cultivos de patata del 33 al 90%, en tabaco del 10 al 30% y del 80 al 100% en plátano. Además, su control y eliminación es difícil de establecer ya que este fitopatógeno sobrevive largo tiempo en el suelo, agua y también puede establecerse asintómicamente en algunas especies botánicas que utiliza como reservorio, como *Solanum dulcamara* (Elphinstone 2005; Yuliar *et al.* 2015; Granada y Sequeira 1983). Aparte de los hospedadores clásicos, se han descubierto nuevas cepas de *R. solanacearum* con capacidad de infectar nuevos hospedadores, por ejemplo, las cucurbitáceas (melón, sandía y calabaza) (Wicker *et al.* 2007).

El rango de hospedadores varía en función de la cepa, por ejemplo, *R. solanacearum* GMI1000, la cepa más estudiada, posee un rango de hospedador muy amplio, a diferencia de otras cepas cuyo rango es mucho más restringido. Se ha demostrado que algunas proteínas efectoras secretadas determinan el rango de hospedador. Por ejemplo, la proteína efectora PopP2 es determinante para que cepas de *R. solanacearum* puedan infectar a *Arabidopsis thaliana* (Bernoux *et al.* 2008), la proteína efectora GALA7 permite a la cepa GMI1000 reconocer e infectar a la planta leguminosa *Medicago truncatula* (Angot *et al.* 2006), mientras que Rsa1 es determinante para la infección específica de plantas de pimienta (Jeong *et al.* 2011).

La extensa distribución geográfica y el amplio rango de hospedadores evidencia la alta plasticidad genética de *R. solanacearum*, permitiendo al complejo de especies que lo consituyen adaptarse rápidamente a cambios ambientales, nuevos hospedadores y de contrarrestar la resistencia de estos. Esta plasticidad y gran biodiversidad ha sido justificada debido a la competencia natural de *R. solanacearum* para incorporar muy eficientemente, mediante transformación, largas secuencias de DNA exógeno (30-90 kb) y a la capacidad de recombinar este DNA, permitiendo así la transferencia horizontal de genes de virulencia entre distintas cepas (Genin y Denny 2012; Peeters *et al.* 2013; Wicker *et al.* 2012).

### **1.3.2.2. Ciclo de vida y marchitez bacteriana**

El ciclo de vida de *R. solanacearum* puede dividirse en dos etapas, en función de si se encuentra dentro o fuera de una planta hospedadora (Fig. 1.16). Al final de la etapa infectiva, la planta almacena grandes cantidades de bacteria en sus tejidos (entre  $10^8$  y  $10^{10}$  CFU/g de tejido) y, por lo general, muere a causa de los efectos producidos. En este momento, la bacteria ha de sobrevivir hasta poder infectar a un nuevo hospedador, iniciando la etapa de vida libre o saprófita (Hayward 1991; Caldwell *et al.* 2017; Denny 2007). Esta fase se inicia con la salida de la bacteria de la planta colonizada, a través de las raíces o exudados emergentes de la superficie del tallo, contaminando el suelo, agua circundante o incluso adhiriéndose a insectos que actuarán como vectores (Swanson *et al.* 2005; Hayward 1991; Coutinho y Wingfield 2017).

En agua, principal mecanismo de expansión de *R. solanacearum* a través del riego de cultivos, la bacteria puede sobrevivir desde varias semanas hasta años, dependiendo de las condiciones medioambientales. Por ejemplo, en agua pura entre 20 y 25°C puede sobrevivir más de cuarenta años, mientras que a temperaturas inferiores a 4°C, junto a un pH extremo y la presencia de sales u otras bacterias competidoras, su viabilidad se reduce drásticamente (Caruso *et al.* 2005; Álvarez *et al.* 2007; Elsas *et al.* 2001). Por otro lado, la supervivencia de *R. solanacearum* en suelos es más difícil de determinar. No obstante, se sabe que el mantenimiento de la bacteria en suelos va ligado principalmente a la humedad de este, considerando niveles superiores al 20%



## INTRODUCCIÓN

suficientes para su permanencia durante dos años, mientras que climas más secos reducen drásticamente su supervivencia en suelos (Hayward 1991). Otros factores como la temperatura, el tipo de suelo, los nutrientes y la microbiota presente también afectan a su supervivencia (Denny 2007). Para periodos de tiempo superiores a los dos años, *R. solanacearum* puede sobrevivir en suelos ricos en nutrientes, normalmente cerca de raíces, o infectando de forma asintomática raíces de plantas que no son hospedadores predilectos, estableciéndose de forma latente para que así, cuando vuelva a haber presencia de las plantas hospedadoras predilectas, la bacteria vuelva al suelo (Swanson *et al.* 2005; Elphinstone 2005; Denny 2007).

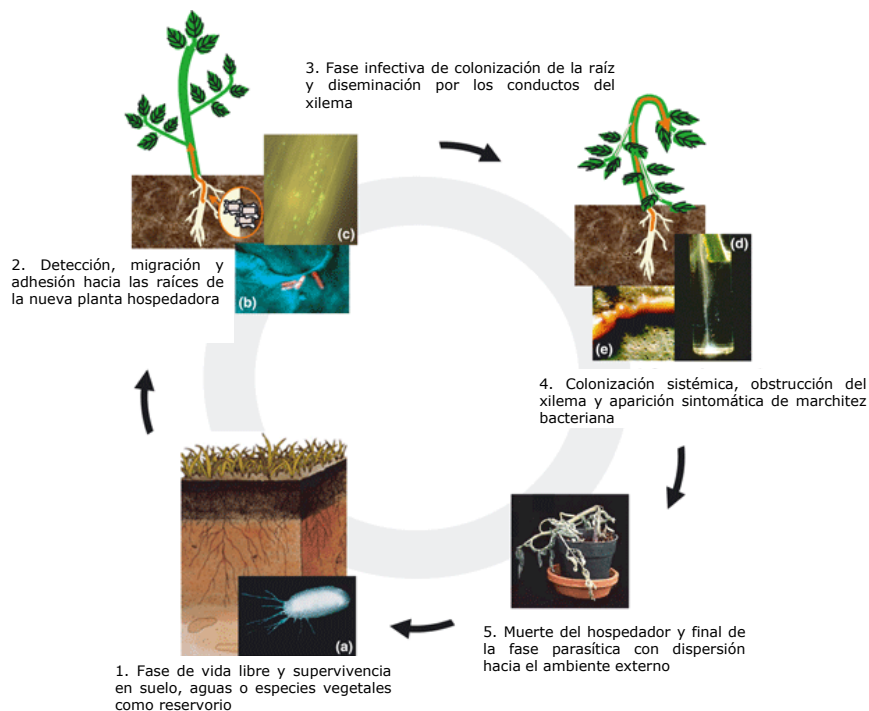
Además, *R. solanacearum* es capaz de entrar en un estado llamado VNC (viable no cultivable). Este estado fisiológico, descrito en otras bacterias, se caracteriza por la presencia de células bacterianas metabólicamente activas pero que no se dividen, hecho que impide su cultivo en el laboratorio. Las células VNC pueden generarse en respuesta a condiciones ambientales de estrés, como temperaturas bajas, que a su vez dificultan la detección de *R. solanacearum* por métodos clásicos, sin embargo, este estado VNC puede revertir de nuevo y permitir la infección de nuevas plantas hospedadoras (Álvarez *et al.* 2008; Grey y Steck 2001; Caruso *et al.* 2005).

Tras sobrevivir y dispersarse durante la fase saprófita, *R. solanacearum* ha de colonizar y establecerse en una planta hospedadora, iniciando el proceso de infección. En primer lugar, este fitopatógeno ha de detectar, migrar y adherirse a las raíces de una planta hospedadora; mediante quimiotaxis, desplazamiento mediado por flagelos hacia exudados de esta y posterior adherencia por pili de tipo IV (Yao y Allen 2006; Allen *et al.* 2005; Kang *et al.* 2002). Una vez adherida, la bacteria entra en la planta a través de heridas, o aberturas naturales, como los sitios de surgimiento o elongaciones secundarias de la raíz. Las heridas o aberturas no naturales de las raíces pueden ser provocadas por muchos nematodos ambientales o, en la mayoría de casos, por prácticas agrícolas comunes (Caldwell *et al.* 2017; Denny 2007). Por otro lado, el propio desarrollo de la planta produce la aparición de aberturas que permiten a insectos vectores inocular la bacteria procedente de otras plantas infectadas (Buddenhagen y Kelman 1964).

Tras su adherencia y entrada, *R. solanacearum* coloniza los espacios intercelulares de la raíz (apoplasto), propagándose hasta el xilema, donde se multiplica y extiende hacia otras regiones del tallo de forma sistémica. Durante este periodo, una semana aproximadamente, el objetivo de este fitopatógeno es maximizar su población (alcanzando concentraciones superiores a  $10^{10}$  CFUs/g de tejido) antes de producir la marchitez y muerte de la planta hospedadora, efecto secundario debido a la explotación del nicho ecológico a expensas del hospedador (Hikichi *et al.* 2017; Peeters *et al.* 2013; Genin 2010). Cuando *R. solanacearum* invade los vasos del xilema, no encuentra prácticamente barreras físicas que eviten su colonización sistémica, permitiendo su migración axial, a lo largo de toda la longitud de la planta. Para la expansión a nivel radial, las bacterias suelen agregarse a las paredes del conducto, ocupando el sitio de

células muertas de la planta, fomentando la rotura de los conductos para colonizar los vasos adyacentes del parénquima (Digonnet *et al.* 2012; Jacobs *et al.* 2012b).

Durante esta diseminación por los tejidos de la planta hospedadora se inician los procesos que concluirán con la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana. El momento de aparición de estos síntomas depende de la planta hospedadora; por ejemplo, en variedades de tomate susceptibles, los primeros síntomas de marchitez se visualizan cuando la concentración bacteriana alcanza valores de  $4 \times 10^7$  CFUs/g de tejido (McGarvey *et al.* 1999). Paralelamente, se produce una gran secreción de exopolisacáridos, a unas concentraciones de 100  $\mu\text{g/g}$  de tejido que, junto al crecimiento bacteriano, provoca la reducción del flujo de savia por el xilema hasta su obstrucción total y, por lo tanto, la disfunción vascular que impide que el agua llegue a las hojas. Este bloqueo provoca el marchitamiento de los tejidos elevados de la planta infectada y, a corto plazo, su muerte (Peeters *et al.* 2013; Hikichi *et al.* 2017; Buddenhagen y Kelman 1964; Genin 2010). De este modo y, tras la muerte de su hospedador, *R. solanacearum* repetirá su ciclo, iniciando nuevamente la fase de vida libre que le conducirá hasta unas nuevas plantas hospedadoras que infectar (Fig. 1.17) (Caldwell *et al.* 2017; Denny 2007).



**Figura 1.17** Ciclo de vida de *R. solanacearum*. Modificado de Genin *et al.*, (2010).

Los síntomas causados por *R. solanacearum* durante la marchitez bacteriana varían en función de la especie vegetal infectada. Por ejemplo, en plantas de tomate y tabaco la marchitez produce una putrefacción del tallo (Denny 2007; Peeters *et al.* 2013; Elphinstone 2005). En patateras, la marchitez suele llamarse también podredumbre parda y se caracteriza por la decoloración externa del tallo y de los tubérculos, mientras

## INTRODUCCIÓN

que las hojas suelen permanecer asintomáticas o devenir amarillas hasta secarse (Swanson *et al.* 2005; Denny 2007; Peeters *et al.* 2013). En países de América Latina y del Caribe, la marchitez bacteriana en plátanos se la conoce como enfermedad de Moko y se caracteriza por la rápida maduración y ennegrecimiento de la fruta; mientras que, en Filipinas, la enfermedad se conoce como Bugtok y los síntomas se limitan a la zona de la inflorescencia, sin dañar al fruto. Por otro lado, en Indonesia, la patología provocada en plataneros se la conoce como enfermedad de la sangre y los síntomas se parecen a la enfermedad de Moko, mostrando una podredumbre rojiza y seca en la fruta (Denny 2007; Safni *et al.* 2018). El marchitamiento bacteriano en plantas de jengibre afecta principalmente a la región de Indonesia y Asia, caracterizado por la aparición de un exudado lechoso blanquecino y una decoloración grisácea hasta la muerte de la planta (Elphinstone 2005; Denny 2007). Por último, en las islas de Sumatra y Java, el fitopatógeno causa la enfermedad del clavo de Sumatra (*Syzygium aromaticum*), cuyo marchitamiento se produce principalmente en plantas adultas, acompañado de un exudado blanco o marrón pálido (Purcell y Hopkins 1996).

### 1.3.2.3. Determinantes de patogenicidad y regulación

Todo el ciclo de vida *R. solanacearum* se coordina con precisión mediante una compleja vía de transducción de señales reguladoras (Hikichi *et al.* 2017; Schell 2000). Estos sistemas regulan una gran gama de componentes con los que la bacteria puede reconocer a sus hospedadores, infectarlos y modificar su fisiología para favorecer la accesibilidad a nutrientes y maximizar el crecimiento poblacional.

#### i) Factores de virulencia

A continuación, se describen los principales factores de virulencia dentro del complejo de especies de *R. solanacearum*, resumidos en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3** Principales factores de virulencia en *R. solanacearum*. Modificado de Genin (2010).

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Efectores</b>	<b>Implicación en patogénesis</b>	
<b>Exopolisacárido</b>	EPS I	Obstrucción del xilema y protección antigénica	
<b>Sistemas de secreción</b>	<b>T2SS</b>	Enzimas pectinolíticas y celulolíticas	Degradación de pared celular vegetal
	<b>T3SS</b>	Efectores T3E	Reconocimiento y supresión de defensas del hospedador
	<b>T5SS</b>	Efectores Tat	Desconocida
	<b>T6SS</b>	Hcp	Motilidad y formación de biofilm
<b>Enzimas de protección</b>	Catalasas y peroxidasas	Resistencia a compuestos tóxicos, tolerancia al estrés celular	
<b>Bombas de eflujo</b>	AcrA y DinF	Resistencia a antimicrobianos	
<b>Fitohormonas</b>	Etileno, auxinas y citoquininas	Desconocida	
<b>Otros metabolitos</b>	Spec y MetE	Versatilidad metabólica y viabilidad en planta	
<b>Apéndices</b>	Flagelo, pili de tipo IV y Flp	Motilidad, adhesión y formación de biofilm	
<b>Lectinas</b>	RS-IIL	Adhesión a superficie	

### **Exopolisacárido**

El exopolisacárido, concretamente el polisacárido extracelular I (EPS I), es el factor de virulencia más importante en la patogénesis de *R. solanacearum*. Se trata de un polímero limoso, heterogéneo y de alto peso molecular formado equimolarmente por varios azúcares. Este polímero es producido en grandes cantidades, tanto en el interior de la planta infectada como en cultivos de laboratorio, pudiendo formar parte de una cápsula polisacárida o bien ser secretado al medio (Denny 1991; Orgambide *et al.* 1991; McGarvey *et al.* 1998).

La acumulación de EPS I en los conductos del xilema produce la disfunción vascular causante de los síntomas de la marchitez bacteriana. Además, este polisacárido protege al fitopatógeno de respuestas antimicrobianas por parte de la planta (Genin y Denny 2012; Denny 1991). Se ha visto que mutantes deficientes en su producción no colonizan los vasos del xilema de forma eficiente y apenas producen síntomas. Por otro lado, algunas especies de plantas producen etileno y ácido salicílico en respuesta al EPS, impidiendo la aparición de la enfermedad (Milling *et al.* 2011; Saile *et al.* 1997; Meng 2013; Schell 2000).

### **Sistemas de secreción**

Otro factor de virulencia determinante para la patogénesis de *R. solanacearum* es su gran repertorio de sistemas para secretar proteínas efectoras al medio extracelular o al citoplasma de células vegetales, muy común en otras bacterias patógenas (Poueymiro y Genin 2009; Gerlach y Hensel 2007). La lista de efectores secretados por el complejo de especies de *R. solanacearum* es extensa, denotando la correlación de esta gran diversidad de efectores para delimitar su versatilidad de hospedadores y distribución geográfica. Además, los análisis de secuencias de *R. solanacearum* GMI1000, principal cepa de estudio, han demostrado la presencia de seis vías de secreción distintas, a través de las cuales se exportan innumerables compuestos polipeptídicos efectoras (Alfano y Collmer 1997; Kang Yaowei *et al.* 1994). Sin embargo, muchos sistemas y efectores siguen sin estar caracterizados y/o se desconoce su papel en la virulencia de esta bacteria (Genin y Boucher 2004; Deslandes y Genin 2014).

El T1SS, es un mecanismo de estructura similar a los transportadores de membrana ABC y que forma un poro a través del cual se secretan al medio pequeños compuestos tanto proteicos como no proteicos. Por otro lado, el T4SS se caracteriza por ser capaz no solo de translocar efectores peptídicos sino también complejos proteína-DNA (Gerlach y Hensel 2007). A pesar de que los estudios genómicos en *R. solanacearum* GMI1000 han permitido identificar varias regiones posiblemente relacionadas con ambos sistemas, como el *cluster RSc2574-RSc2622* para el T4SS, aún no se ha esclarecido la implicación de estos sistemas en la virulencia de este fitopatógeno (Genin y Boucher 2004; Poueymiro y Genin 2009).

## INTRODUCCIÓN

En el caso del T2SS, se sabe que la inactivación de este sistema afecta notablemente a la virulencia de *R. solanacearum*. Este sistema permite la secreción de una gran variedad de proteínas al medio externo, entre las cuales se han identificado varias enzimas que degradan la pared de las células vegetales, acelerándose el marchitamiento de la planta (Schell 2000; Kang Yaowei *et al.* 1994). Las enzimas pectinolíticas Pme y PehB forman parte de un conjunto de proteínas capaces de hidrolizar parcialmente la pectina, componente de la pared vegetal (Genin y Denny 2012; Schell 2000). Otro grupo de enzimas son las proteínas celulolíticas Egl y CbhA, capaces de degradar la celulosa de la pared vegetal, cuya inactivación retrasa la dispersión del fitopatógeno (Roberts *et al.* 1988). Sin embargo, no todas las proteínas efectoras de este sistema han sido identificadas, ya que la inactivación de la maquinaria secretora del T2SS abole la virulencia del fitopatógeno de forma más notable que la inactivación de todas las enzimas descritas (Liu *et al.* 2005; Poueymiro y Genin 2009).

El T3SS está formado por un complejo conjunto proteico muy relacionado estructural y evolutivamente con el flagelo bacteriano. Además de encontrarse muy extendido en el dominio *Bacteria*, permite la secreción e inyección directa de compuestos efectores al citoplasma de la célula diana (Gerlach y Hensel 2007). En *R. solanacearum*, los genes implicados en la síntesis del T3SS están codificados en el megaplásmido, concretamente en el *cluster hrp*, de más de 23 kb, que incluye cinco unidades transcripcionales. La implicación de este sistema en la virulencia de *R. solanacearum* ha sido ampliamente demostrada, mostrando que la inactivación de cualquiera de los genes *hrp* causa la pérdida casi completa de la capacidad de multiplicarse en hospedadores susceptibles, de provocar una respuesta hipersensible en plantas así como de producir la marchitez bacteriana (Genin y Denny 2012; Deslandes y Genin 2014; Peeters *et al.* 2013; Poueymiro y Genin 2009; Boucher *et al.* 1985).

La lista de compuestos secretados por el T3SS es muy extensa, abarcando probablemente a más de cien efectores conocidos como T3E (*Type 3 Effector*), muchos de los cuales también se encuentran en otras bacterias patógenas (Deslandes y Genin 2014). A pesar de no estar plenamente identificados, muchos de estos T3E o efectores hipotéticos se encuentran en cepas concretas de *R. solanacearum* u otras especies, lo cual permite establecer previamente si su función va ligada a un efecto citotóxico o más bien de reconocimiento del hospedador; ya sea por facilitar el crecimiento bacteriano dentro de la planta, favorecer la especificidad de la bacteria o, contrariamente, presentar un efecto avirulento hacia un hospedador cuando están presentes en la cepa (Coll y Valls 2013; Peeters *et al.* 2013; Poueymiro y Genin 2009; Genin 2010; Macho *et al.* 2010).

Dentro del T5SS se ha identificado el subtipo Tat (*Twin Arginine Translocation*), capaz de exportar unas setenta proteínas efectoras, las cuales están implicadas no solo en la virulencia, sino también en la división celular, el metabolismo del nitrato y la estabilidad de membrana (González *et al.* 2007; Poueymiro y Genin 2009).

Finalmente, el T6SS presenta una estructura similar al bacteriófago T4 de *E. coli* que, al igual que los T3SS y T4SS, permite la inyección de componentes efectores en el interior de células receptoras del hospedador (Shrivastava y Mande 2008). En *R. solanacearum*, la inactivación de TssB, proteína estructural del T6SS, abole notablemente la virulencia, la motilidad dependiente de flagelo y la formación de biofilm (Zhang *et al.* 2014).

### **Enzimas de protección y bombas de eflujo**

*R. solanacearum* también produce un conjunto de proteínas cuya función es neutralizar o minimizar el estrés fisicoquímico provocado por la planta hospedadora, la inactivación de las cuales afecta negativamente a la virulencia del fitopatógeno (Genin y Denny 2012). Para neutralizar el ambiente oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), *R. solanacearum* produce las peroxidasas Bcp, Dps y toda una batería de genes que hacen frente al estrés oxidativo bajo el control del regulador OxyR (Flores-Cruz y Allen 2009, 2011; Hu *et al.* 2019). Por otro lado, las bombas de eflujo, AcrA y DinF, y varias enzimas con función oxidasa, parecen ampliar la tolerancia de *R. solanacearum* hacia múltiples compuestos tóxicos (Brown *et al.* 2007; Hernández-Romero *et al.* 2005).

### **Fitohormonas y otros metabolitos**

Muchas bacterias fitopatógenas sintetizan fitohormonas para modular la fisiología de su hospedador a su favor. En el caso de *R. solanacearum*, esta produce etileno, auxinas y citoquininas, siendo esta última la única con un efecto descrito en su virulencia (Valls *et al.* 2006; Genin y Denny 2012). La putrescina, una poliamina fuente de carbono y nitrógeno, se sintetiza a través de una descarboxilasa SpeC y su inactivación afecta severamente la patogenicidad de *R. solanacearum* (Lowe-Power *et al.* 2018). MetE, proteína implicada en la síntesis de metionina, también parece tener un efecto en la virulencia de *R. solanacearum* (Plener *et al.* 2012). Por otro lado, proteínas de captación de hierro como sideróforos, generalmente importantes factores de virulencia, no parecen tener un rol relevante durante la fase infectiva de esta bacteria (Bhatt y Denny 2004).

### **Apéndices y lectinas**

Como se ha detallado anteriormente, la motilidad es un factor clave en la patogénesis de muchas bacterias y, en el caso de *R. solanacearum*, la cual posee tanto flagelos y pili de tipo IV, ambos son factores de virulencia de cierta relevancia (Josenhans y Suerbaum 2002; Genin y Denny 2012). En el caso de los flagelos, su

## INTRODUCCIÓN

implicación va ligada al desplazamiento mediante *swimming* durante la fase de vida libre y, a través de la quimiotaxis asociada, a la aproximación hasta las raíces de las plantas hospedadoras (Tans-Kersten *et al.* 2001). En el caso de los pili de tipo IV, su presencia es determinante para el movimiento *twitching*, la formación de biofilm y la adherencia a raíces (Kang *et al.* 2002). Otros apéndices como los pili Flp o las lectina RS-IIL, también favorecen la adherencia, la agregación celular y consecuentemente la virulencia de *R. solanacearum* (Wairuri *et al.* 2012; Mori *et al.* 2016).

### ii) Regulación de la virulencia

Como se ha visto en el ciclo de vida de *R. solanacearum*, esta bacteria coloniza dos nichos ecológicos bien definidos: el ambiente externo, caracterizado por ser heterogéneo, competitivo y con escasez de nutrientes, y el interior de la planta hospedadora, abundante en nutrientes pero con barreras fisicoquímicas. Así pues, y dado el repertorio de factores de virulencia, *R. solanacearum* posee un conjunto de mecanismos reguladores, capaces de detectar señales ambientales, para modular positiva o negativamente cada uno de los determinantes descritos durante las diferentes etapas de su ciclo de vida (Schell 2000; Perrier *et al.* 2018).

El sistema Phc (*Phenotype conversión*) es el núcleo de toda la red de sistemas reguladores de *R. solanacearum*, compuesto por el regulador PhcA y el operón *phcBSR*, que controla la actividad de PhcA en función de la densidad de población (QS) (Genin y Denny 2012). Según la cepa, el (R)-metil 3-hidroxi palmitato (3-OH PAME), o (R)-metil 3-hidroxi miristato (3-OH MAME), pueden actuar como autoinductores del sistema. Sintetizados por PhcB, junto con PhcS y PhcR, que actúan como un sistema de dos componentes, elevan los niveles de PhcA en presencia de 3-OH PAME o 3-OH MAME (Ujita *et al.* 2019).

La activación de PhcA provoca cambios fenotípicos en *R. solanacearum*, afectando la producción de EPS I, la secreción de efectores por parte de T2SS y T3SS y la motilidad bacteriana (Clough *et al.* 1997b, 1997a; Flavier *et al.* 1997a). En lo referente a la producción de exopolisacárido, PhcA se une al promotor de un regulador intermedio, XpsR, que junto con VsrC, del sistema VsrB/VsrC, activa la transcripción del operón *eps* y la producción de EPS I. A su vez, la producción de EPS I también está regulada por el sistema de dos componentes VsrA/VsrD, que controla su producción a nivel de XpsR, y por EpsR, que lo reprime (Huang *et al.* 1998, 1995).

A parte de promover la producción de EPS I, VsrA/VsrD parecer favorecer la colonización de *R. solanacearum* dentro de la planta mediante la regulación positiva de enzimas celulolíticas como CbhA (junto con PhcA), la formación de biofilm, la tolerancia a temperaturas bajas, a peróxidos, y la producción de AHL (Schell 2000; Schell *et al.* 1994). Algunas enzimas pectinolíticas como Pme y PglA se encuentran reguladas de forma inversa por el sistema de dos componentes PehS/PehR y PhcA, mientras que otras

enzimas como PehB y PehC no parecen estar bajo control de este sistema regulador. En el caso de PglA, PhcA reprime al sistema PehSR y en consecuencia la expresión de PglA, a su vez, PhcA regula positivamente a Pme. Además, el sistema VsrB/VsrC también reprime la producción de PglA (Schell *et al.* 1988; Allen *et al.* 1997).

La motilidad *swimming* asociada a flagelo y el movimiento *twitching* asociado a pili de tipo IV también se encuentran regulados por PhcA y el sistema PehS/PehR. Mientras que el sistema PehS/PehR regula positivamente la síntesis de ambos apéndices, PhcA reprime este sistema (Allen *et al.* 1997). Además, el regulador MotN, las ralfuranonas y el sistema VsrA/VsrD también reprimen el sistema FlhDC, centro regulador del flagelo bacteriano (Meng *et al.* 2011; Mori *et al.* 2018).

Paralelamente al sistema Phc, *R. solanacearum* posee un segundo sistema de detección de QS, el sistema SolR/SolI (homólogo a LuxR/LuxI). SolI codifica AHL que se acumula hasta activar a SolR, que modula sus genes diana. Además, la expresión de SolR/SolI se encuentra regulada por PhcA y RpoS, proteína asociada a la supervivencia y al estrés ambiental, dando una regulación por nivel poblacional de dos etapas: la primera por PhcA ( $10^7$  CFUs/ml) y la segunda por SolRI ( $10^8$  CFUs/ml). Así pues, SolRI activa genes cuya función es requerida en etapas finales de la infección, cuando la enfermedad es prácticamente terminal (Flavier *et al.* 1997b, 1998; Genin y Denny 2012).

De forma independiente de PhcA, el sistema Prh regula los genes *hrp* del T3SS. Este sistema está formado por un conjunto de componentes que se activan en contacto con la planta y transmiten la señal, desde PrhA hasta HrpG (pasando por PrhR, PrhI y PrhJ, consecutivamente). HrpG es un regulador de respuesta que regula positivamente la expresión de HrpB, regulador directo del T3SS y de los efectores T3E. HrpG y PrhG parecen regular conjuntamente la expresión HrpB, aunque la inactivación de la primera no parece tener efectos sobre la patogénesis de *R. solanacearum* (Zhang *et al.* 2011; Yoshimochi *et al.* 2009).

HrpG también controla otros factores de virulencia implicados en la adaptación al ambiente interno del hospedador, como la expresión de enzimas degradadoras de la pared vegetal, fitohormonas, lectinas, enzimas metabólicas y otros genes de función desconocida (Valls *et al.* 2006; Genin y Denny 2012). Como ya se ha dicho, HrpB controla la expresión del T3SS y sus correspondientes efectores, estimándose en más de 180 genes. Sin embargo, estas estimaciones fueron analizadas *in vitro*, disminuyendo el número a la mitad en estudios realizados *in planta*. Además, HrpB también activa la expresión de genes independientes al T3SS, como el operón *hdf*, cuyo producto final podría estar implicado en la interferencia de detección de QS de bacterias competidoras (Macho *et al.* 2010; Genin *et al.* 1992).

En su conjunto, cuando *R. solanacearum* se encuentra en su etapa de vida libre, la densidad poblacional es baja, por lo que los niveles de PhcA también son bajos,



## INTRODUCCIÓN

favoreciendo la quimiotaxis, la motilidad, la secreción de algunas enzimas y la captación de nutrientes. Por el contrario, al contactar con la planta hospedadora se activan señales de transducción por el sistema Prh, que activa los reguladores HrpG y HrpB, iniciando la síntesis de componentes efectores del T3SS, enzimas degradadoras y otros factores de virulencia. Finalmente, al dispersarse por el xilema, la densidad poblacional aumenta, conjuntamente con los autoinductores 3-OH PAME, 3-OH MAME y AHL, que suben los niveles activos de PhcA y SolR, siendo responsables de la activación de más factores de virulencia como enzimas degradadoras vía T2SS, la producción masiva de EPS I y la formación de biofilm y, por el contrario, se inhibe la motilidad y la secreción de algunas enzimas (Perrier *et al.* 2018; Schell 2000; Hikichi *et al.* 2017; Ujita *et al.* 2019).

### 1.3.2.4. La motilidad en *R. solanacearum*

Como se ha descrito anteriormente, *R. solanacearum* necesita desplazarse a lo largo de su ciclo de vida para migrar hacia plantas susceptibles y dispersarse por los diferentes tejidos vegetales. Para ello, este fitopatógeno posee diferentes tipos de estrategias de movimiento, uno mediado por flagelos polares y el otro mediado por los pili de tipo IV. Ambos sistemas de motilidad bacteriana contribuyen significativamente a la patogénesis de distinta manera (Genin y Denny 2012).

Primero, asociado a flagelos, la motilidad *swimming* permite a *R. solanacearum* moverse cuando se encuentra fuera de un hospedador, observándose que, tras infectar a una planta, la bacteria pierde la capacidad de moverse mediante este apéndice (Peeters *et al.* 2013). Se ha visto que la mutación de componentes como FliC, proteína de la subunidad flagelar, o FliM, proteína interruptor del motor flagelar, abole el *swimming* y reduce la virulencia en plantas de tomate cuando se inocula mediante riego (Tans-Kersten *et al.* 2007, 2001).

La quimiotaxis asociada a este apéndice también ha sido descrita en *R. solanacearum*, la cual presenta los componentes básicos del *core*, como los receptores MCP, CheA y CheW, cuya función sería la detección de exudados de las raíces de las plantas susceptibles. En este sentido, se han descrito varios componentes para los que *R. solanacearum* presenta tactismo, como algunos azúcares (Yao y Allen 2006, 2007; Tans-Kersten *et al.* 2007). En el caso de CheA y CheW se ha descrito cómo su deficiencia no abole la motilidad, pero sí el quimiotactismo y, extrapolado a la patogénesis, la virulencia de estos mutantes cuando se inoculan mediante riego. Sin embargo, al inocular los mutantes directamente en el xilema de la planta, la patogénesis se restablece (Tans-Kersten *et al.* 2001; Yao y Allen 2006, 2007). Además de la quimiotaxis, el *swimming* también se ha demostrado estar regulado por PhcA, VsrA/VsrD, PehS/PehR, MotN y ralfuranonas (Meng *et al.* 2011; Mori *et al.* 2018).

El otro movimiento utilizado por *R. solanacearum* es la motilidad *twitching*, movimiento dependiente de los pili de tipo IV, los cuales desempeñan un papel en la transformación natural, la formación de biofilm y la virulencia de este fitopatógeno (Peeters *et al.* 2013). Los genes *pilA*, *pilQ* y *pilT*, cuyos productos son el monómero de la proteína pilina mayor, la secretina involucrada en la extrusión del filamento y la ATPasa requerida para la retracción, respectivamente, han sido identificados en *R. solanacearum*. La inactivación de cualquiera de ellos reduce tanto el *twitching* como la virulencia (Narulita *et al.* 2016; Kang *et al.* 2002; Liu *et al.* 2001). Además, el mutante deficiente en PilA reduce su virulencia en plantas, así como la capacidad de adherirse a raíces, formar biofilms e integrar DNA exógeno mediante transformación natural (Kang *et al.* 2002). Sin embargo, aparte de la regulación por PhcA y PehS/PehR, no existen datos sobre la implicación de componentes vinculados a la quimiotaxis asociada a pili de tipo IV en esta bacteria.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

A pesar de que *A. baumannii* y *R. solanacearum* son dos microorganismos filogenéticamente no relacionados, los costes derivados de la acción de ambos patógenos son considerablemente altos; ya sea por el coste sanitario causado por las infecciones hospitalarias provocadas por cepas multirresistentes de *A. baumannii* (Mulani *et al.* 2019; Zhen *et al.* 2019); o por las pérdidas en la producción agrícola causadas por *R. solanacearum* en cultivos de todo el mundo (Elphinstone 2005). Ambos patógenos son capaces de desplazarse mediante diversos sistemas de motilidad; como el *surface-associated motility* en el caso de *A. baumannii*, el movimiento *swimming* en el caso de *R. solanacearum*, o por el desplazamiento *twitching* en ambos patógenos (Meng 2013; Harding *et al.* 2018). Por todo ello, el objetivo global de la presente Tesis Doctoral ha sido la identificación de genes implicados en los diferentes tipos de motilidad, así como sus mecanismos reguladores en ambas especies bacterianas. Para ello, la memoria del trabajo se ha estructurado en base a cada uno de los patógenos estudiados: *A. baumannii* y *R. solanacearum*.

Estudios previos realizados por nuestro grupo realizados con *S. enterica*, han permitido determinar la implicación del componente quimiotáctico CheW y de la proteína RecA, regulador positivo del sistema SOS de reparación de daño en el DNA, en la motilidad asociada a flagelo tipo *swarming*, concretamente a través de su interacción por dominios específicos (Irazoki *et al.* 2016b, 2016a). Bajo esta premisa, en el presente trabajo, se ha evaluado la implicación de las proteínas RecA y A1S\_2813, análoga a CheW, en la motilidad de ***A. baumannii*** ATCC 17978 (cepa que presenta *surface-associated motility* como único sistema de desplazamiento). En concreto, el objetivo planteado para este patógeno ha sido el siguiente:

- i) Identificación de proteínas en la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 asociadas a la quimiotaxis y determinación de su efecto en el *surface-associated motility* y en la virulencia.

En cuanto a ***R. solanacearum***, a pesar de que el movimiento asociado a flagelo (*swimming*) y su modulación a nivel quimiotáctico han sido bien caracterizados en este fitopatógeno, los estudios a nivel de motilidad y regulación asociados a pili de tipo IV (*twitching*) son limitados (Peeters *et al.* 2013). En este contexto, los objetivos del presente estudio referente a *R. solanacearum* han sido:

- ii) Identificación de genes homólogos al sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV y determinación de su papel en los movimientos de tipo *twitching* y *swimming*.

## OBJETIVOS

- iii) Caracterización de los componentes identificados y de las subunidades de los apéndices PilA (pili de tipo IV) y FliC (flagelo) y análisis de su importancia en la virulencia, quimiotaxis, transformación y en la formación de biofilm.

# **3. RESULTADOS**





### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Importancia de la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like en la motilidad, quimiotaxis y virulencia de *A. baumannii* ATCC 17978

**Direct interaction between RecA and a CheW-like protein is required for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978**

Corral J, Pérez-Varela M, Barbé J, Aranda J  
Virulence 11(1). 2020

Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado en *Salmonella* la implicación del componente quimiotáctico CheW y de la proteína RecA (regulador positivo del sistema SOS de reparación de daño en el DNA) en la motilidad asociada al flagelo de tipo *swarming*. En estos estudios se puso de manifiesto que para el desarrollo normal de la motilidad de *S. enterica* se requiere la interacción entre las proteínas RecA y CheW, a través de dominios específicos (Irazoki *et al.* 2016b, 2016a). Por otra parte, en otros estudios se ha reportado la implicación de la proteína A1S\_2811 de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, análoga a la proteína CheA/Y del sistema quimiotáctico flagelar, en el desplazamiento por *surface-associated motility* de este microorganismo (Chen *et al.* 2017a). Bajo esta premisa, en el presente trabajo, se ha evaluado la implicación en *A. baumannii* de las proteínas RecA y A1S\_2813, análoga a CheW, en este tipo de motilidad.

Con este objetivo, se inactivaron los genes de *A. baumannii* que codifican las proteínas A1S\_2813 (proteína CheW-like) y RecA, mediante disrupción génica. Los ensayos de motilidad realizados con estos mutantes determinaron que la expresión de ambas proteínas es necesaria para poder realizar *surface-associated motility*. Conjuntamente, los ensayos de virulencia, utilizando los modelos animales *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*, confirmaron que esta pérdida de motilidad se correlaciona con una disminución de la virulencia de ambos mutantes. Por otro lado, los ensayos de quimiotaxis mostraron que tanto el mutante *recA* como el mutante *A1S\_2813* no desarrollaban respuesta quimiotáctica, a diferencia de la cepa salvaje. Además, la complementación de estos mutantes con el gen salvaje restauró los fenotipos de motilidad, virulencia y quimiotaxis.

Para determinar si el papel de las proteínas RecA y A1S\_2813 requiere de su interacción, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación, utilizando lisados de

## RESULTADOS

células de *E. coli* sobreexpresando ambas proteínas con distintas colas antigénicas para su detección mediante el uso de anticuerpos específicos. El resultado de estos ensayos demostró la interacción *in vitro* entre las proteínas RecA y A1S\_2813.

Para profundizar más en el estudio de esta interacción, se realizó un análisis estructural de ambas proteínas que, junto a la comparación de secuencias entre la proteína CheW-like (A1S\_2813) de *A. baumannii* y la proteína CheW de *S. enterica*, permitió establecer un modelo *in silico* de la interacción entre las proteínas RecA y A1S\_2813 de *A. baumannii*.

A partir de este modelo, se evaluó la funcionalidad de dos regiones de la proteína A1S\_2813; la primera hipotéticamente implicada en la capacidad de interaccionar y la segunda no. Para ello, se seleccionó un aminoácido de cada una de estas dos regiones, la serina 97 y la isoleucina 121, para ser sustituidos por otro aminoácido no reactivo. Las proteínas modificadas derivadas de A1S\_2813 fueron utilizadas en nuevos ensayos de co-inmunoprecipitación, en los que se demostró que el cambio aminoacídico en la serina 97 abole la interacción de la proteína A1S\_2813 con la proteína RecA, mientras el cambio en la isoleucina 121 no altera su capacidad de interaccionar con RecA.

Por otra parte, y para determinar el efecto *in vivo* de estos cambios aminoacídicos, se complementó el mutante *A1S\_2813* con el gen codificante de las dos proteínas mutagenizadas, evaluando su efecto en motilidad, quimiotaxis y virulencia. Estos ensayos demostraron que el mutante complementado con el gen *A1S\_2813* con sustitución aminoacídica en la serina 97 no es capaz de desplazarse mediante *surface-associated motility* ni de realizar una respuesta quimiotáctica, además de ser menos virulento que la cepa salvaje. Por el contrario, la complementación con el gen *A1S\_2813* con sustitución aminoacídica en la isoleucina 121 restaura los fenotipos de motilidad, quimiotaxis y virulencia a niveles similares a los de la cepa salvaje.

El conjunto de estos resultados indica que la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like (A1S\_2813), a través de la región de la proteína A1S\_2813 en la que se encuentra la serina 97, es esencial para el *surface-associated motility*, la quimiotaxis y la virulencia en la cepa tipo *A. baumannii* ATCC 17978.

## Direct interaction between RecA and a CheW-like protein is required for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978

Jordi Corral, María Pérez-Varela, Jordi Barbé\*, and Jesús Aranda\*

Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

### ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is a nosocomial pathogen that causes multi-drug resistant infections mainly in immunocompromised patients. Although this gram-negative species lacks flagella, it is able to move over wet surfaces through a not well characterized type of movement known as surface-associated motility. In this study we demonstrate through the inactivation of the *A1S\_2813* gene (coding a CheW-like protein) and *recA* (coding a DNA damage repair and recombination protein) that both genes are involved in the surface-associated motility and chemotaxis of *A. baumannii* ATCC 17978 strain. In addition, we also point out that the lack of either RecA or CheW-like proteins reduces its virulence in the *Caenorhabditis elegans* and the *Galleria mellonella* animal models. Furthermore, we show through co-immunoprecipitation assays that the CheW-like protein and RecA interact and that this interaction is abolished by the introduction of the mutation S97A in one of the domains of CheW-like protein that is structurally conserved in *Salmonella enterica* and necessary for the RecA-CheW interaction in this bacterial species. Finally, we show that the replacement of the wild-type CheW-like protein by that presenting the S97A mutation impairs surface-associated motility, chemotaxis and virulence of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

### ARTICLE HISTORY

Received 22 November 2019  
Revised 28 February 2020  
Accepted 28 February 2020

### KEYWORDS

*A. baumannii*; surface-associated motility; chemotaxis; virulence; RecA; CheW-like protein

### Introduction


*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen whose abilities to develop antimicrobial resistance and to survive in hospital environments are responsible for its association with nosocomial infections worldwide [1]. In many different bacterial species, virulence is close related to motility [2]. This is the case in *A. baumannii* [3], in which two types of motility have been described: (i) twitching motility, a coordinated multicellular movement driven by the extension, attachment and retraction of type IV pili, and (ii) surface-associated motility, an appendage-independent form of movement [4]. Despite direct connection between twitching motility in virulence has not been observed for *A. baumannii* [2], several reports confirm the importance of surface-associated motility in the virulence of *A. baumannii* [3,5–7]. This type of motility has been associated to the synthesis of 1,3-diaminopropane [5], quorum sensing [8], blue light [9], lipooligosaccharide production [10], and at least to five of the six known efflux pump superfamilies [7].

The motility of bacteria is precisely regulated by a chemotaxis system that enables the cells to sense specific chemicals and then direct movement toward or away from them [11]. A recent report showed that inactivation of the putative chemotaxis CheA/Y-like regulator *A1S\_2811* in *A. baumannii* strain ATCC 17978 impairs the surface-associated motility of the bacterium [12]. In *Pseudomonas aeruginosa*, another nosocomial pathogen closely related to *Acinetobacter* spp., CheA forms a complex with the chemotactic receptor through the coupling protein CheW. This allows CheA to transfer its phosphate group to CheY, which then interacts with the flagellar motor to switch the direction of flagellar rotation [11]. Although *Acinetobacter* spp. lack flagella, genetic studies in *P. aeruginosa*, which possesses both flagella and pili, have provided insights into a putative pili-mediated chemotaxis pathway, including the homologous components ultimately involved in pili extension/retraction [11].

In *A. baumannii* strain ATCC 17978, homologues to practically all genes encoding putative pili-mediated chemotaxis proteins have been identified in the operon

**CONTACT** Jesús Aranda  [jesus.aranda@uab.cat](mailto:jesus.aranda@uab.cat)

\*Co-senior authors

 The supplementary data for this article can be accessed here.

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*AIS\_2811-2815*, which also includes the gene *AIS\_2813*, annotated as *pill*, encoding a CheW-like protein [11,12]. We previously demonstrated that in *Salmonella enterica* the interaction of CheW with RecA, a protein involved in DNA damage repair and recombination, is necessary for swarming motility, a form of flagella-dependent movement across surfaces that involves chemoreceptor cluster formation [13]. In the present work, we show that the direct interaction of RecA and CheW-like proteins is also necessary for the surface-associated motility, chemotaxis and full virulence of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *A. baumannii* ATCC 17978 and *Escherichia coli* (strains DH5 $\alpha$ , BL21 and OP50) were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium [14] with shaking at 180 rpm. When necessary, the medium was supplemented with kanamycin (50 mg/L), gentamicin (20 mg/L for *E. coli* or 40 mg/L for *A. baumannii*), ampicillin (50 mg/L) or chloramphenicol (34 mg/L). The plasmids pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, catalog number 451245), pVRL1 [15] and pUA1108 [16] were used for mutant construction, complementation and overexpression, respectively (Table 1). The growth of *A. baumannii* was monitored using bacterial cultures in LB broth inoculated with an overnight culture at a dilution of 1:100 and then incubated at 37°C with shaking at 180 rpm. The optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) was measured hourly.

### Accession numbers

The sequences of RecA and CheW-like proteins of *A. baumannii* strain ATCC 17978 used in this study were obtained from NCBI (National Center for Biotechnology Information), with the following accession numbers: APP32573 (RecA; old annotation AIS\_1962, current annotation AUO97\_17690) and APP29846 (CheW-like protein; old annotation AIS\_2813, current annotation AUO97\_03055).

### *A. baumannii* knockout construction and complementation

Gene inactivation was carried out as previously described [17]. Briefly, an internal fragment of the target gene from wild-type (WT) *A. baumannii* strain ATCC 17978 was PCR-amplified using the appropriated primers (Supplementary Table 1). The resulting fragment was cloned into the pCR-BluntII-TOPO

plasmid (Invitrogen), transformed in *E. coli* DH5 $\alpha$  and selected on kanamycin-containing LB plates. The purified plasmid was then introduced into WT *A. baumannii* by electroporation and the resulting transformants were selected on kanamycin-containing plates. Recombinant clones were confirmed by sequencing (Macrogen) of the PCR products obtained by using the appropriate primers, indicated in Supplementary Table 1. Ten passages without selective pressure and colony resuspension were carried out every 24 h to determine the stability of the knockout, by colony counting on LB plates with and without kanamycin at the last passage. For complementation, the target gene was cloned into the pVRL1 vector using the appropriate primers (Supplementary Table 1), which included *XhoI-NcoI* restriction sequences [15]. The recombinant plasmid was introduced by electroporation, firstly into *E. coli* DH5 $\alpha$  and then, once the correct construct had been verified by PCR and sequencing (Macrogen), into the corresponding *A. baumannii* knockout. The complemented mutants were selected on kanamycin- and gentamicin-containing plates.

### Surface-associated motility assays

The assays were conducted on modified fresh LB agar plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% glucose, and 0.5% Difco agar), prepared on the day of the experiment. Bacterial cultures were grown to early stationary phase and a 5- $\mu$ l droplet of the culture was placed in the center of the plate. The inoculated plates were incubated at 30°C for 16–20 h until the WT strain had grown to reach the plate border. All assays were carried out at least three times in independent experiments, each in triplicate. A ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ system (Bio-Rad) was used to obtain representative images.

### Chemotaxis assays

*A. baumannii* movement toward a chemoattractant was assayed as previously described [18], with slight modifications. Briefly, autoclaved, 3-cm-long capillary tubes (Microcaps, Drummond Scientific Co., catalog number 1-000-0010) were half-filled with chemotaxis buffer (CB; 10 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) solidified using agarose (3% w/v) with or without 2% methanol as chemoattractant and then completely filled with CB without agarose. Bacterial suspensions were prepared from cultures grown to mid-exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.5) in Tryptone broth (1% tryptone and 0.5% NaCl) and then washed and resuspended in CB to an OD<sub>600</sub> of 0.1. Chemotaxis

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5a	<i>E. coli</i> supE4 ΔlacU169 (φ80 ΔlacZ ΔM15) hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Clontech
BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> dcm ompT lon hsdS(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) galλ(DE3) carrying pLysS plasmid, Cm <sup>R</sup>	Stratagene
<i>Acinetobacter baumannii</i> strains		
ATCC 17978	Wild-type	ATCC
recA	Strain ATCC 17978 with recA::Km, Km <sup>R</sup>	[19]
A15_2813	Strain ATCC 17978 with A15_2813::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup>	This work
Plasmids		
pCR-BluntII-TOPO	Cloning vector, Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup>	Invitrogen
pVRL1	Complementation vector, Gm <sup>R</sup>	[9]
pUA1108	pGEX 4 T-1 derivative plasmid without the GST fusion tag, carrying the P <sub>tac</sub> promoter and the lac <sup>R</sup> gene; used as overexpression vector, Ap <sup>R</sup>	[10]
pUA1108- recA-FLAG	pUA1108 plasmid carrying ATCC 17978 recA with FLAG tag, Ap <sup>R</sup>	This work
pUA1108-A15_2813-6x His	pUA1108 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813 with 6x His tag, Ap <sup>R</sup>	This work
pUA1108-A15_2813#597A-6x His	pUA1108 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813 Ser97Ala with 6x His tag, Ap <sup>R</sup>	This work
pUA1108-A15_2813#1121A-6x His	pUA1108 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813 Ile121Ala with 6x His tag, Ap <sup>R</sup>	This work
pVRL1- recA	pVRL1 plasmid carrying ATCC 17978 recA, Gm <sup>R</sup>	This work
pVRL1-A15_2813	pVRL1 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813, Gm <sup>R</sup>	This work
pVRL1-A15_2813#597A	pVRL1 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813 Ser97Ala, Gm <sup>R</sup>	This work
pVRL1-A15_2813#1121A	pVRL1 plasmid carrying ATCC 17978 A15_2813 Ile121Ala, Gm <sup>R</sup>	This work

Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Zeo<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> stand for resistance to chloramphenicol, kanamycin, zeocin, gentamicin and ampicillin, respectively.

chambers were prepared in a six-well plates (Sardstedt), with one plate for each bacterial suspension. A capillary containing either the chemoattractant or CB alone was placed in each well so that it soaked in 2 ml of the appropriate bacterial suspension. After a 2-h incubation in the chemotactic chambers at 30°C, the capillaries were washed twice to remove any externally attached cells, broken open and their contents poured into capillary tubes containing saline solution. Serial dilutions of the suspensions were plated in LB medium to determine the number of CFU (colony-forming units) per ml obtained under each condition and then normalized between capillaries with and without chemoattractant. The chemotaxis experiments were carried out in at least 9 independent experiments.

**Transmission electron microscopy (TEM)**

Colonies of each strain from the motility plates were gently resuspended in 50 µl of 0.1 M phosphate buffer (PB). A 10-µl aliquot of each one was deposited onto carbon-coated film meshes supported by standard copper TEM grids and incubated for 30 min at room temperature. The samples were then fixed for 10 min in a glutaraldehyde solution (1% final concentration) prepared in PB, washed twice with PB and dried. Thereafter, they were negatively stained with 2% uranyl acetate for 1 min and observed on a JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL Inc., Peabody, MA, USA).

**Nematode fertility assays**

The virulence of *A. baumannii* strains was determined based on a *Caenorhabditis elegans* nematode progeny

count assay, performed as previously described [19]. Briefly, the low-virulence strain *E. coli* OP50, grown as a lawn on NGM (Nematode Growth Medium) plates, was used to feed *C. elegans* strain N2. Physiological synchronization was achieved by hatching the nematode eggs in M9 medium (0.02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.08 M NaCl, and 0.001 M MgSO<sub>4</sub>) and then arresting the growth of the worms in the first larval (L1) stage overnight at 16°C. The L1 larvae were then cultivated to the last larval stage (L4) on NGM plates seeded with the appropriate bacterial strain. Each L4 worm was placed on a PGS (peptone glucose sorbitol) plate with the corresponding *A. baumannii* strain and incubated at 25°C. During each of the following 3 days, the worms were transferred to new plates seeded with the same bacterial strain. Nematode fertility was determined using a stereomicroscope (Olympus SZ51) to count the progeny daily beginning 48 h after the removal of the parent worm. Six independent replicates were established for each strain and each fertility assay was performed in triplicate.

**Galleria killing assays**

The virulence of *A. baumannii* strains was also determined using a modified version of the *Galleria mellonella* (wax moth) model described by Peleg et al [20]. Briefly, ten caterpillars, each with an approximate weight of 300 mg, were inoculated via the hemocoel with 10 µl of an exponentially growing (OD<sub>600</sub> = 0.5) strain of *A. baumannii*, previously resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The concentration of the inoculum was confirmed by colony counts on LB agar. As a negative control, 10 µl of PBS was injected

into the same number of caterpillars. The caterpillars were incubated at 37°C in dark, and their survival was checked every 12 h for a total of 96 h. All *G. mellonella* killing experiments were performed at least twice. To assess plasmid stability of complemented mutants used in this animal model, at least 5 worms for each strain were infected with sublethal doses of the corresponding complemented mutant (approximately  $1 \times 10^4$  CFU/worm) and incubated at 37°C for 96 h. The worms were then washed with ethanol 70% and sterile water. Afterward, the hemolymph was extracted and serial dilutions were plated on solid media containing kanamycin or kanamycin plus gentamycin.

#### Co-immunoprecipitation assays

The *recA* and *AIS\_2813* genes were cloned into the pUA1108 overexpression vector after their amplification by PCR using the appropriate primers (Supplementary Table 1). Recombinant plasmids were introduced by electroporation of *E. coli* BL21, selected on ampicillin-containing plates and confirmed by sequencing (Macrogen). Interaction of the RecA and AIS\_2813 proteins (carrying FLAG and 6× His tag sequences, respectively) was determined as described by Mayola *et al* [16], with slight modifications. Briefly, pellets obtained from IPTG-induced cultures were sonicated and the supernatants collected after centrifugation. The cell lysates were immunoprecipitated using Pure Proteome Protein A magnetic beads (Millipore, catalog number LSKMAGA10) coated with the appropriate primary antibodies: rabbit anti-FLAG (Sigma-Aldrich, catalog number F7425) or mouse anti-6× His IgGs (Roche, catalog number 11922416001), according to the manufacturer's instructions. The samples were separated by SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and analyzed by western blotting. Horseradish peroxidase (HRP)-coupled goat anti-rabbit (Yo proteins, catalog number 464) or anti-mouse IgGs antibodies (Acris, catalog number R1253HRP) were used as secondary antibodies and the immune complexes were visualized by the addition of the Luminata Forte™ western HRP substrate (Millipore, catalog number WBLUF0100). Representative membrane images were obtained using a ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad).

#### Site-specific mutagenesis of CheW-like protein

The ORF of *A. baumannii* CheW-like protein was cloned into the overexpression plasmid pUA1108 and specific nucleotides were then replaced using the

appropriate oligonucleotides (Supplementary Table 1) and the Q5® Site-Directed Mutagenesis kit (BioLabs, catalog number E0554S) according to the manufacturer's instructions. Sequence sites to mutagenize were selected based on comparisons of the predicted secondary structures of the *A. baumannii* CheW-like and *S. enterica* CheW proteins (accession numbers: ABO13219 and NP\_460877, respectively), performed with the SABLE program (<http://sable.cchmc.org/>). The pUA1108 plasmids containing genes coding either RecA-FLAG or AIS\_2813-6× His and the derivate site-specific mutagenic proteins were introduced by electroporation into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega) and selected on ampicillin- and chloramphenicol-containing plates. Additionally, all AIS\_2813 genes carrying a specific mutagenized sequence were cloned from the pUA1108 plasmid into the pVRL1 vector using the appropriate primers containing *XhoI*-*NotI* restriction sequences (Supplementary Table 1) and introduced into the *A. baumannii* AIS\_2813 mutant strain. The transformants were selected on kanamycin- and gentamicin-containing plates. All constructs were verified by sequencing (Macrogen).

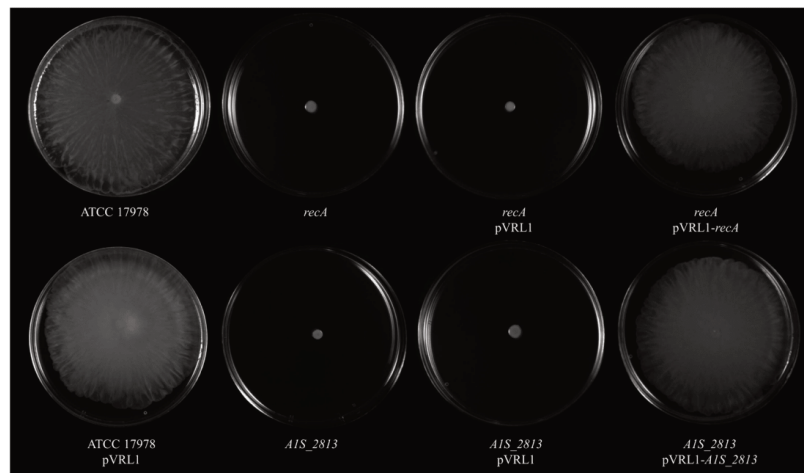
#### Statistical analysis

Data obtained in the chemotaxis assays and the nematode model of virulence are presented as the mean  $\pm$  standard deviation and were analyzed using a two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for *post-hoc* multiple group comparisons. In the *G. mellonella* killing assay, survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and differences in survival were calculated using the log-rank test. In all tests, a P value  $< 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## Results

### RecA and CheW-like proteins are involved in the surface-associated motility and chemotaxis of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

After 24 h of incubation on motility plates, the *recA* and the AIS\_2813 *A. baumannii* knock-out mutants (Table 1) did not show surface-associated motility, unlike the WT parental strain *A. baumannii* ATCC 17978 (Figure 1). To link the impaired motility to the lack of either the *recA* or the AIS\_2813 gene, the respective WT genes were introduced into the corresponding knockout-mutant strains. The resulting complementation restored surface-associated motility by



**Figure 1.** Representative image of the surface-associated motility of the indicated *A. baumannii* strains.

both mutants to a level similar to that observed in the WT strain (Figure 1). By contrast, introduction of the empty expression vector pVRL1 did not modify the behavior of any of the studied strains (Figure 1). Since the growth curves of the *recA* and *AIS\_2813* knockout mutants (both presenting a stability of >90%) cultured in LB medium were comparable to that of the WT strain (Fig. S1), the altered surface-associated motility of the mutants cannot be attributed to reductions in the bacterial growth rate. To determine whether the lack of RecA and/or CheW-like proteins affects bacterial chemotaxis, a fishing method was used in which methanol served as the chemoattractant. The results showed an approximately 3-fold increase in bacterial counts of the WT strain in capillaries with methanol compared to the counts obtained in capillaries containing only CB (control), whereas in the case of both the *recA* and *AIS\_2813* knockout mutants there were no significant differences of these mutants in cell migration toward methanol compared to the control capillaries containing only CB, showing a significant difference in the fold-change cell count in both mutants with respect to that observed in the WT parental strain (Figure 2). Furthermore, the complementation of either mutant restored the WT chemotaxis phenotype (Figure 2). In addition, on the TEM images, both *recA* and *AIS\_2813* knockouts lacked the pilus-like structure typically present on cells of the ATCC 17978 WT strain, but in each mutant complementation resulted in its recovery (Figure 3 and Fig. S2).

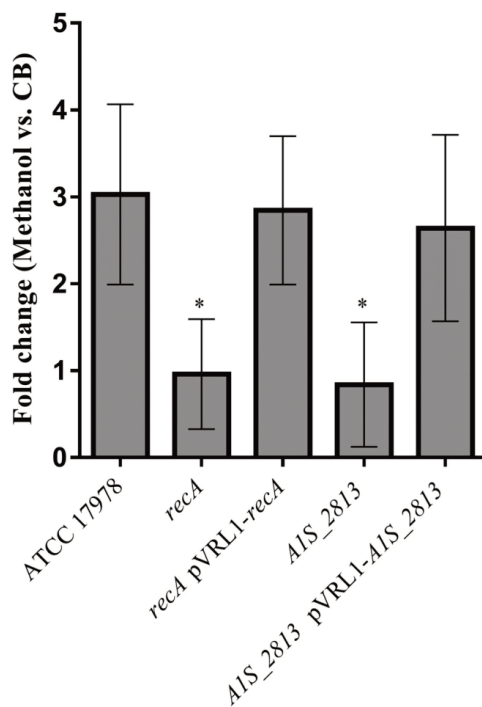
#### **The lack of either RecA or cheW-like proteins reduces the virulence of *A. baumannii* strain ATCC 17978 in two different animal models.**

In the *C. elegans* fertility assay, worms fed either the *recA* or the *AIS\_2813* mutant exhibited an increased number of progeny compared to worms fed the WT strain (Figure 4(a)), indicating a significant reduction in the pathogenicity of the mutants. When the worms were fed the complemented strains (presenting a plasmid stability of  $109 \pm 28\%$  and  $94 \pm 10\%$  for the complemented *recA* and *AIS\_2813* mutants, respectively), the number of progeny was less than obtained with the respective mutants and similar to that obtained when the WT strain was used as nourishment (Figure 4(a)). Accordingly, in the *G. mellonella* killing assay, approximately 50% of the worms inoculated with either the *recA* or the *AIS\_2813* mutant survived during the 96-h experiment, whereas practically all larvae inoculated with the WT or the complemented strains died within the first 40 h (Figure 4(b)).

#### **In vitro interaction between the *A. baumannii* strain ATCC 17978 RecA-FLAG and CheW-like -6x His protein**

*In silico* analysis revealed that while *S. enterica* CheW and the *A. baumannii* CheW-like protein had an identity of only 24%, their secondary structures were highly similar (Figure 5(a)). In *S. enterica*, the RecA and CheW proteins





**Figure 2.** The fold-change between viable bacteria (CFU) of the indicated strains, calculated as the number of CFU in capillaries containing chemoattractant (2% methanol) divided by the number in control capillaries containing only CB (chemotaxis buffer). Error bars represent the standard deviation (SD) of the means. \*P < 0.05 in a comparison with the *A. baumannii* parental strain (ATCC 17978) and based on at least nine independent experiments.

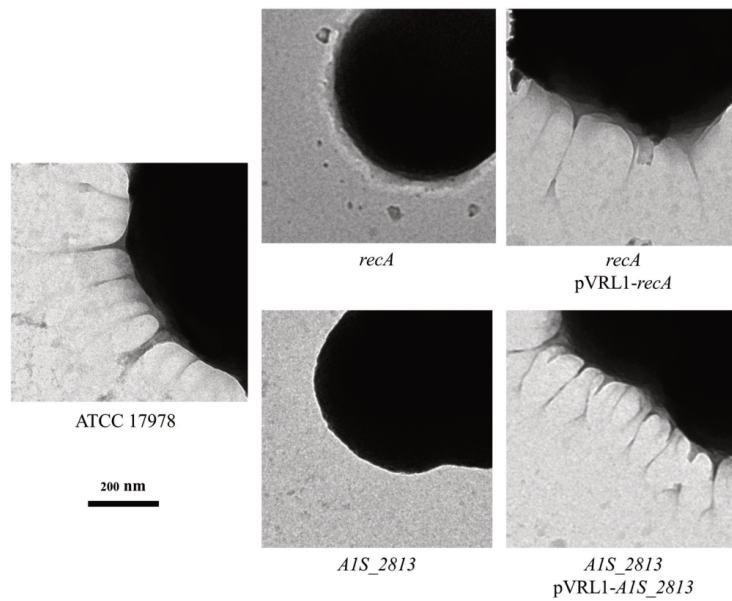
interact [16]. To determine whether this was also the case for the RecA and CheW-like (AIS\_2813) proteins of *A. baumannii*, we conducted an *in silico* modeling of interaction (Fig. S3) and a co-immunoprecipitation assay using the overexpressed tagged proteins RecA-FLAG and AIS\_2813-6× His (Figure 5(b)). When the tagged proteins were mixed with their corresponding antibody-coated beads (RecA-FLAG with anti-FLAG or AIS\_2813-6× His with anti-6× His), the matching protein was detected in the recovered supernatant (Figure 5(b)). When the tagged proteins were mixed with the opposite antibody-coated beads (RecA-FLAG with anti-6× His or AIS\_2813-6× His with anti-FLAG), no proteins were detected. These results confirmed the specificity of the assay (Figure 5(b)). We then added a mixture of the tagged proteins (RecA-FLAG and AIS\_2813-6× His) to each suspension of antibody-coated beads, which resulted

in the recovery of the opposite tagged protein (RecA-FLAG with anti-6× His and AIS\_2813-6× His with anti-FLAG) and its subsequent detection in a western blot assay (Figure 5(b)). Together, these findings clearly demonstrated that RecA-FLAG and the CheW-like-6× His protein of *A. baumannii* specifically interact *in vitro*.

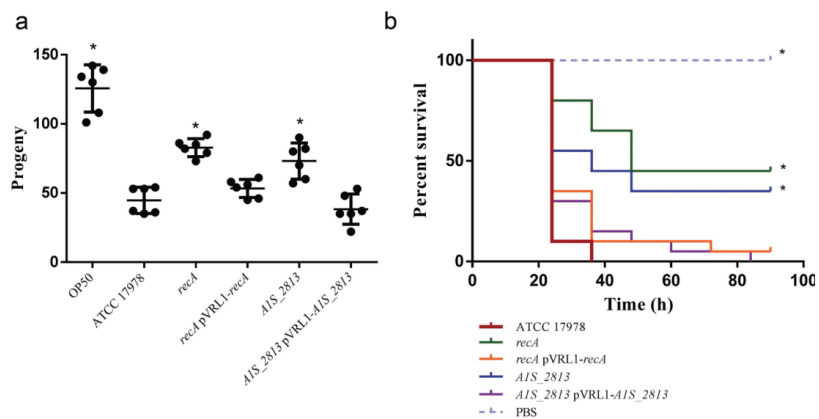
To examine whether the CheW and RecA interaction domains in *S. enterica* are conserved in *A. baumannii*, a CheW-like-6× His derivate-tagged protein was generated by the substitution of residue Ser97Ala. This position of the CheW-like-6× His protein of *A. baumannii* corresponds exactly to the Asp that is the second-to-last residue of the Turn-6 region of *S. enterica* CheW (Figure 6(a)). In CheW, replacement of the Asp by an alanine, a non-reactive amino-acid residue [21], abolishes its interaction with RecA [13]. As a negative control, we also generated, a CheW-like-6× His derivate protein containing the substitution Ile121Ala at a site corresponding to a region of the *S. enterica* CheW protein that is not involved in the interaction with RecA (Figure 6(a)). It is worth noting that appropriate expression of all proteins used in this work was confirmed through western blot assay (Fig. S4). Co-immunoprecipitation assays showed that the RecA-FLAG protein was not able to bind the CheW-like-6× His protein containing the substitution Ser97Ala, whereas the derivate Ile121Ala was recovered (Figure 6(b)). These results indicate that in the CheW-like-6× His protein Ser97 but not Ile121 is essential for the interaction with RecA in *A. baumannii*. Thus, at least one of the essential domains involved in the interaction of CheW with RecA in *S. enterica* is also required for the interaction of the corresponding homologues in *A. baumannii*.

**In vivo interaction between the *A. baumannii* ATCC 17978 RecA and CheW-like protein**

To determine whether the RecA-AIS\_2813 interaction is involved in surface-associated motility and virulence, mutant *AIS\_2813* genes encoding the proteins that included the Ser97Ala or Ile121Ala mutations were cloned into the pVRL1 plasmid and introduced into the *AIS\_2813* mutant strain. Motility and chemotaxis assays showed that expression in the *AIS\_2813* knockout of the mutagenized *AIS\_2813* gene whose product included the Ile121Ala substitution completely restored the parental phenotypes (Figure 7). By contrast, the *AIS\_2813* knockout expressing the AIS\_2813 protein containing the Ser97Ala mutation and thus unable to interact with RecA *in vitro*, did not restore either surface-associated motility or chemotaxis (Figure 7). Finally, the pathogenicity of both strains was tested in the *C. elegans* fertility and *G. mellonella* killing assays (Figure 8). As expected,



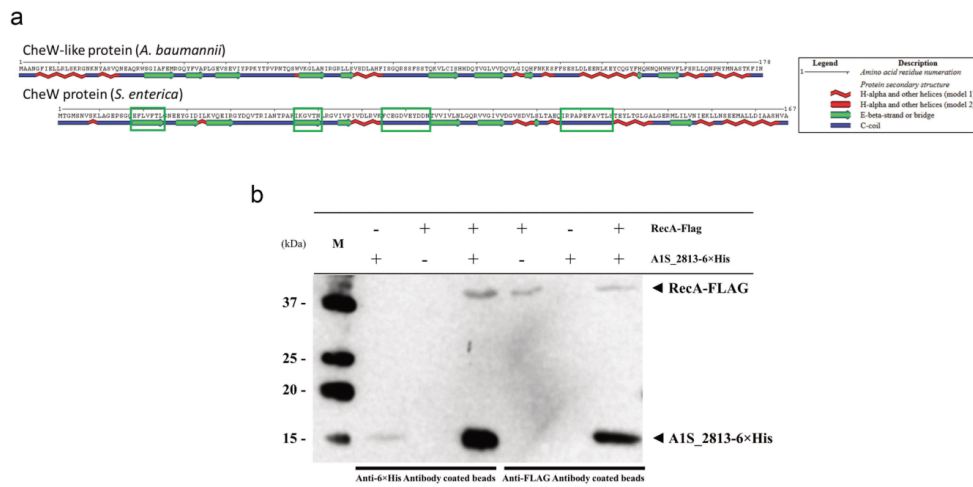
**Figure 3.** Transmission electron microscopy of the indicated *A. baumannii* strains. The images were obtained at 4,000 × magnification.



**Figure 4.** (a) Representative results of a *C. elegans* fertility assay using the indicated strains of *A. baumannii*. \* $P < 0.05$  compared to the parental ATCC 17978 strain. *E. coli* strain OP50 was included as a low virulent control. (b) Representative *G. mellonella* killing assay of the specified strains. Larvae ( $n = 10$  per group) were inoculated with either  $\sim 10^6$  CFU of the indicated strain or PBS (as a negative control). Error bars represent the SDs of the means. \* $P < 0.05$  in a comparison with the *A. baumannii* parental strain (ATCC 17978).

the virulence of the *cheW*-like mutant expressing the *AIS\_2813* gene encoding Ser97Ala mutant protein was impaired in both animal models and was similar to the *AIS\_2813* knockout strain (Figure 8). However, the

virulence of the *AIS\_2813* mutant strain was fully restored by expression of the gene encoding a CheW-like protein containing the Ile121Ala substitution, as occurred when the *AIS\_2813* strain was complemented



**Figure 5.** (a) Predicted secondary structure of the *S. enterica* CheW and *A. baumannii* CheW-like proteins. The green boxes indicate the *S. enterica* CheW domains involved in the interaction with RecA. (b) Results of a co-immunoprecipitation assay between the *A. baumannii* RecA-FLAG and A1S\_2813-6× His proteins. The supernatants were separated by SDS-PAGE and assessed by western blotting. The image is representative of three independent experiments using three different lysates for each protein. The presence (+) or absence (-) of the RecA-FLAG or A1S\_2813-6× His proteins in the corresponding lysate mixture is indicated, as is that of the antibody-coated beads used in each mixture. The RecA-FLAG and A1S\_2813-6× His bands detected on a western blot are shown. M: molecular mass marker.

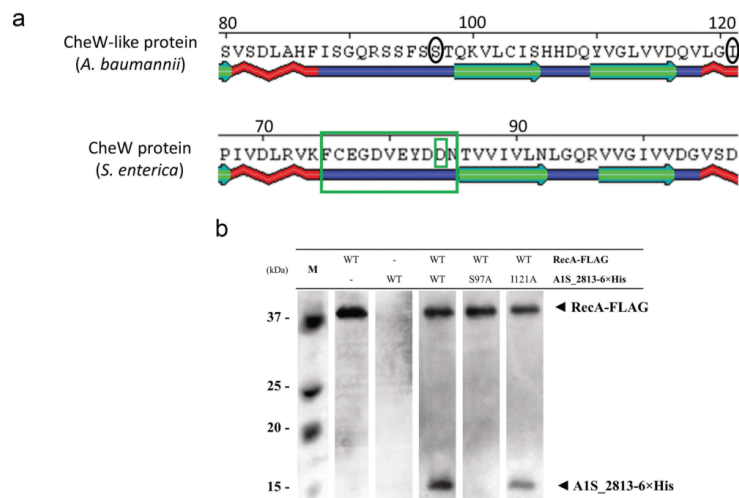
with the corresponding WT gene (Figure 8). These results demonstrated that the interaction between the RecA and CheW-like proteins *in vivo* is necessary for the surface-associated motility and full virulence of *A. baumannii*.

**Discussion**

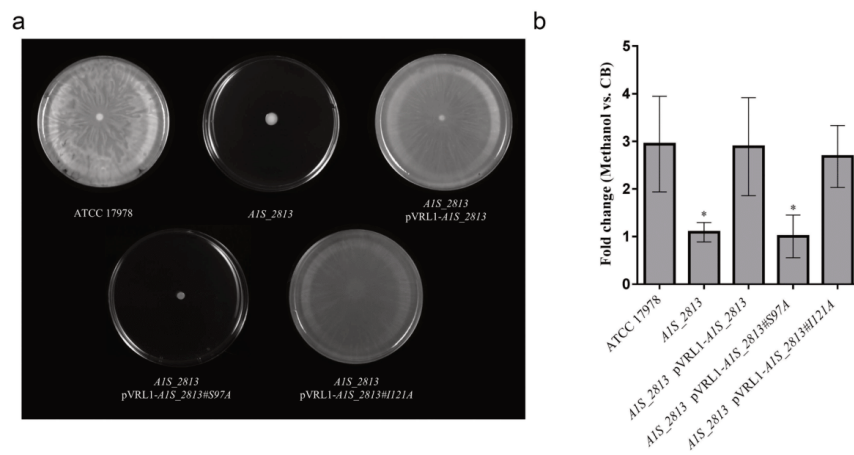
The surface-associated motility characteristic of several *A. baumannii* clinical isolates allows their movement over wet surfaces independent of the bacterial expression of type IV pili [2]. In *A. baumannii*, a non-flagellated bacteria, the molecular and genetic basis of surface-associated motility is unclear and the terminology used in the literature to describe it is often confusing. For example, in several publications surface-associated motility is referred to as swarming, which is, however, flagella-dependent. The surface-associated motility of *A. baumannii* seems to be closely related to the pathogenicity of the bacterium, as an increase in motility is associated with an increase in virulence [6] whereas *A. baumannii* mutants unable to conduct surface-associated motility exhibit an attenuated virulence [3,7].

The motility phenotypes in *A. baumannii* are diverse and include motility on semi-solid media (surface-associated motility), migration conducted by type IV pili, such as occurs at the medium-plastic interface of

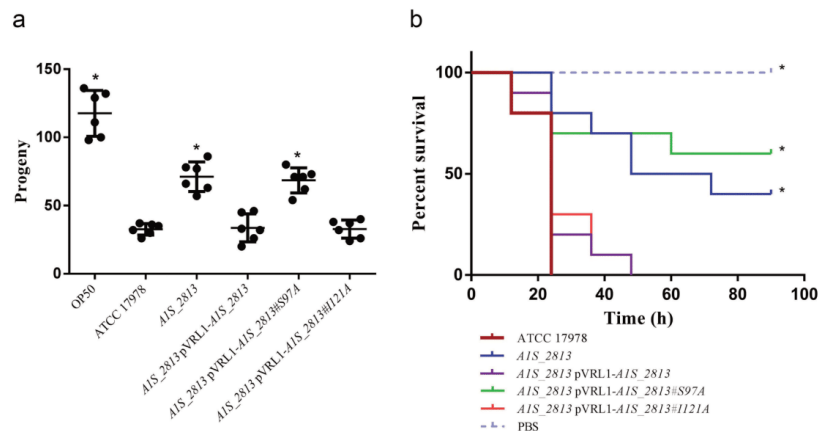
solid medium (twitching motility), both motilities or neither [22]. Strain ATCC 17978, one of the most well studied clinical isolates of *A. baumannii*, is capable of surface-associated motility but not twitching [22]. In this strain, surface-associated motility was recently linked to the CheA/Y-like protein A1S\_2811, a component of a hypothetical chemotactic signal transduction system whose inactivation causes a significant decrease in this type of movement [12]. Our group recently reported that in *S. enterica* the interaction between the chemotaxis system and the RecA protein is necessary for the swarming motility of this species [13]. Specifically, RecA interacts with CheW to allow chemoreceptor cluster formation, which is ultimately involved in flagellar rotation [13]. In previous work, we constructed an *A. baumannii* mutant lacking RecA, the major enzyme involved in recombination, to show the protein's involvement in virulence as well [23]. The results of the present study demonstrate that inactivation of the *A. baumannii* *recA* gene also impairs motility (Figure 1). Since a putative operon involved in *A. baumannii* chemotaxis has been recently described, we proceeded to inactivate its A1S\_2813 gene (annotated as *pilI* in ATCC 17978 strain [12]), which encodes a protein homologous to the CheW-like protein of *P. aeruginosa* [11]. As in the



**Figure 6.** (a) Detail of a selected conserved region in the predicted secondary structure of the *S. enterica* CheW and *A. baumannii* CheW-like proteins. The large and small green boxes indicate, respectively, a known domain and a residue of *S. enterica* CheW protein involved in the interaction with RecA. The black circles indicate the subsequently mutagenized residues from the *A. baumannii* CheW-like protein. (b) Co-immunoprecipitation of the RecA-FLAG and A1S\_2813-6x His proteins and the derivative A1S\_2813-6x His site-specific mutagenized proteins. The supernatants were separated by SDS-PAGE and assessed by western blotting. The images are representative of those from three independent assays. The presence of the RecA-FLAG and A1S\_2813-6x His proteins (WT) and the absence of (-) or residue change (Ser97Ala or Ile121Ala) in A1S\_2813-6x His in the corresponding mixtures are indicated. The western blot shows the RecA-FLAG and A1S\_2813-6x His protein bands revealed following incubation of the lysates with anti-FLAG coated beads. M: molecular mass marker.



**Figure 7.** (a) Representative image of the surface-associated motility of the indicated *A. baumannii* strains. (b) The fold-change in the number of viable bacteria (CFU) of the indicated strains, based on the counts in capillaries containing chemoattractant (2% methanol) divided by those in control capillaries containing only CB. Error bars represent the SDs of the means. \*P < 0.05 in a comparison with the *A. baumannii* parental strain (ATCC 17978) as determined in at least nine independent experiments.



**Figure 8.** (a) Representative results of a *C. elegans* fertility assay with the indicated strains. \*P < 0.05 in a comparison with the *A. baumannii* parental strain (ATCC 17,978). *E. coli* strain OP50 was included as a low virulent control. (b) Representative results of a *G. mellonella* killing assay of the specified strains. Larvae (n = 10 per group) were inoculated with ~10<sup>6</sup> CFU of the indicated strain or PBS (as a negative control). Error bars represent the SDs of the means. \*P < 0.05 in a comparison with the *A. baumannii* parental strain (ATCC 17978).

case of the *recA* mutant, the absence of the gene encoding the CheW-like protein of *A. baumannii* resulted in the abolishment of surface-associated motility (Figure 1), indicating that both RecA and the hypothetical chemotaxis operon *AIS\_2811-2815* are involved in the surface-associated motility of *A. baumannii* strain ATCC 17978.

The *AIS\_2811* gene (encoding a CheA/Y-like protein) and the *AIS\_2813* gene (encoding a CheW-like protein) belong to the same hypothetical chemotactic operon. However, while the importance of this operon in surface-associated motility of *A. baumannii* has been unequivocally demonstrated, to our knowledge, its role in the chemotaxis of this bacterium was previously unknown. The present work is the first to demonstrate that both the CheW-like protein and RecA are involved in the chemotaxis of *A. baumannii* (Figure 2). The molecular machinery that controls chemotaxis in bacteria has been grouped in three different functional classes: flagella, type IV pili, and alternative cellular functions, including those that are acquired by horizontal gene transfer or duplication [24]. For instance, *Myxococcus xanthus*, a gram-negative soil bacterium with a complex life cycle, lacks flagella but makes use of two other types of motility, one dependent and the other independent of type IV pili. It also has at least eight chemosensory systems, most of which play various roles in controlling either one or the other type of motility [25]. Furthermore, *M. xanthus* possesses a CheW homologue that is required for the biogenesis

of the cell surface appendages necessary for type-IV-pili-independent motility [26]. By contrast, in *A. baumannii* strain ATCC 17978 only one chemosensory system (the *AIS\_2811-2815* operon) has been identified so far. It should be implicated in the chemotactic response through the regulation of appendages that are distinct from flagella and type IV pili and/or through appendage-independent mechanisms.

In *P. aeruginosa*, a pili-mediated chemotaxis pathway has been described in which the CheW-like protein is the coupling protein between the chemotactic receptor and the CheA/Y-like two component system. The loss of the CheW-like protein of *A. baumannii* strain ATCC 17978 reduces surface-associated motility as well as the number of pilus-like structures and the amount of cell-surface extrapolymeric substances [11,12]. The present study similarly showed a dramatic reduction of both pilus-like structures and secreted substances in the *recA* and *cheW*-like mutant derivatives of *A. baumannii* strain ATCC 17978 (Figure 3). This finding is consistent with our previous work, in which we showed that the inactivation of transporters belonging to practically all families of *A. baumannii* efflux pumps drastically reduces the surface-associated motility of the bacterium [7]. The reduction might be due to the decreased translocation of molecules related to this type of motility, such as surfactants or quorum-sensing signals [5,8,10]. Accordingly, one of the most strongly down-regulated genes of an *A. baumannii* *cheA/Y*-like mutant belongs to the operon *AIS\_0112-0119*, involved in the production of acinetin 505 and its extrusion via an RND efflux pump

[12,27]. Acinetin 505 is a lipopeptide that may act as a surfactant in the promotion of surface-associated motility [27].

The impact of CheW-like and RecA proteins on the virulence of *A. baumannii* was tested in two different animal models, based on *C. elegans* and *G. mellonella*. Both showed the significantly decreased virulence of the *recA* and *cheW*-like knockout mutants (Figure 4). The results were in agreement with those obtained using a *recA* mutant in a mouse model [23]. Together, these studies support a clear relationship between the surface-associated motility and the pathogenesis of *A. baumannii*. Remarkably, all ATCC 17978 mutant derivatives analyzed so far presenting a decreased surface-associated motility also show a reduction in their virulence [3,7]. On the other hand, the *A. baumannii* strain lacking the transcriptional repressor H-NS is not only hypermotile but also shows an increased virulence [6]. In both types of mutants, efflux pumps are involved in the observed phenotype, albeit in an opposite manner. In mutants lacking surface-associated motility, the expression of transporters involved in the extrusion of components relevant to this type of motility are absent or reduced [3,7]. In the hypermotile mutant, the expression of genes encoding quorum-sensing signals, a novel type I pilus and several efflux pumps, including those of the aforementioned *A1S\_0112-0119* operon, is significantly increased [6].

In flagella-bearing *S. enterica*, the interaction of its RecA and CheW-like homologues is necessary for chemotaxis and swarming motility [13]. We therefore asked whether a similar interaction was required in *A. baumannii* ATCC 17978, in which the two proteins were shown to be necessary for surface-associated motility, chemotaxis and virulence. Co-immunoprecipitation assays using the *A. baumannii* RecA and CheW-like proteins revealed the highly conserved secondary structure of the latter with respect to its *S. enterica* homologue CheW (Figure 5(a)) and the specific interaction of *A. baumannii* RecA and CheW-like proteins (Figure 5 (b)). In addition, interaction of the CheW-like protein with *A. baumannii* RecA was abolished by the introduction of a mutation into one of the former's protein domains that is structurally conserved and whose homologue in *S. enterica* is involved in the RecA-CheW interaction (Figure 6(a,b)). The mutation that abolished this interaction was the same that led to impaired surface-associated motility, chemotaxis and virulence (Figures 7 and 8), which clearly demonstrated that the interaction between RecA and CheW-like proteins is necessary for these functions in *A. baumannii* strain ATCC 17978.

In *S. enterica* the interaction between RecA and CheW plays a key role in swarming motility [13]. Specifically, the adaptor CheW couples the chemoreceptor protein to CheA, a histidine kinase that transfers the signal to the CheY response regulator, which acts on the flagellar motor by switching flagellar rotation [28]. RecA contributes to altering the distribution of CheW at the cell poles, at sites where flagella are distributed, to modulate swarming motility [13]. In *P. aeruginosa*, a pili-mediated chemotaxis pathway has been proposed that contains homologous components ultimately involved in pili extension/retraction [11]. Homologies of most of these proteins are also present in *A. baumannii* strain ATCC 17978, including a CheA/Y-like protein involved in surface-associated motility [12] and, as demonstrated herein, the CheW-like protein. Thus far, a role for RecA in chemotaxis and motility has been reported only in *S. enterica*, as described above; however, our results evidence the importance of the protein in the surface-associated motility of *A. baumannii* strain ATCC 17978. Since the latter bacterium lacks flagella and mutants deficient in functional type IV pili are still able to conduct surface-associated motility [29], then the interaction between the *A. baumannii* RecA and CheW-like proteins must control appendages different from either flagella or type IV pili. Alternatively, or in addition, the two proteins may control the expression of genes related to surface-associated motility, perhaps through a non-traditional chemosensory system such as that described above for *M. xanthus* [25].

In summary, our study reveals a novel role for the RecA protein in *A. baumannii* strain ATCC 17978 and demonstrates that its interaction with the CheW-like protein of the chemotactic system is necessary for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of the bacterium.

### Acknowledgments

We thank Joan Ruiz (UAB) and Susana Escribano (UAB) for their excellent technical assistance. We also thank Paolo Visca (University Roma Tre, Rome, Italy) for kindly providing plasmid pVRL1. This study was supported by a grant (BIO2016-77011-R) from the Ministerio de Economía y Competitividad. The funders had no role in the study design, data collection or data interpretation, nor the decision to submit the work for publication. J.A. is a Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad [BIO2016-77011-R].

### References

- [1] Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* Infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):409–447.
- [2] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2):91–102.
- [3] Pérez-Varela M, Corral J, Andrés Vallejo J, et al. Mutants in the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase impairing the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2017;85:8.
- [4] Biswas I, Machen A, Mettlach J. *In vitro* motility assays for *Acinetobacter* species. *Methods Mol Biol.* 2019;1946:177–187.
- [5] Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, et al. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol.* 2012;302(3):117–128.
- [6] Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, et al. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun.* 2013;81(7):2574–2583.
- [7] Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, et al. Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(3). DOI:10.1128/AAC.02190-18
- [8] Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology.* 2011;157(9):2534–2544.
- [9] Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, et al. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol.* 2010;192(24):6336–6345.
- [10] McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, et al. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol.* 2012;50(3):434–443.
- [11] Sampedro I, Parales RE, Krell T, et al. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(1):17–46.
- [12] Chen R, Lv R, Xiao L, et al. AIS\_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *Microbiologyopen.* 2017;6(5):e00510.
- [13] Irazoki O, Aranda J, Zimmermann T, et al. Molecular interaction and cellular location of RecA and CheW proteins in *Salmonella enterica* during SOS response and their implication in swarming. *Front Microbiol.* 2016;7:1560.
- [14] Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 1972.
- [15] Lucidi M, Runci F, Rampioni G, et al. New shuttle vectors for gene cloning and expression in multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62:e02480–17. doi:10.1128/AAC.02480-17.
- [16] Mayola A, Irazoki O, Martínez IA, et al. RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*. *PLoS One.* 2014;9(8):e105578.
- [17] Aranda J, Poza M, Pardo BG, et al. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):279.
- [18] Tola YH, Fujitani Y, Tani A. Bacteria with natural chemotaxis towards methanol revealed by chemotaxis fishing technique. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(11):2163–2171.
- [19] Vallejo JA, Beceiro A, Rumbo-Feal S, et al. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;pii: S0924-8579(15)00241. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.05.021
- [20] Peleg AY, Jara S, Monga D, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2605–2609.
- [21] Cunningham BC, Wells JA. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science.* 1989;244(4908):1081–1085.
- [22] Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, et al. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;323(1):44–51.
- [23] Aranda J, Bardina C, Beceiro A, et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J Bacteriol.* 2011;193(15):3740–3747.
- [24] Wuichet K, Zhulin IB. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci Signal.* 2010;3(128):ra50.
- [25] Zusman DR, Scott AE, Yang Z, et al. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):862–872.
- [26] Bellenger K, Ma X, Shi W, et al. A CheW homologue is required for *Myxococcus xanthus* fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis. *J Bacteriol.* 2002;184(20):5654–5660.
- [27] Rumbo-Feal S, Pérez A, Ramelot TA, et al. Contribution of the *A. baumannii* AIS\_0114 gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:108.
- [28] Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* 2006;188(10):3697–3708.
- [29] Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, et al. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio.* 2013;4(4). DOI:10.1128/mBio.00360-13

**Supplementary Table 1.** Oligonucleotides used in this work.

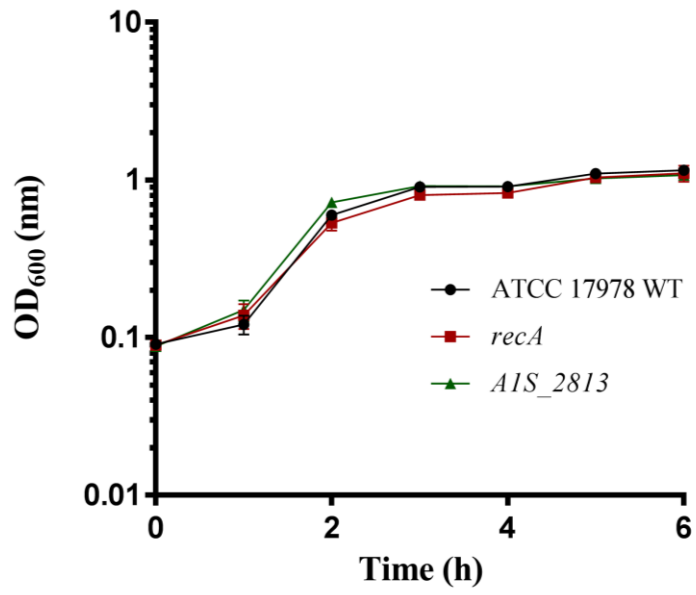
Name	Sequence (5' to 3')	Application
A1S_2813IntFw	GATTGGCAAACATTC	Mutant construction
A1S_2813IntRv	CACATACTGGTCATGATG	Mutant construction
RecAComplFw	CAGTCTCGAGATGGATGAGAATAAAAAGC	Complementation
RecAComplRv	CAGTCCATGGTTACGATTCTAATAAAAAGATC	Complementation
A1S_2813ComplFw	CAGTCTCGAGATGGCAGCGAATGGATTATCG	Complementation and mutant verification
A1S_2813ComplRv	CAGTCCATGGTTAGTTTATAAAATTTGTGCGA	Complementation and mutant verification
RecAFLAGFw	GGAAATCCATATGGATGAGAATAAAAAGC	Cloning tagged-protein in pUA1108
RecAFLAGRv	CGGGATCCTTATTGTCGTCGTCGTCCTTTGTAGTC <sub>gc</sub> cgccgccCGATTCTAATAAAAAGATC	Cloning tagged-protein in pUA1108
A1S_2813HisFw	GGAAATCCATATGAGAGGGCAATACTTC	Cloning tagged-protein in pUA1108
A1S_2813HisRv	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATG <sub>gccgccgccG</sub> TTTATAAAATTTGTGCGA	Cloning tagged-protein in pUA1108
A1S_2813S97AFw	TTCATTTTCGGCTACCCAAAAAG	A1S_2813#S97A mutant derivate construction
A1S_2813S97ARv	CTCCGCTGCCCTGAAATA	A1S_2813#S97A mutant derivate construction
A1S_2813I121AFw	GGTTTTGGGGCTCAGCACTTAATAAAAAAAG	A1S_2813#I121A mutant derivate construction
A1S_2813I121ARv	TGATCCACAACCAACCCC	A1S_2813#I121A mutant derivate construction
-108pUA1108	CCGACATCATAACGGTTC	Sequencing primer for pUA1108 vector
+128pUA1108	AGACAAGCTGTGACCGTC	Sequencing primer for pUA1108 vector
M13FpUC	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO and pVRL1 vectors
M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO and pVRL1 vectors

Restriction endonuclease sites are underlined, FLAG and 6×His tags are indicated in bold and Gly spacers in lower case.

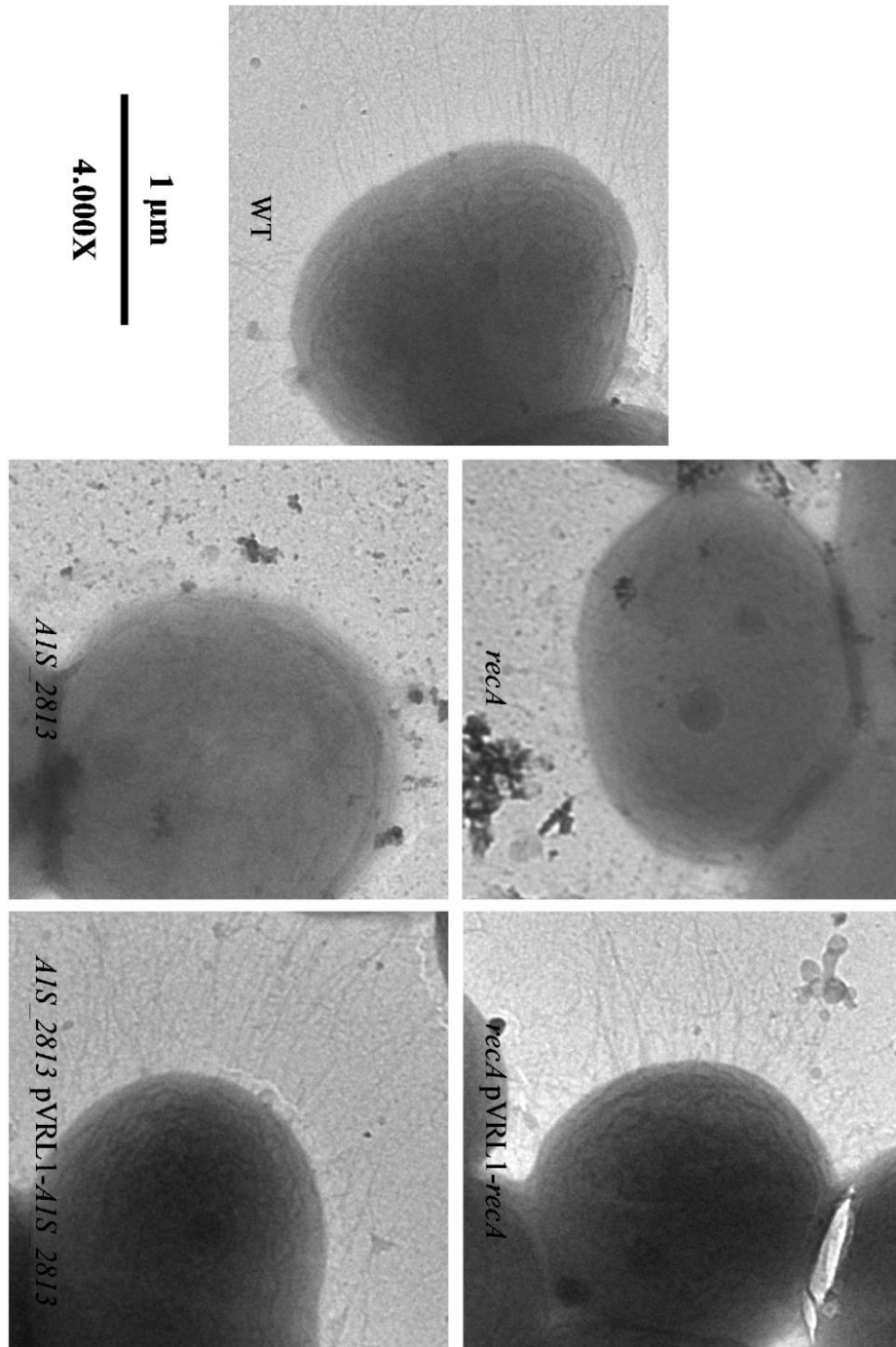


SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

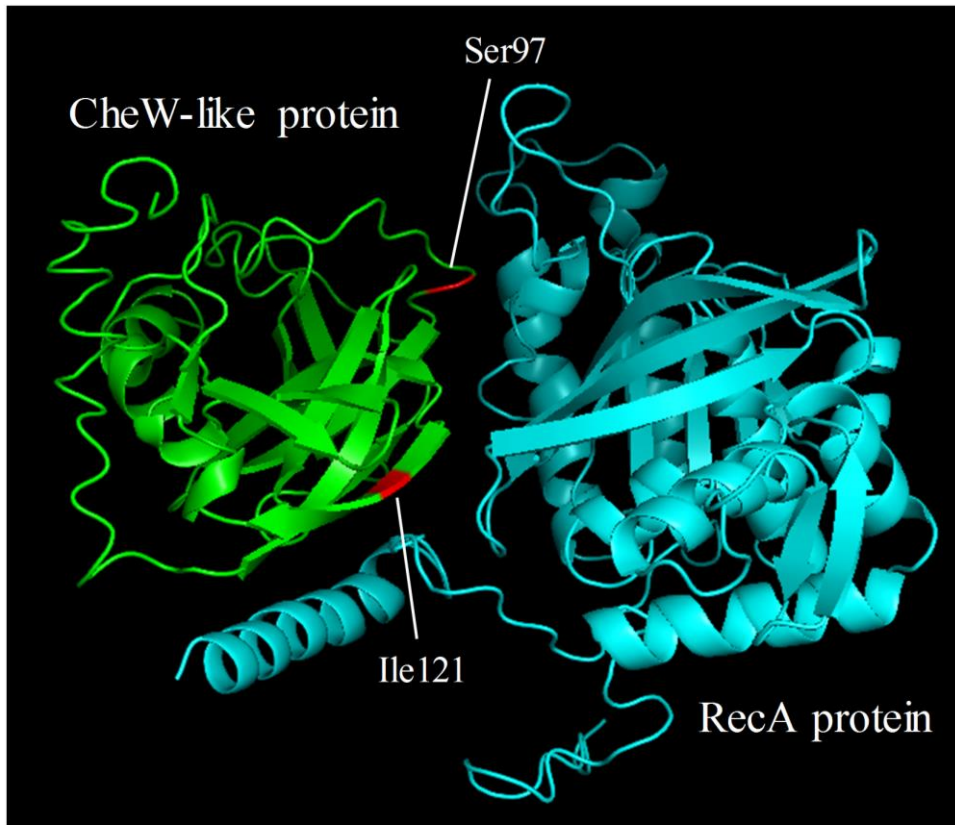
**Figure S1.** Growth curves of the indicated *A. baumannii* strains.



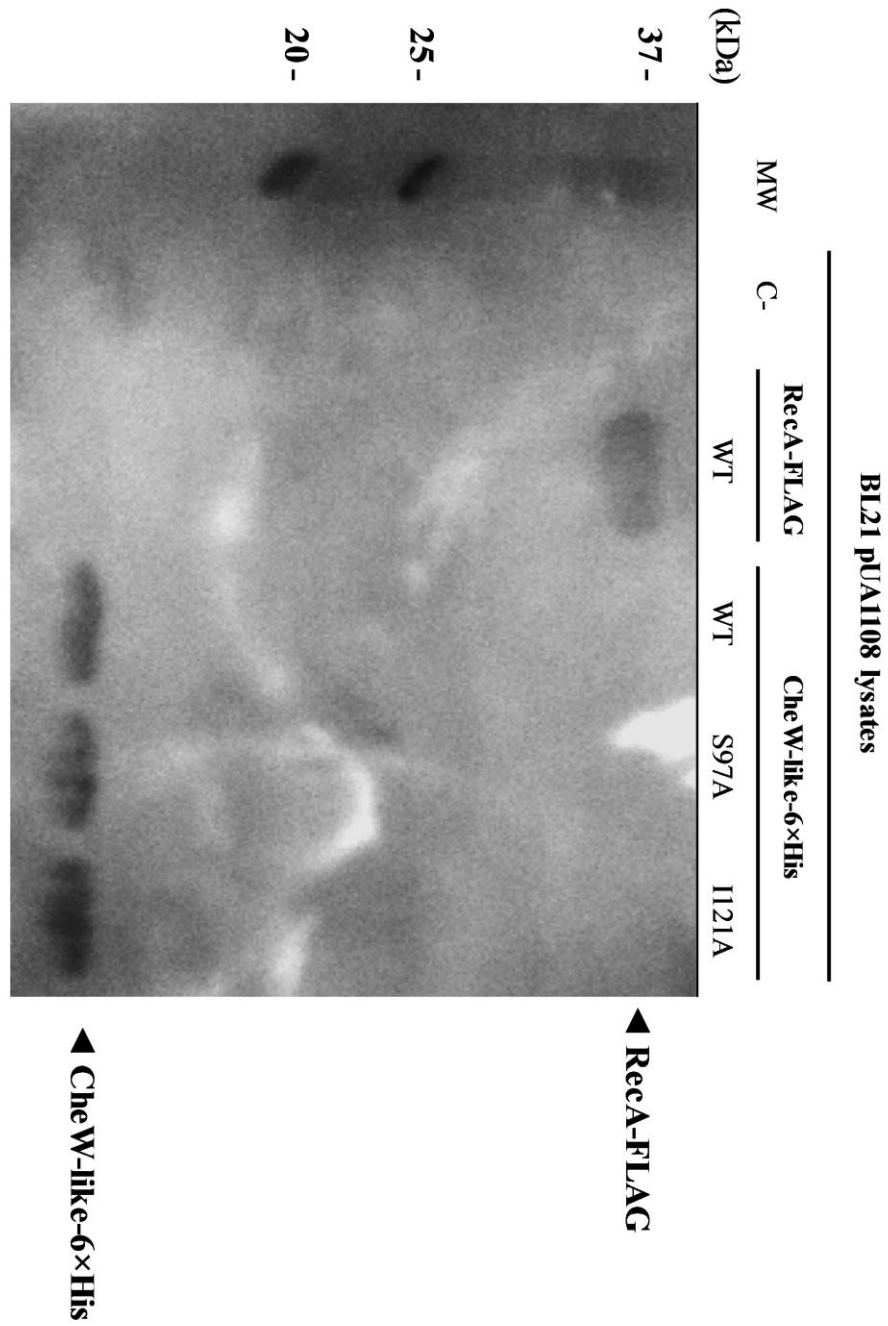
**Figure S2.** Transmission electron microscopy of the indicated *A. baumannii* strains obtained as described above but without the use of glutaraldehyde. The images were obtained at 4,000 × magnification.



**Figure S3.** *In silico* model for the interaction of the *A. baumannii* RecA and CheW-like protein analyzed using PyMOL software as previously described<sup>13</sup>.



**Figure S4.** Western blot of the indicated lysates using the appropriate antibodies.  
 C-: negative control. M: molecular mass marker.



### **3.2. Papel de los movimientos *twitching* y *swimming* en la patogenicidad de *R. solanacearum***

#### **Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity**

Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbe J, Aranda J, Valls M

mSphere 5(2). 2020

Con el objetivo de identificar en *R. solanacearum* genes homólogos al sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV, se realizó un análisis de elementos ortólogos a partir del conjunto de proteínas codificadas en el genoma de la cepa GMI1000. Este análisis puso de manifiesto que las proteínas del sistema quimiotáctico PilI y ChpA de *R. solanacearum* son homólogos a componentes vinculados a la regulación del pili de tipo IV en *P. aeruginosa* y, a su vez, análogos a las proteínas CheW y CheA del sistema quimiotáctico flagelar, respectivamente. Además, estos elementos se localizaron codificados en una región del genoma, formando una única unidad transcripcional que incluye los genes *RSc0668 (pilG)*, *RSc0669 (pilH)*, *RSc0670 (pilI)*, *RSc0671 (pilJ)* y *RSc0672 (chpA)*.

Para determinar el papel de estos componentes en la motilidad de *R. solanacearum*, se obtuvieron mutantes deficientes en los genes *pilI* y *chpA*, así como en los genes que codifican las subunidades principales de pilina (*pilA*) y flagelina (*fliC*) que forman parte del pili de tipo IV y flagelo, respectivamente. Los ensayos de *twitching* realizados mostraron que los mutantes *pilI* y *pilA* pierden completamente su capacidad de llevar a cabo este tipo movimiento, mientras que en el mutante *chpA* disminuye parcialmente. Por otro lado, en los ensayos de *swimming* realizados se observó que solo el mutante *fliC* presenta una disminución de su capacidad para desplazarse mediante este tipo de movimiento. Sin embargo, se determinó que el mutante *pilA* muestra un aumento en su capacidad para desplazarse por *swimming* comparado con la cepa salvaje, sin mostrar ninguna alteración en su capacidad de realizar quimiotaxis.

Tras evaluar la implicación de estas proteínas en los movimientos *twitching* y *swimming*, se realizó una caracterización fenotípica de las distintas cepas mutantes. Los resultados obtenidos en los distintos ensayos mostraron que los mutantes *pilI* y *chpA* sufren una disminución en su capacidad para incorporar DNA mediante transformación natural y, en el caso del mutante *pilA*, una abolición completa. En lo referente a la formación de biofilm se observó que, mientras los mutantes *pilI*, *chpA* y *pilA* presentan una disminución, el mutante *pilI* experimenta un aumento en su capacidad. Por último,

todos los mutantes mostraron exhibir una disminución en su capacidad para adherirse a raíces de tomatara.

Finalmente, para evaluar el efecto de estas proteínas en la virulencia de *R. solanacearum*, se realizaron tres ensayos distintos utilizando plantas de tomate como modelo de infección. El primer ensayo, realizado sobre hojas de tomatara, puso de manifiesto que los mutantes analizados no sufren disminución alguna de su tasa de crecimiento. Este hecho demostró que cualquier alteración en su capacidad patogénica que pudiera observarse en los ensayos posteriores no era atribuible a una alteración en su capacidad de proliferación a causa de las mutaciones introducidas.

El segundo ensayo, realizado mediante la inoculación directa de la bacteria en el xilema de la planta con la finalidad de determinar el efecto patogénico de los mutantes ya dentro del hospedador, mostró que solo el mutante *pilA* sufre una disminución en su capacidad de provocar marchitez en plantas.

Por último, en el tercer ensayo con plantas se utilizó el riego como vía para la inoculación de la bacteria, permitiendo determinar el potencial patogénico de los mutantes desde el inicio de su etapa infectiva. Los resultados obtenidos revelaron que todos los mutantes sufren una disminución en su capacidad de producir marchitez en tomatara; siendo *pilA* el mutante que presenta una mayor reducción en su capacidad patogénica, seguido conjuntamente por los mutantes *pilI* y *chpA* y, en último lugar, por el mutante *fliC*.

Este conjunto de resultados indica que las proteínas PilI y ChpA, homólogas a componentes del sistema de quimiotaxis asociado a pili de tipo IV de *P. aeruginosa*, son imprescindibles no solo para el óptimo desplazamiento por *twitching*, sino también para la patogénesis de *R. solanacearum* al inicio de su etapa infectiva, así como para otros procesos relacionados con la virulencia bacteriana, como la transformación natural y la formación de biofilm.

Finalmente, este trabajo aporta evidencias de la existencia en *R. solanacearum* de una interrelación entre ambos tipos de movimientos (*twitching* y *swimming*) en la que se encuentra implicada PilA. También se ha puesto de manifiesto la participación de FliC, subunidad formadora del filamento flagelar, en la adhesión a raíces y en la capacidad de formar biofilm.



## Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity

Jordi Corral,<sup>a</sup> Pau Sebastià,<sup>b</sup> Núria S. Coll,<sup>b</sup> Jordi Barbé,<sup>a</sup> Jesús Aranda,<sup>a</sup> Marc Valls<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Catalonia, Spain

<sup>b</sup>Centre for Research in Agricultural Genomics (CSIC-IRTA-UAB-UB), Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Catalonia, Spain

<sup>c</sup>Genetics Section, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

Jesús Aranda and Marc Valls contributed equally to this article as senior authors. Author order was determined on the basis of seniority.

**ABSTRACT** *Ralstonia solanacearum* is a bacterial plant pathogen causing important economic losses worldwide. In addition to the polar flagella responsible for swimming motility, this pathogen produces type IV pili (TFP) that govern twitching motility, a flagellum-independent movement on solid surfaces. The implication of chemotaxis in plant colonization, through the control flagellar rotation by the proteins CheW and CheA, has been previously reported in *R. solanacearum*. In this work, we have identified in this bacterium homologues of the *Pseudomonas aeruginosa* *pill* and *chpA* genes, suggested to play roles in TFP-associated motility analogous to those played by the *cheW* and *cheA* genes, respectively. We demonstrate that *R. solanacearum* strains with a deletion of the *pill* or the *chpA* coding region show normal swimming and chemotaxis but altered biofilm formation and reduced twitching motility, transformation efficiency, and root attachment. Furthermore, these mutants displayed wild-type growth *in planta* and impaired virulence on tomato plants after soil-drench inoculations but not when directly applied to the xylem. Comparison with deletion mutants for *pilA* and *fliC*—encoding the major pilin and flagellin subunits, respectively—showed that both twitching and swimming are required for plant colonization and full virulence. This work proves for the first time the functionality of a pilus-mediated pathway encoded by *pil-chp* genes in *R. solanacearum*, demonstrating that *pill* and *chpA* genes are bona fide motility regulators controlling twitching motility and its three related phenotypes: virulence, natural transformation, and biofilm formation.

**IMPORTANCE** Twitching and swimming are two bacterial movements governed by pili and flagella. The present work identifies for the first time in the Gram-negative plant pathogen *Ralstonia solanacearum* a pilus-mediated chemotaxis pathway analogous to that governing flagellum-mediated chemotaxis. We show that regulatory genes in this pathway control all of the phenotypes related to pili, including twitching motility, natural transformation, and biofilm formation, and are also directly implicated in virulence, mainly during the first steps of the plant infection. Our results show that pili have a higher impact than flagella on the interaction of *R. solanacearum* with tomato plants and reveal new types of cross-talk between the swimming and twitching motility phenotypes: enhanced swimming in bacteria lacking pili and a role for the flagellum in root attachment.

**KEYWORDS** *Ralstonia solanacearum*, *pill*, *chpA*, *pilA*, *fliC*

*Ralstonia solanacearum* is a soilborne Gram-negative bacterium that causes a plant disease known as bacterial wilt mainly in tropical and subtropical climates (1). *R. solanacearum* exhibits an unusually broad host range comprising more than 200 plant

**Citation** Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M. 2020. Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity. *mSphere* 5: e00740-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00740-19>.

**Editor** Grant R. Bowman, University of Wyoming

**Copyright** © 2020 Corral et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Marc Valls, [marcvalls@ub.edu](mailto:marcvalls@ub.edu).

**Received** 14 October 2019

**Accepted** 19 February 2020

**Published** 4 March 2020

species from over 50 families, including potato, tomato, tobacco, peanut, and banana, among other crops (2). These facts have contributed to the ranking of *R. solanacearum* as among of the most destructive plant-pathogenic bacterial species worldwide (3).

Plant colonization begins with the attachment of *R. solanacearum* on roots and entry into the host plant through wounds, at sites of secondary root emergence or elongation (4). The bacterium subsequently colonizes the root cortex and moves to the xylem, where it spreads systematically, grows extensively, and produces large amounts of exopolysaccharides (EPS) that cause vascular obstruction. This blockage results in wilting of the stem and leaves and, eventually, plant death (1).

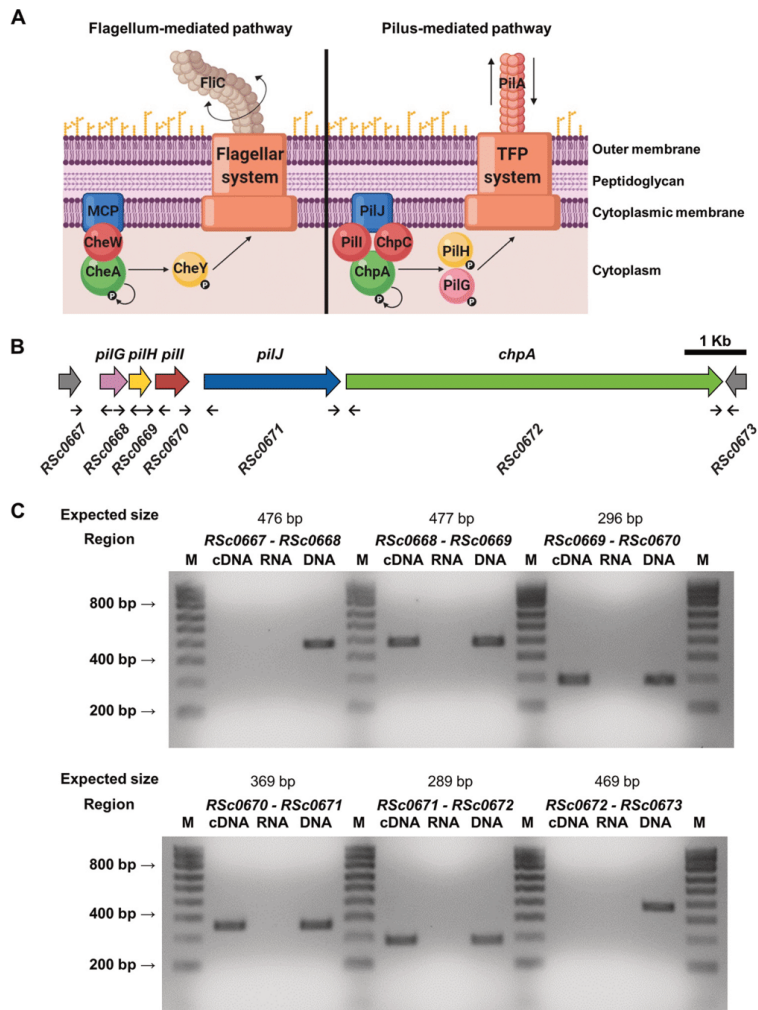
In order to reach different plant tissues and get inside the vascular system, *R. solanacearum* uses different types of movement strategies. The first is swimming motility, an individual cell movement powered by rotating flagella and produced in aqueous environments. In *R. solanacearum*, this kind of motility is mediated by one to four polar flagella and mutants lacking either FlhC (the flagellar subunit protein) or FlhM (the flagellar motor switch protein) are nonmotile and present a reduction of virulence in tomato after soil-soak inoculation (5). Chemotaxis enables bacterial cells to sense specific chemicals and depends on the presence of several proteins, which ultimately interact with the flagellar motor to move toward more-favorable conditions. This complex behavior begins in cell membrane-associated receptors, called MCPs (methyl-accepting chemotaxis proteins), which detect environmental stimuli and respond to them by changing their conformation. These changes trigger autophosphorylation of the cytoplasmic histidine autokinase CheA, which forms a complex with the receptor through the coupling protein CheW (Fig. 1A). CheA transfers its phosphate group to CheY, a diffusible cytoplasmic response regulator that interacts with the flagellar motor to switch its direction of rotation. Both *R. solanacearum* *cheA* and *cheW* null mutants are motile but nonchemotactic, and their virulence is as low as that of a completely nonmotile *flhC* knockout mutant (6).

The other movement used by *R. solanacearum* is twitching motility, a coordinated multicellular movement driven by the extension, attachment, and retraction of the type IV pilus (TFP) appendages in solid surfaces or viscous media. In Gram-negative bacteria, the TFP system requires at least 35 *pil* genes for the synthesis, display, and function of polar and retractable TFP (7). *R. solanacearum* also possesses TFP-mediated motility, which plays a role in natural transformation, biofilm formation, and virulence (8). The genes *pilA*, *pilQ*, and *pilT*, whose products are a monomer of the major pilin protein, the secretin involved in the pilus extrusion, and the protein required for pilus retraction, respectively, have been identified in *R. solanacearum*, and inactivation of any of them reduces both twitching motility and virulence (8, 9). In addition, the *pilA* mutant was reduced in virulence on tomato plants, in attachment to roots, and in biofilm formation as well as being not naturally competent for transformation (8).

In the Gram-negative nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, which bears both flagella and pili, a hypothetical pilus-mediated chemotaxis pathway encoded by the *pil-chp* genes in so-called cluster IV has been proposed to exist based on homology to the flagellar chemotaxis system (10, 11). In a manner analogous to that seen with flagellum-mediated chemotaxis, in this pathway the molecular signal generated by the cell membrane-associated receptor (PilJ) is expected to trigger autophosphorylation of the cytoplasmic CheA-like histidine autokinase called ChpA, which may form a complex with two CheW homologues called Pill and ChpC (Fig. 1A). The control of movement of pili in this hypothetical system in *P. aeruginosa* is likely performed by two CheY homologues (PilG and PilH), which would interact with the putative TFP motor to control twitching motility after their phosphorylation by ChpA (10, 11).

In this report, we describe a new gene cluster in *R. solanacearum* with strong similarities to *P. aeruginosa* cluster IV, including genes encoding Pill and ChpA homologues. We have constructed *pill* and *chpA* knockout mutants and mutants in well-described twitching (*pilA*) and swimming (*flhC*) motility genes in *R. solanacearum* and have studied the role of these genes in *R. solanacearum* motility and plant colonization





**FIG 1** Characterization of the *pil-chp* operon. (A) Representation of flagellin-dependent (left) and pilus-dependent (right) pathways based on protein homology data from Sampedro et al. (11). (B) Schematic diagram of the *pil-chp* operon gene cluster in the *R. solanacearum* GMI1000 genome. Small arrows represent the oligonucleotides used in the RT-PCR. Spacings between protein-coding sequences in the *pil-chp* operon are as follows: *pilG-pilH* 31 bp, *pilH-pilI* 58 bp, *pilI-pilJ* 245 bp, *pilJ-chpA* 79 bp. (C) RT-PCRs of the indicated *pil-chp* intergenic regions. Each primer pair (Table S1) was used to prepare a PCR mixture with cDNA, RNA, or DNA from the GMI1000 strain as a template. V Ladder NzyTech was used as the DNA marker (M).

and in other related processes such as chemotaxis, biofilm formation, and natural transformation.

**RESULTS**

**Analysis of the *R. solanacearum* GMI1000 genome reveals the presence of single *pilI* (CheW-like) and *chpA* (CheA-like) orthologues clustered in a *pil-chp* operon.** Orthologous analysis revealed that both TFP-associated protein domains, the CheW-like and CheA-like domains, were found in two genes located in a putative

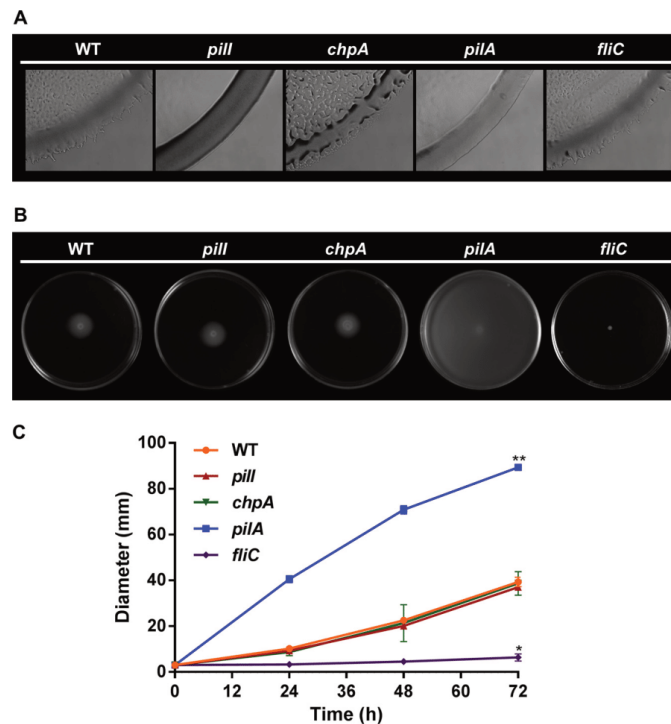
operon in the GMI1000 genome sequence, which includes in total five *pil-chp* homologues: *R. solanacearum* *RSc0668* (*pilG*), *RSc0669* (*pilH*), *RSc0670* (*pilI*), *RSc0671* (*pilJ*), and *RSc0672* (*chpA*) (Fig. 1B). This cluster is syntenic to that previously described in *P. aeruginosa*, except that it lacks the *chpB* and *chpC* genes downstream of *chpA*. CheW-like and CheA-like domains were found in the *pilI* and *chpA* genes, respectively, whereas no other CheW-like homologues—such as the mentioned orthologue of *P. aeruginosa* *chpC*—were found in the *R. solanacearum* GMI1000 genome. Compared to its *P. aeruginosa* counterpart (PAO1 protein WP\_003084590), the *R. solanacearum* *PilI* homologue presents an identity level of 68%, with fragment coverage of 31%, whereas the *R. solanacearum* *ChpA* homologue shows an identity level of 39.73% with 33.33% coverage with respect to the *P. aeruginosa* *ChpA* (WP\_003114893) protein. To determine whether the five *pil-chp* genes are part of the same transcriptional unit, reverse transcription-PCRs (RT-PCRs) were performed (Fig. 1C). The resulting bands confirmed that the *pil-chp* gene cluster is transcribed as a single polycistronic unit, transcriptionally independent of the surrounding *RSc0667* and *RSc0673* genes (Fig. 1C), predicted to encode a rubredoxin protein and a hypothetical protein, respectively.

**The *R. solanacearum* *PilI* and *ChpA* proteins are involved in twitching but not in swimming motility or chemotaxis.** To determine the role of *pilI* and *chpA* in *R. solanacearum* motility and chemotaxis, we created null mutants by replacing their protein-coding sequences with a kanamycin cassette. Strains with an inactivated *pilA*, *fliC*, or *cheA* gene were also constructed to be used as controls: the *pilA* mutant was described previously as impaired in twitching (8), the *fliC* mutant as deficient in swimming (5), and the *cheA* mutant as nonchemotactic (6). All mutants obtained were confirmed by PCR (see Fig. S1 in the supplemental material) and subsequent sequencing (Macrogen) using specific primers (see Table S1 in the supplemental material). Furthermore, none of the constructed knockout mutants exhibited macroscopic changes in colonial shape, EPS production (Fig. S2), or growth rate *in vitro* (Fig. S3).

After growth in the appropriate solid medium, colonies of the wild-type (WT) *R. solanacearum* GMI1000 strain exhibited a normal twitching phenotype characterized by irregular colony edges with multiple projections easily observed under light microscopy (Fig. 2A). In contrast, the *pilI* mutant presented round-shaped colony margins without projections, a phenotype identical to that of the nontwitching motility control *pilA* mutant (Fig. 2A). The *chpA* mutant strain also showed impaired twitching movement, but unlike the *pilI* and *pilA* mutants, the reduced twitching motility in the *chpA* mutant was characterized by smaller projections in the colony margins, indicating some residual movement (Fig. 2A). As expected, the *fliC* flagellum mutant control strain presented a twitching phenotype similar to that of the WT GMI1000 strain (Fig. 2A). It is worth noting that the complementation of the *pilI* mutant restored twitching motility, discarding polar effects on downstream genes caused by the *pilI* disruption or by secondary mutations (Fig. S4A).

It was reported previously that inactivation of TFP genes might modify the motility controlled by flagella and vice versa (12–14). Thus, we analyzed the swimming capacity in *pilI* and *chpA* mutants, including again as controls the *pilA* and the *fliC* knockouts, known to be affected only in twitching and swimming motility, respectively (5, 8). After growth in the appropriate semisolid medium, the *pilI* and *chpA* mutants exhibited a typical swimming halo around the inoculated area, similar to that of the WT strain, whereas the *fliC* control mutant was completely impaired in this type of motility, as expected (Fig. 2B). Surprisingly, the *pilA* mutant strain displayed an increased swimming halo compared to that of the WT parental strain (Fig. 2B). Bacterial swimming was more accurately quantified by measuring the dispersion halo at 72 h (Fig. 2C). Significant ( $P < 0.05$ ) differences—more remarkable over time—between the *pilA* mutant and the rest of strains (the WT strain and the *pilI* and *chpA* mutants) showing a normal swimming phenotype were recorded (Fig. 2C). As previously described, the *fliC* control strain showed a significantly reduced swimming halo (Fig. 2C).

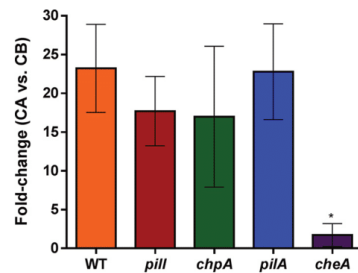
In order to determine whether these motility patterns affected bacterial chemotaxis, capillarity assays were performed using Casamino Acids as a chemoattractant (6). Since



**FIG 2** Motility assays. (A) Representative optical microscope images ( $\times 100$  magnification) of three independent twitching motility assays. (B) Representative images of three independent swimming motility assays. (C) Representation of the swimming halo diameters measured in three independent assays with three replicates each. Error bars represent standard deviations of the means, and significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain are represented as single or double asterisks for a bacterial halo of smaller or larger diameter, respectively.

the *fliC* mutant lacked swimming motility, a *cheA* mutant strain—whose chemotactic response was abolished (6)—was constructed and included in the assays as a more appropriate control. In the parental strain and TFP-related mutants, an approximately 20-fold increase in bacterial counts was observed in capillaries filled with Casamino Acids relative to those containing only chemotaxis buffer (Fig. 3). Thus, with the exception of the motile but nonchemotactic *cheA* knockout, no significant differences in chemotaxis were observed in any TFP-related knockout compared to the WT strain (Fig. 3).

**The *R. solanacearum* *pill* and *chpA* mutants present reduced natural transformation abilities.** The TFP are essential for bacteria to carry out natural transformation (8). Thus, in order to examine their natural transformation abilities, the WT strain and the corresponding *pill*, *chpA*, *pilA*, and *fliC* knockout mutant counterparts were exposed to DNA containing a gentamicin cassette flanked by  $\sim 1$ -kb-long sequences homologous to a noncoding region of the *R. solanacearum* genome (15) and the frequencies of recovery of gentamicin-resistant colonies were calculated. The results obtained showed that the transformation frequencies of the *pill* and *chpA* mutants were reduced by approximately 20-fold and 6-fold, respectively, compared to the WT strain (Table 1). As expected, the *pilA* mutant, which lacks TFP, was totally unable to take up DNA naturally (8), whereas the *fliC* mutant was transformed with a level of efficiency comparable to that of the WT strain (Table 1).



**FIG 3** Chemotaxis capillary assays. Data represent fold change (CFU) between viable bacteria counted in capillaries containing chemoattractant CA (Casamino Acids) divided by the CFU counted in control capillary CB (chemotaxis buffer). Error bars represent standard deviations of the means of results from five replicates per strain, and the asterisk denotes a significant ( $P < 0.05$ ) difference from the *R. solanacearum* WT strain. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown.

**TFP- and flagellin-associated genes are involved in biofilm formation and attachment of *R. solanacearum* to plant roots.** Alongside roles in motility, TFP and flagella are required for biofilm formation and initial bacterial adsorption to plant roots (16). We thus measured the capacity of our bacterial mutants to produce biofilm in polystyrene microplate cultures. The *pilA* control mutant was previously shown to produce less-developed biofilms than a WT strain (8), which was quantified here as a significant ( $P < 0.05$ ) reduction (~70%) in biofilm formation. The *chpA* and *fliC* mutants also displayed comparable ~70% reductions in their ability to produce biofilm compared to the GM11000 strain (Fig. 4A). Interestingly, the *pill* mutant, which exhibited an abolishment of twitching motility similar to that shown by the nonmotile *pilA* mutant, presented a significant ( $P < 0.05$ ) increase of ~25% in biofilm formation with respect to the WT parental strain (Fig. 4A). Furthermore, the complemented *pill* mutant showed a restored ability to produce biofilm (Fig. 54B).

Next, we incubated each bacterial strain with isolated tomato roots and quantified their capacity to attach to the root surface. The results of these experiments showed that all TFP mutants (*pill*, *chpA*, and *pilA*) presented a statistically significant ( $P < 0.05$ ) 10-fold-lower level of root attachment than the WT GM11000 strain (Fig. 4B). Furthermore, the aflagellated *fliC* mutant also displayed a statistically significant ( $P < 0.05$ ) 5-fold decrease compared with the WT strain (Fig. 4B), denoting that both TFP and flagella promote adhesion between *R. solanacearum* cells and tomato roots.

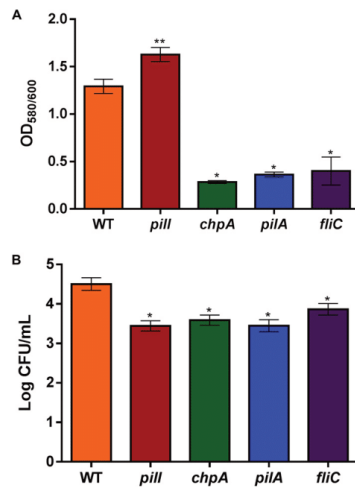
**The *pill* and *chpA* mutants show reduced virulence in soil-soak inoculations but not when directly inoculated in the stem of tomato plants.** To determine the effect of *Pill* and *ChpA* on *R. solanacearum* pathogenicity, tomato plants were infected by drenching the soil with the collected bacterial solution without wounding the roots, which mimics the natural infection process of this soilborne pathogen. The four mutants analyzed (*pill*, *chpA*, *pilA*, and *fliC*) exhibited a significant ( $P < 0.05$ ) reduction in their ability to develop plant wilting compared to the parental WT strain, but to

**TABLE 1** Natural transformation frequencies of the indicated *R. solanacearum* strains<sup>a</sup>

Strain	Natural transformation frequency <sup>b</sup>
GM11000 WT	$1.05 (\pm 1.2) \times 10^{-6}$
<i>pill</i>	$5.07 (\pm 4.9) \times 10^{-8}$
<i>chpA</i>	$1.78 (\pm 1.5) \times 10^{-7}$
<i>pilA</i>	$< 2.57 \times 10^{-9}$
<i>fliC</i>	$1.66 (\pm 2.1) \times 10^{-6}$

<sup>a</sup>Each experiment was carried out in triplicate in five independent assays.

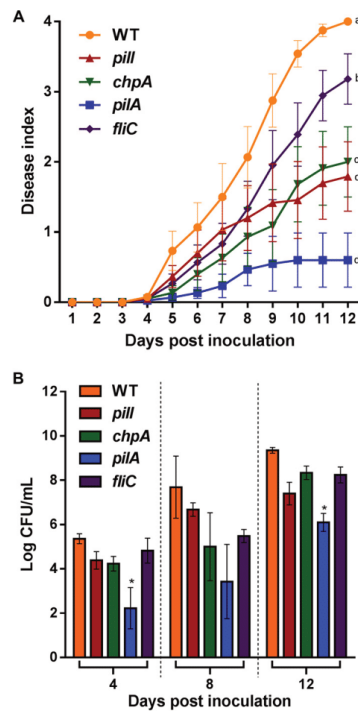
<sup>b</sup>Natural transformation frequency data are represented as means  $\pm$  standard deviations and were calculated as the number of recombinant colonies by the total number of viable cells. At least 10% of the recombinant colonies obtained for each strain were confirmed by sequencing.



**FIG 4** Biofilm and root attachment quantification. (A) Biofilm assay in which y-axis data represent biofilm absorbance (OD<sub>580</sub>) divided by the biomass (OD<sub>600</sub>). The error bars represent standard deviations of the means of results from 16 replicates per strain. Significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain are represented as single or double asterisks for lower or higher absorbance ratio values, respectively. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown. (B) Representative root attachment assay showing means of logarithms of counts of viable bacteria (CFU). Error bars represent standard errors of the means of data from five 1-week-old tomato roots per assay, and asterisks denote significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown.

differing degrees (Fig. 5A). Statistical analysis classified the mutants into four groups: the *pilA* deletion mutant was the least virulent, followed by the *pill* and *chpA* mutants, with both showing an intermediate phenotype, and the *flhC* mutant, with a small but significant decrease in apparent wilting compared to the WT parental strain (Fig. 5A). Bacterial counts obtained from 3-cm stem cuts from tomato plants infected using the same procedure were also carried out at 4, 8, and 12 dpi (days postinoculation). Only the *pilA* mutant exhibited a significant (2 log) reduction at days 4 and 12 ( $P < 0.05$ ) with respect to the rest of strains, whose numbers in stem tissues were similar to those seen with the WT strain (Fig. 5B). To discard any potential fitness effects resulting from the growth of the knockout strains in tomato plants, all strains were infiltrated in tomato leaves. The results showed no differences in bacterial growth of any of the mutants with respect to the WT (Fig. 5S). In contrast, when tomato plants were infected by direct petiole injection, *pill* and *chpA* knockout strains showed no statistically significant reduction in their capacity to wilt plants (Fig. 6A), while the control *pilA* mutant exhibited significant ( $P < 0.05$ ) differences in disease index in comparison to the WT, as previously described (8). Finally, the virulence of the flagellum-deficient *flhC* mutant was also comparable to that of the WT strain (Fig. 6A). Bacterial counts measured over time in infected plant stems were similar to those reached by the WT strain for all mutants except for the *pilA* mutant, which presented a significant ( $P < 0.05$ ) reduction in plant colonization (Fig. 6B). Interestingly, the *flhC* mutant exhibited a reduction in stem numbers only at 3 dpi, reaching values similar to those shown in the *pill* and *chpA* mutants and the WT strains at later infection times (Fig. 6B).

**Deletion of *pilA* but not *pill*, *chpA*, and *flhC* limits bacterial spread in plant tissues.** In order to study the distribution of *pill*, *chpA*, *pilA*, and *flhC* *R. solanacearum* knockout mutants along tomato plants, reporter strains were constructed through the insertion into their genome of the *luxCDABE* operon under the control of the *hrpB* promoter (Fig. S6). Tomato plants grown in pots were soil-inoculated with the reporter

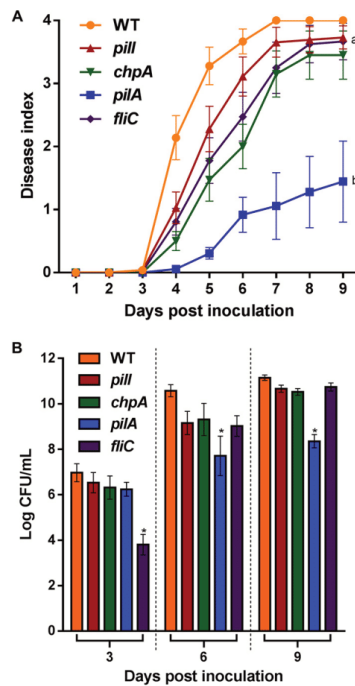


**FIG 5** Drenching assays. (A) Disease index scaled from 0 (no wilt) to 4 (death), with levels measured daily after soil soaking of 4-week-old tomato plants by the use of a naturalistic inoculation method. Error bars represent standard errors of the means of results from 20 replicates per strain. According to their wilting reduction ( $P < 0.05$ ), strains are classified in four groups (labeled a through d). The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown. (B) Logarithm of counts of viable bacteria (CFU per milliliter) after soil soaking of 4-week-old tomato plants by the use of a naturalistic soil soak inoculation method at 4, 8, and 12 days postinoculation. Error bars represent standard errors of the means of results from 20 replicates per strain. Asterisks denote significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown.

strains, and luminescence in different stem sections was recorded at 3 and 6 dpi. At 3 dpi, no significant differences were observed between any of the knockouts and the WT strain at any stem height (Fig. 7). However, at 6 dpi, the *pilA* mutant carrying the *luxCDABE* operon exhibited a significant ( $P < 0.05$ ) reduction of its luminescence compared to the WT reporter strain (Fig. 7). No significant differences in colonization between the stem sections from internodes 2 and 3 were observed for any other strain at 6 dpi (Fig. 7). To confirm that expression of the reporter operon was not affected by any of the gene disruptions, bacterial growth and luminescence were both measured over time in *in vitro* cultures (Fig. S7). In these experiments, all mutants showed comparable levels of luminescence and indistinguishable differences in growth from the WT strain, ruling out an inhibition of the reporter in the *PilA* mutant (Fig. S7).

**DISCUSSION**

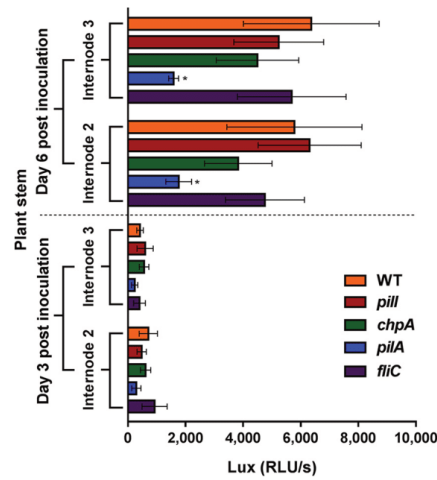
**A conserved cluster involved in twitching motility.** In this study, we identified a new gene cluster in *R. solanacearum* strain GMI1000 (Fig. 1B) presenting synteny with respect to *P. aeruginosa* and *Lysobacter enzymogenes* cluster IV (17–19) and the *Xylella fastidiosa pil-chp* operon (20). With the construction of pilus- and ChpA-deficient strains, we demonstrated the involvement of these genes in *R. solanacearum* twitching but not



**FIG 6** Petiole inoculation assays. (A) Disease index scaled from 0 (no wilt) to 4 (death), measured daily in 4-week-old tomato plants after the use of a direct inoculation method. Error bars represent standard errors of the means of results from 20 replicates per strain. According to statistically significant differences ( $P < 0.05$ ), strains were classified in two groups (labeled a and b). The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown. (B) Logarithms of viable bacteria (CFU per milliliter) of the indicated *R. solanacearum* strains counted by the use of a direct inoculation method using 4-week-old tomato plants at 3, 6, and 9 dpi. Error bars represent standard errors of the means of results from 20 replicates per strain, and asterisks denote significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown.

in swimming (Fig. 2). Whereas the *chpA* mutant presented reduced twitching, *PilA* inactivation produced a total abolition of this movement, comparable to that seen with the non-twitching *pilA* control (Fig. 2A). Decreased twitching motility has been similarly observed in *chpA* (CheA-like) knockout mutants in other bacteria such as *P. aeruginosa* (21) and *X. fastidiosa* (20) and in the *pill* (CheW-like) null mutant of *P. aeruginosa* (22). However, the *pill* knockout remains twitching proficient in *L. enzymogenes* (23), indicating differences in TFP gene function that depend on the bacterial species. In contrast to our results seen in *R. solanacearum* revealing that the *chpA* mutant showed some residual twitching motility, both *pill* and *chpA/pilL* mutants in *Acidovorax citrulli* lacked twitching motility and did not produce TFP (24). However, a *pilJ* mutant in the *A. citrulli pil-chp* operon retained the ability to produce TFP (13).

**TFP influence swimming motility.** Since the inactivation of specific genes associated with one type of appendage may affect the movement controlled by others (12–14, 25), swimming motility assays were also performed with the *R. solanacearum* mutants that had been constructed. Surprisingly, results obtained showed swimming hypermotility performed by the *pilA* mutant (Fig. 2B and C), a phenomenon observed in other *R. solanacearum* knockouts such as those lacking the transcriptional regulators *phcA* (26) and *motN* (27), the latter being chemotaxis proficient like the *R. solanacearum*



**FIG 7** Bacterial spread in plant tissue. Luminescence detection of the indicated *R. solanacearum* strains prepared by the use of a direct inoculation method was performed using 4-week-old tomato plants at 3 and 6 dpi. x-axis data represent means of luminescence (RLU/s) data from 10 replicates per strain. Error bars represent standard errors of the means, and asterisks denote significant ( $P < 0.05$ ) differences from the *R. solanacearum* WT strain. The assay was performed three times. The results of a representative experiment are shown.

*pilA* mutant (Fig. 3). Cross-effects between the two appendage-dependent movements are likely underestimated due to the comparative paucity of studies in which both swimming and twitching assays have been carried out to evaluate the effect of single mutants. One example of this connection is found in the PilS-PilR two-component system of *P. aeruginosa*, which regulates TFP expression and whose inactivation also causes a reduction in swimming motility (25). Similarly, the inactivation of genes encoding PilA, the pilus assembly protein PilO, or two predicted minor pilins, FimU and FimT, caused reduced twitching but complete abolition—or, in the case of the *fimT* mutant, impairment—of swimming in *P. syringae*, suggesting that TFP are involved not only in twitching but also in swimming (14).

***R. solanacearum* Pill and ChpA play a role in all known TFP-related functions.**

As previously reported in *R. solanacearum* studies of the *pilA* mutant, TFP are required for natural transformation and biofilm formation (8). Our results demonstrate that Pill and ChpA also contribute to natural competence (Table 1), presumably through proper regulation of TFP. Regarding biofilm formation, our data showed that Pill and ChpA play contrary roles (Fig. 4A). Interestingly, knockouts lacking either PilA or PilQ in *Xanthomonas* spp. displayed reduced twitching motility, but biofilm formation was affected only in the *pilQ* mutant (28, 29). On the other hand, in the *A. citrulli flhR*-null mutant, whose swimming and twitching movements remained impaired, no effect on biofilm development was observed (12). Besides their roles in natural transformation and biofilm formation, TFP are also key for bacterial virulence (7). In *R. solanacearum*, virulence processes during plant colonization have been investigated in some TFP-related genes such as *pilA* (8) and *pilQ* (30), highlighting the relationship between twitching motility and virulence (31–33). Our data demonstrate that Pill and ChpA proteins are required for early pathogenic stages that result in effective plant colonization and wilting. This is shown by the fact that strains deleted of these genes caused reduced wilting in response to a naturalistic infection method (soil drenching; Fig. 5A) but behaved like the WT when applied directly by petiole inoculation, a procedure that overcomes all initial steps of plant colonization until the bacterium reaches the xylem (Fig. 6A). Similarly, our data corroborate the idea that PilA plays a role in the pathogenesis of *R.*



*solanacearum*, as previously reported (5, 8), because this mutant showed impaired multiplication *in planta* in both root drenching and petiole inoculation experiments (Fig. 5B and 6B) and restricted stem colonization (Fig. 7). Involvement of TFP gene inactivation and virulence has also been described in several bacterial plant pathogens such as *P. syringae* (14), *Xanthomonas* spp. (28, 34), *A. citrulli* (13), and *X. fastidiosa* (20, 35), in which an impairment of twitching motility resulted in the development of a reduced pathogenic phenotype. Remarkably, although all TFP mutants analyzed showed similar phenotypes in biofilm formation, root attachment, and chemotaxis (Fig. 3 and 4), the *pill* and *chpA* deletion mutants showed milder phenotypes than the *pilA* mutant in transformation efficiency and in the various virulence and plant colonization assays performed (Table 1; see also Fig. 5 and 7). This can be explained by the fact that, while PilA is the structural pilus subunit and its mutant is nonpiliated, the Pill and ChpA are regulator proteins in TFP assembly and their deletion mutants may still present some TFP, as indicated by the residual twitching motility displayed by the *chpA* knockout strain (Fig. 2A). In this sense, it is worth mentioning that disruption of the *chpA* homolog gene in *X. fastidiosa* (*pilL*) resulted in a loss of twitching motility but in retention of the ability to produce TFP, resembling the phenotype of the *R. solanacearum chpA* mutant, although in the latter some residual twitching motility was observed, maybe because of differences in the experimental settings.

**Novel roles of flagella in *R. solanacearum* GMI1000.** This work demonstrates that adhesion to roots via TFP is crucial for optimal plant colonization and disease development but also that flagella are involved in these processes (Fig. 4B). Implication of flagella in attachment to both animal and plant cells has been recently reported in bacterial pathogens at the early stage of infection (36–38). Although flagella have not been reported to play a role in attachment of members of the *Xanthomonadaceae* (39), in other bacterial species such as *Azospirillum brasilense*, flagellin-deficient mutants are impaired in attachment to wheat roots, and the purified polar flagellum binds directly to the wheat root surface (40).

In addition, our results shown that *fliC* inactivation produces a reduction in biofilm formation (Fig. 4A), indicating that flagella also contribute to this process in *R. solanacearum* GMI1000, as had been observed in *P. aeruginosa* and other bacteria (41, 42). In contrast, inactivation of either *fliC* or genes involved in aerotaxis—an active cell movement along oxygen gradients—in *R. solanacearum* strain K60 caused increased biofilm production (43), indicating strain-specific TFP functions.

The flagellar protein FliC was previously shown to play a role in pathogenesis of *R. solanacearum*, especially during the first steps of the interaction (5, 8). Here, we also observed that the *fliC* deletion mutant caused reduced wilting only when inoculated by root drenching and not by direct petiole inoculation (Fig. 5A and 6A). However, this flagellum-deficient mutant was affected only slightly in its capacity to multiply *in planta* (Fig. 6B) and colonize the plant stem (Fig. 7), in contrast with the stronger phenotypes shown by the nonpiliated *pilA* strain. We conclude that TFP are more important than flagella for the interaction of *R. solanacearum* with tomato plants.

**Conclusion.** In this work, we have demonstrated that the virulence of *R. solanacearum pill*, *chpA*, *pilA*, and *fliC* deletion mutants is impaired in the first stages of plant colonization and that the *pilA* mutant shows decreased growth after drenching or petiole inoculation. This is the first report on the putative *R. solanacearum* type IV pilus regulators Pill and ChpA, where we clearly demonstrate their role in twitching motility, biofilm formation, natural transformation, and virulence. Additionally, a hypermotile swimming phenotype in GMI1000 strain lacking PilA and the role of FliC in root attachment and biofilm formation have been described here for the first time. Our work suggests that further research in *R. solanacearum* should be addressed to elucidate putative connections between swimming and twitching motilities in both well-documented genes and genes with unknown function.

**TABLE 2** Bacterial strains and plasmids used in this work<sup>a</sup>

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> supE4 $\Delta$ lacU169 (80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Clontech 45
<i>R. solanacearum</i> GMI1000	Wild-type strain (phylotype I, race 1 biovar 3)	This work
<i>R. solanacearum</i> GMI1000 PhB-lux	GMI1000 strain with <i>PhrpB-lux</i> from pRCGent-PhB-lux, Km <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> pill	GMI1000 strain with $\Delta$ pill::loxP-Km from pCM184, Km <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> pill PhB-lux	Pill with <i>PhrpB-lux</i> from pRCGent-PhB-lux, Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> chpA	GMI1000 strain with $\Delta$ chpA::loxP-Km from pCM184, Km <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> chpA PhB-lux	ChpA strain with <i>PhrpB-lux</i> from pRCGent-PhB-lux, Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> pilA	GMI1000 strain with $\Delta$ pilA::loxP-Km from pCM184, Km <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> pilA PhB-lux	PilA strain with <i>PhrpB-lux</i> from pRCGent-PhB-lux, Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> flhC	GMI1000 strain with $\Delta$ flhC::loxP-Km from pCM184, Km <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> flhC PhB-lux	FlhC strain with <i>PhrpB-lux</i> from pRCGent-PhB-lux, Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
<i>R. solanacearum</i> cheA	GMI1000 strain with $\Delta$ cheA::loxP-Km from pCM184, Km <sup>r</sup>	This work
<b>Plasmids</b>		
pCM184	Allelic exchange vector, carrying kanamycin cassette flanked by <i>loxP</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Addgene 15
pGEMT	Cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Promega 15
pRCGent-Pps-GWY	Vector carrying gentamicin cassette flanked by regions homologous to the GMI1000 genome, Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	49
pRCGent-PhB-lux	Vector carrying <i>luxCDABE</i> operon from pMU1 cloned in KpnI–NotI in pRCGent-PhB, Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	Addgene LiveScience
pBT4	Broad-host-range vector carrying the pBBR1 replicon, Tc <sup>r</sup>	
pDSK-GFPuv	Vector carrying the <i>PpsbA</i> promoter, Km <sup>r</sup>	

<sup>a</sup>Km<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>, and Tc<sup>r</sup> stand for resistance to kanamycin, gentamicin, ampicillin, and tetracycline resistance, respectively.

**MATERIALS AND METHODS**

**Bacterial strains, plasmids, plant material, and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 2. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) (44) agar or in LB broth with shaking at 180 rpm. The *R. solanacearum* GMI1000 WT strain and derivative mutants were routinely grown at 28°C in rich B medium, Boucher’s minimal medium (MM) (45), and CPG (Casamino Acids-peptone-glucose) medium (46) agar or broth with shaking at 180 rpm. When necessary, rich B medium was supplemented with 0.5% glucose and 0.005% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (final concentration) in agar plates, and MM broth was supplemented with 2% glycerol or 20 mM glutamate (final concentration). When needed, ampicillin (50 mg/liter), kanamycin (50 mg/liter), gentamicin (10 mg/liter), or tetracycline (5 mg/liter) was added in growth media. For phytopathogenesis assays, tomato plants (*Solanum lycopersicum* cultivar Marmande) were used to evaluate virulence of *R. solanacearum*. Plants were routinely grown in pots in a mixed soil of Substrate 2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany), perlite, and vermiculite at a proportion of 30:1:1 for 1 to 4 weeks at 22°C and 60% relative humidity under long-day light regimen conditions (16 h light and 8 h darkness). Before the infectious assays, tomato plants were acclimated at least 3 days by transferring them to a growth chamber at 27°C under the same humidity and photoperiod conditions.

**RNA extraction and RT-PCR.** Total RNA was extracted by the use of an RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) from 5-ml cultures at an absorbance level of 0.4 (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>]) that had previously been pelleted and treated with lysozyme (50 mg/ml) and resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer for 10 min at 37°C. Once extracted, the RNA was incubated with DNase Turbo Ambion (Thermo Fisher, Waltham, MA) to remove DNA contaminants, and PCR analysis of the mixtures performed using RNA samples without reverse transcriptase confirmed the absence. Reverse transcription of RNA was performed through the use of a first-strand cDNA synthesis kit (Nzytech, Lisbon, Portugal) and the appropriate primers (listed in Table S1 in the supplemental material). All molecular techniques were performed using standard procedures.

**Gene identification and construction of *R. solanacearum* knockouts and of complemented and reporter strains.** The *P. aeruginosa* Pill and ChpA homologues in *R. solanacearum* were identified through mapping coded proteins to nonsupervised orthologous groups (NOGs) using the eggNOG v4.0 Web service (47) and complete *R. solanacearum* GMI1000 chromosome (NC\_003295.1) and megaplasmid (NC\_003296.1) sequences. Knockout deletion mutants *pill* (WP\_011000625), *chpA* (WP\_011000627), *pilA* (WP\_011000517), *flhC* (WP\_011003694), and *cheA* (WP\_011004658) were generated by replacing the coding sequence of each target gene by a kanamycin resistance cassette as described previously (48). To this end, DNA fragments corresponding to ~1 kb of the upstream and downstream flanking regions of each gene and a kanamycin cassette flanked with *loxP* regions were PCR amplified from the *R. solanacearum* GMI1000 genome and plasmid pCM184 (Addgene), respectively. The oligonucleotides used (Table S1) included overlapping regions enabling the three fragments to be fused in two amplification rounds. All PCRs were performed using proofreading Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher). Next, 3’ A overhangs were added to the final PCR products using *Taq* polymerase (Invitrogen, Waltham, MA) and the fragments were cloned into pGEM-T plasmid (Promega, Madison, Wisconsin), transformed in *E. coli* DH5 $\alpha$ , and selected in ampicillin- and kanamycin-containing LB plates.

Sequenced constructs (Macrogen, Seoul, South Korea) were amplified with appropriate primers (Table S1), and the final product was purified (NZYGelpure; Nzytech), naturally transformed in *R. solanacearum* strain GM1000, and plated in kanamycin B rich medium for mutant selection (49). For complementation, the *PpsbA* promoter and the corresponding gene were amplified from the pDSK-GFPuv (LifeScience) plasmid and the *R. solanacearum* GM1000 genome, respectively. Then, both fragments were cloned into the pBT4 vector (Addgene) using Gibson assembly master mix (New England Biolabs, Ipswich, Suffolk, United Kingdom) and the appropriate primers (Table S1). Knockouts were then electroporated with the constructed plasmid and selected in tetracycline-containing medium plates. To construct luminescent reporter strains, integration of the *luxCDABE* operon under the *hrpB* promoter was carried out as previously described (49). Briefly, the reported operon was amplified from the pRCGent-PhB-lux plasmid using the appropriate primers and electroporated to each strain. Transformants were selected on gentamicin-containing B rich plates. All knockouts and reported strain verifications were carried out by PCR amplification and sequencing (Macrogen) with the corresponding primers indicated in Table S1.

**Twitching and swimming assays.** Modified CPG plates with 0.3% and 1.6% Difco agar were used on the day of their preparation for analysis of swimming and twitching motilities, respectively (50). Both motility tests were carried out by the inoculation of a 2- $\mu$ l drop of a bacterial suspension into Mill-Q (MQ) water at an absorbance level of 0.1 ( $OD_{600}$ ) in the middle of the appropriate plate. After inoculation, both CPG-type plates were incubated at 30°C and 24 h for twitching (until layered edges with multiple irregular projections were observed in the WT strain) and 72 h for swimming (measuring the bacterial halo daily). A Zeiss Axiomager M2 microscope (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) was used to obtain representative images of twitching motility at 40 $\times$  increases. A ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad, Hercules, CA) was used to obtain swimming motility images.

**Chemotaxis capillary assays.** To establish chemotactic effects in *R. solanacearum* knockouts, capillary assays were carried out as described previously (51), with some modifications. Briefly, three V-shaped bent needles (Nipro; Kita-ku, Osaka, Japan) covered with a 24-by-65 mm microscope coverslip (Menzel-Gläsner; VWR, Radnor, PA) were placed on the surface of aseptic 140-mm-diameter petri dishes (Deltalab; Rubí, Barcelona, Spain) to form the chemotaxis chambers. Sealed and autoclaved 1-ml capillaries (Microcaps, Drummond Scientific Co., Broomall, PA) (3 cm in length) were filled with chemotactic buffer (CB) as a negative control or with CB with 2% Casamino Acids as a chemoattractant (6). Bacterial suspensions were prepared from overnight cultures in B rich medium with the appropriate antibiotics, washed twice with MQ water, and adjusted to an  $OD_{600}$  of 0.1. Chemotaxis chambers were filled with the corresponding bacterial suspensions and incubated at 30°C during 2 h. Once incubated, the capillaries were washed twice to remove any external attached cell and then broken off, and the content was poured into a microcentrifuge tube containing 1 ml of MQ water. Proper dilutions were plated in rich B medium, and the CFU counts per milliliter obtained under each set of conditions were normalized between the capillaries treated with 2% Casamino Acids and those left untreated.

**Natural transformation assays.** Natural transformation efficiencies were determined as previously described (52). Briefly, 100 ng of DNA containing a gentamicin cassette with homologous regions amplified from pRCG-Pps-GWY (53) was added to each 50- $\mu$ l volume of the corresponding strains grown in MM broth supplemented with 2% glycerol. Transformed clones were selected on gentamicin-containing B rich medium plates and verified by PCR and sequencing (Macrogen) with the corresponding primers indicated in Table S1. The same cultures were also plated in B rich medium without antibiotic to obtain the total number of viable bacteria (CFU per milliliter). Transformation frequencies were calculated as the number of recombinant colonies divided by the total number of CFU per milliliter.

**Biofilm quantification.** Quantitative analysis of *R. solanacearum* biofilm formation was carried out through crystal violet assay by the use of a method adapted from previous work (54). Briefly, CPG overnight cultures were collected, washed, and adjusted in CPG to an  $OD_{600}$  of 0.1. Next, 95  $\mu$ l of CPG broth and 5  $\mu$ l of each bacterial suspension were added onto 96-well polystyrene microplates (Greiner, Kremsmünster, Austria) and incubated without shaking at 30°C during 24 h. After incubation, biomass growth in wells was measured at an  $OD_{600}$ . Subsequently, wells were washed twice with MQ water, incubated with 100  $\mu$ l of 0.1% crystal violet stain, and incubated at room temperature for 30 min. Wells were then washed with MQ water three times, and the stained biofilm immobilized on the wells was solubilized with 100  $\mu$ l of 95% ethanol and measured at  $OD_{580}$ . Measurements were performed using a multiplate reader (Sunrise, Tecan, Zürich, Switzerland), and results were normalized according to previously obtained biomass absorbance ( $OD_{580}/OD_{600}$ ).

**Root attachment quantification.** Attachment to tomato roots was carried out as previously described (55), with slight modifications. One- or 2-week-old plants, grown as described above without previous acclimation, were collected and washed. Roots were submerged in 1 ml of bacterial culture (approximately  $10^8$  CFU), obtained from a diluted culture at an  $OD_{600}$  of 0.1 ( $\sim 10^8$  CFU/ml) in MQ water. Submerged root plants were incubated at 25°C with gentle shaking at 50 rpm during 4 h to promote bacterium-root contact. After incubation, roots were placed in tubes with 30 ml sterile 0.88% NaCl, shaken during 1 min at 200 rpm to remove unattached bacteria, and gently dried to remove liquid excess. Attached bacteria were then collected by immersing 2-cm-long dried roots in tubes with 1 ml sterile 0.88% NaCl, followed by 1 min of vortex mixing. Appropriated dilutions were plated in B rich medium.

**Bacterial leaf multiplication assays.** Bacterial growth *in planta* was measured as previously described (56), with some modifications. A 3-liter inoculum of each bacterial strain was prepared, starting from a culture maintained at an  $OD_{600}$  of 0.1 in MQ water (approximately  $10^8$  CFU/ml) to obtain a final concentration of  $\sim 10^5$  CFU/ml. Infections were performed using a vacuum machine, and to reduce the

surface tension of the water, 150  $\mu$ l of Silwet L-77 was added to the 3-liter inoculum. Four-week-old tomato plants were submerged in the respective bacterial inocula, and vacuum was applied during 1 min to promote bacterial infiltration in leaves. After inoculation, plants were retrieved, dried, and incubated under standard conditions (27°C, 60% relative humidity, and 16-h light/8-h darkness). At specific dpi, four 5-mm<sup>2</sup> leaf disks were recovered from the infiltrated plants, collected in tubes containing 200  $\mu$ l of MQ water, and subjected to a grinding process. The collected dilutions were plated on B medium to obtain the final concentration of each strain on leaf surface (expressed as CFU count per square centimeter).

**Bacterial virulence experiments.** For drenching assays, 4-week-old unwounded plants were soil-soak inoculated by watering with 40 ml of bacterial culture, at an  $OD_{600}$  of 0.1 ( $\sim 10^8$  CFU/ml) in MQ water, per plant (56). Once infected, plants were incubated under standard conditions and wilting signs were recorded daily on a disease index scale from 0 (no wilt) to 4 (death). At 4, 8, and 12 dpi, bacterial multiplication in tomato plants was measured by collecting 3 cm of the stem, 0.5 cm above the petiole of the first true leaf, into tubes containing 300  $\mu$ l of MQ water. After 30 min of incubation at room temperature, serial dilutions were plated in corresponding rich B medium to measure viable bacteria.

For petiole inoculation assays, 4-week-old plants were directly infected by inoculation with a 100- $\mu$ l drop (approximately  $10^3$  CFU) of a sample obtained from a culture at  $OD_{600}$  of 0.1 ( $\sim 10^8$  CFU/ml) diluted in MQ water. Bacterial injections into the stem, above the petiole of the first true leaf, were performed using a sterile needle, and plants were incubated under standard conditions (56). Disease index scale values were assigned daily during 9 days, and at 3, 6, and 9 dpi, bacterial multiplication in tomato plants was measured as previously described by collection of 3 cm of the stem, 0.5 cm above the inoculation point, and plating in corresponding rich B plates.

**Luminescence assays.** Overnight cultures of all strains carrying *PhrpB::lux* were inoculated in MM supplemented with glutamate and gentamicin at absorbance of 0.3 ( $OD_{600}$ ), and culture aliquots were collected at 0, 4, 6, and 8 h postinoculation to measure luminescence and absorbance (57). Expression of the *hrpB* promoter was represented as relative light units (RLU) per second. A FB-12 luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany) and a V-1200 spectrophotometer (VWR, Radnor, PA) were used for each measurement, respectively.

To evaluate bacterial distribution through plant stem of reporter strains, 4-week-old plants were infected as previously described in a petiole inoculation assay but with slight modifications. Drops (10  $\mu$ l) of cultures of each luminescent strain (approximately  $10^3$  CFU) were injected into the plant stem, above the petiole of the second true leaf. Once infected, plants were incubated under standard conditions and at 3 and 6 dpi, luminescence in tomato plants stem was measured by collecting 0.5 cm of internodes 2 and 3 into tubes containing 200  $\mu$ l of MQ water. After 30 min of incubation, luminescence was measured from different stem cuts.

**Statistics.** All data were analyzed in a two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for *post hoc* multiple-group comparisons. Results were considered statistically significant when a *P* value of  $<0.05$  was obtained.

**Data accessibility.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**FIG S1**, TIF file, 1.3 MB.

**FIG S2**, TIF file, 2.5 MB.

**FIG S3**, TIF file, 0.5 MB.

**FIG S4**, TIF file, 1.5 MB.

**FIG S5**, TIF file, 0.5 MB.

**FIG S6**, TIF file, 1.1 MB.

**FIG S7**, TIF file, 0.5 MB.

**TABLE S1**, DOCX file, 0.01 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants BIO2016-77011-R and AGL2016-78002-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness). We acknowledge financial support from the Severo Ochoa Program for Centers of Excellence in R&D (SEV-2015-0533) and the CERCA Program from the Catalan Government (Generalitat de Catalunya). J.A. is a Serra Hünter Fellow (Generalitat de Catalunya). The project that gave rise to these results received the support of a fellowship (code is LCF/BQ/IN17/11620004) from la Caixa Foundation (identifier [ID] 100010434). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 713673.

We thank Joan Ruiz (Universitat Autònoma de Barcelona [UAB]) and Susana Escribano (UAB) for their excellent technical assistance, as well as UAB student Paula García for her helpful support.

M.V., J.A., N.S.C., and J.B. conceived the study. J.A. and J.C. performed the *in vitro* bacterial experiments. J.C. and P.S. performed all the bacterial infections *in planta*. M.V., J.A., N.S.C., and J.C. supervised the study. M.V., J.A., J.C., and P.S. analyzed the results. M.V., J.A., N.S.C., J.B., J.C., and P.S. wrote the article with contributions from all of us. We declare that we have no conflict of interests.

REFERENCES

1. Peeters N, Guidot A, Vailleu F, Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol* 14:651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>.
2. Allen C, Prior P, Hayward AC. 2005. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
3. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
4. Caldwell D, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS. 2017. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 107:528–536. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0353-R>.
5. Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* 183:3597–3605. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3597-3605.2001>.
6. Yao J, Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 188:3697–3708. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3697-3708.2006>.
7. Mattick JS. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56:289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>.
8. Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* 46:427–437. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03187.x>.
9. Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA, Denny TP, Genin S, Denny TP. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147:3215–3229. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3215>.
10. Bertrand JJ, West JT, Engel JN. 2010. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192:994–1010. <https://doi.org/10.1128/JB.01390-09>.
11. Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE. 2015. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev* 39:17–46. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081>.
12. Bahar O, Levi N, Burdman S, Burdman S. 2011. The cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* requires a polar flagellum for full virulence before and after host-tissue penetration. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1040–1050. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0041>.
13. Bahar O, Goffer T, Burdman S. 2009. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol Plant Microbe Interact* 22:909–920. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0909>.
14. Taguchi F, Ichinose Y. 2011. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1001–1011. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0026>.
15. Monteiro F, Solé M, van Dijk I, Valls M. 2012. A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:557–568. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-11-0201>.
16. Wheatley RM, Poole PS. 2018. Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiol Rev* 42:448–461. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy014>.
17. Whitchurch CB, Leech AJ, Young MD, Kennedy D, Sargent JL, Bertrand JJ, Semmler ABT, Mellick AS, Martin PR, Alm RA, Hobbs M, Beatson SA, Huang B, Nguyen L, Commolli JC, Engel JN, Darzins A, Mattick JS. 2004. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 52:873–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x>.
18. Zhou X, Qian G, Chen Y, Du L, Liu F, Yuen GY. 2015. PilG is involved in the regulation of twitching motility and antifungal antibiotic biosynthesis in the biological control agent *Lysobacter enzymogenes*. *Phytopathology* 105:1318–1324. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0361-R>.
19. Darzins A. 1994. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 11:137–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00296.x>.
20. Cursino L, Galvani CD, Athinuwat D, Zaini PA, Li Y, De la Fuente L, Hoch HC, Burr TJ, Mowery P. 2011. Identification of an operon, Pil-Chp, that controls twitching motility and virulence in *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1198–1206. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0252>.
21. Leech AJ, Mattick JS. 2006. Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. *J Bacteriol* 188:8479–8486. <https://doi.org/10.1128/JB.00157-06>.
22. Fulcher NB, Holliday PM, Klem E, Cann MJ, Wolfgang MC. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol Microbiol* 76:889–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x>.
23. Zhou M, Shen D, Xu G, Liu F, Qian G. 2017. ChpA controls twitching motility and broadly affects gene expression in the biological control agent *Lysobacter enzymogenes*. *Curr Microbiol* 74:566–574. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1202-5>.
24. Rosenberg T, Salam BB, Burdman S. 2018. Association between loss of type IV pilus synthesis ability and phenotypic variation in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli*. *Mol Plant Microbe Interact* 31:548–559. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0324-R>.
25. Kilmury SLN, Burrows LL. 2018. The *Pseudomonas aeruginosa* PIIISR two-component system regulates both twitching and swimming motilities. *mBio* 9:e01310-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01310-18>.
26. Brumbley SM, Denny TP. 1990. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J Bacteriol* 172:5677–5685. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.5677-5685.1990>.
27. Meng F, Yao J, Allen C. 2011. A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *J Bacteriol* 193:2477–2486. <https://doi.org/10.1128/JB.01360-10>.
28. Das A, Rangaraj N, Sonti RV. 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22:73–85. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0073>.
29. Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang B-L, He Y-Q, Feng J-X, Tang J-L, Dow JM. 2007. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 63:429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05531.x>.
30. Narulita E, Addy HS, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2016. The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*. *Biochem Biophys Res Commun* 469:868–872. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.071>.
31. Siri MI, Sanabria A, Boucher C, Pianzola MJ. 2014. New type IV pili-related genes involved in early stages of *Ralstonia solanacearum* potato infection. *Mol Plant Microbe Interact* 27:712–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0210-R>.
32. Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2012. Through infection by  $\phi$ RSM filamentous phages. *Phytopathology* 102:469–477. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-11-0319-R>.
33. Ray SK, Kumar R, Peeters N, Boucher C, Genin S. 24 March 2015, posting date. *rpoN1*, but not *rpoN2*, is required for twitching motility, natural competence, growth on nitrate, and virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Front Microbiol* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00229>.
34. McCarthy Y, Ryan RP, O'Donovan K, He Y-Q, Jiang B-L, Feng J-X, Tang J-L, Dow JM. 2008. The role of PilZ domain proteins in the virulence of



- Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Plant Pathol 9:819–824. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00495.x>.
35. Shi X, Lin H. 8 April 2016, posting date. Visualization of twitching motility and characterization of the role of the PilG in *Xylella fastidiosa*. J Vis Exp <https://doi.org/10.3791/53816>.
  36. Haiko J, Westerlund-Wikström B. 2013. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. Biology (Basel) 2:1242–1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>.
  37. Rossi FA, Medeot DB, Liaudat JP, Pistorio M, Jofré E. 2016. In *Azospirillum brasilense*, mutations in *flmA* or *flmB* genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots. Microbiol Res 190:55–62. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.006>.
  38. Zheng H, Mao Y, Teng J, Zhu Q, Ling J, Zhong Z. 2015. Flagellar-dependent motility in *Mesorhizobium tianshanense* is involved in the early stage of plant host interaction: study of an *flgE* mutant. Curr Microbiol 70:219–227. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0701-x>.
  39. Mhedbi-Hajri N, Jacques M-A, Koebnik R. 2011. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic *Xanthomonadaceae*. Adv Exp Med Biol 715:71–89. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_5).
  40. Croes CL, Moens S, van Bastelaere E, Vanderleyden J, Michiels KW. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J Gen Microbiol 139:2261–2269. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2261>.
  41. Belas R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends Microbiol 22:517–527. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002>.
  42. O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 30:295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>.
  43. Yao J, Allen C. 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. J Bacteriol 189:6415–6424. <https://doi.org/10.1128/JB.00398-07>.
  44. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  45. Boucher CA, Barberis PA, Demery DA. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. Microbiology 131:2449–2457. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2449>.
  46. Hendrick CA, Sequeira L. 1984. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. Appl Environ Microbiol 48:94–101. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.1.94-101.1984>.
  47. Powell S, Forslund K, Szklarzyk D, Trachana K, Roth A, Huerta-Cepas J, Gabaldón T, Rattei T, Creevey C, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2014. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. Nucleic Acids Res 42:D231–D239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1253>.
  48. Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, Seo J-A, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genet Biol 41:973–981. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>.
  49. Monteiro F, Genin S, van Dijk I, Valls M. 2012. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. Microbiology 158:2107–2116. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058610-0>.
  50. Raza W, Ling N, Yang L, Huang Q, Shen Q. 2016. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. Sci Rep 6:24856. <https://doi.org/10.1038/srep24856>.
  51. Adler J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 74:77–91. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-1-77>.
  52. Bertolla F, Van Gijsegem F, Nesme X, Simonet P. 1997. Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. Appl Environ Microbiol 63:4965–4968. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.12.4965-4968.1997>.
  53. Paola A, Cruz Z, Ferreira V, Pianzola MJ, Siri MI, Coll NS, Valls M. 2014. A novel, sensitive method to evaluate potato germplasm for bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. Mol Plant Microbe Interact 27:277–285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0303-FI>.
  54. O'Toole GA, Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28:449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>.
  55. Yang W-C, Lin Y-M, Cheng Y-S, Cheng C-P. 2013. *Ralstonia solanacearum* *RSc0411* (*lptC*) is a determinant for full virulence and has a strain-specific novel function in the T3SS activity. Microbiology 159:1136–1148. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064915-0>.
  56. Morel A, Peeters N, Vailliau F, Barberis P, Jiang G, Berthomé R, Guidot A. 2018. Plant pathogenicity phenotyping of *Ralstonia solanacearum* strains. Methods Mol Biol 1734:223–239. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_18).
  57. Puigvert M, Solé M, López-García B, Coll NS, Beattie KD, Davis RA, Elofsson M, Valls M. 2019. Type III secretion inhibitors for the management of bacterial plant diseases. Mol Plant Pathol 20:20–32. <https://doi.org/10.1111/mpp.12736>.

## RESULTADOS

**Supplementary Table 1.** Oligonucleotides used in this work.

<b>Name</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>	<b>Application</b>
LoxPKmFw	TGGCGGCCGCATAACTTC	Mutant construction
LoxPKmRv	AGCTGGATCCATAACTTCGTAT	Mutant construction
M13FpUC	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequencing primer for pGEMT vector
M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing primer for pGEMT vector
RSc0667RTFw	GACGTGCCCATCAACTGGACG	RT-PCR assay
RSc0668RTRw	GGAATCGTCGATCACCAGCAC	RT-PCR assay
RSc0668RTFw	GGCGAGTTCGCTTGCCGGCCG	RT-PCR assay
RSc0669RTRv	CTTCGGTGGGGAGTCATCAACCACC	RT-PCR assay
RSc0669RTFw	CATCCCGGTGATCATCTGCACCACC	RT-PCR assay
RSc0670RTRv	CGATGCCTTGGCACGCGCCTC	RT-PCR assay
RSc0670RTFw	CTGCTGGCTGATCCGGCATTG	RT-PCR assay
RSc0671RTRv	CGCCTCCGCTGCAACTTCC	RT-PCR assay
RSc0671RTFw	CATCGAGCAGATCCTGCAGATGACGG	RT-PCR assay
RSc0672RTRv	GGAACAGGACGCGCCGACGG	RT-PCR assay
RSc0672RTFw	CGGACAAGCACCGCCGCTATG	RT-PCR assay
RSc0673RTRv	CCGCGTCCATCGCTCGCCAAG	RT-PCR assay
PilAUpFw	CACTGCGCCAGGCGTGACTTG	Mutant construction and verification
PilAUpRv	GCTATACGAAGTTATGCGGCCGCCAGAGATGACGCATCGACTTCAT	Mutant construction
PilADwFw	ATTATACGAAGTTATGGATCCAGCTGCTCCGGCAGAATGCCGCTAA	Mutant construction
PilADwRv	GGGATGGGCCAGGAACATGTG	Mutant construction and verification
PilAFwNest	GTCGTGACGATCTTTGTCCGG	Mutant construction
PilARvNest	GCTGCAACCGCTCGTCCAGC	Mutant construction
PilIUpFw	GATTTGCCGCTTCCATCCG	Mutant construction and verification
PilIUpRv	GCTATACGAAGTTATGCGGCCGCCAGTCCGGATGCGGTGCTTGCGCG	Mutant construction
PilIDwFw	ATTATACGAAGTTATGGATCCAGCTCGCGCCGGCACCCAGGCGGGAC	Mutant construction
PilIDwRv	CTCGTTCATGTTCTTACCAG	Mutant construction and verification
PilIFwNest	CGCAACGCGAGAACATGATG	Mutant construction
PilIRvNest	GCGACGACGCGCCACTTCAC	Mutant construction
ChpAUpFw	CCGTGGAAGAACTGCGCGAGCTGG	Mutant construction and verification
ChpAUpRv	GCTATACGAAGTTATGCGGCCGCCAGCCGAGGGCGTTGCCGTAG	Mutant construction
ChpADwFw	ATTATACGAAGTTATGGATCCAGCTGAAGCCGACGAGGTGCTCACC	Mutant construction
ChpADwRv	CGCTTGACCTGATGGTATTTTCCC	Mutant construction and verification
ChpAFwNest	GGTCGGCCGGGTGCAGCAGACCGCC	Mutant construction
ChpARvNest	GGCCGCCACCGGCACATCTTCGTC	Mutant construction
FliCUpFw	CAGCTCCGCTTGTGTGCGCAGCC	Mutant construction and verification
FliCUpRv	GCTATACGAAGTTATGCGGCCGCCAGAGCGTCTCTAAATTTCCCGATG	Mutant construction
FliCDwFw	ATTATACGAAGTTATGGATCCAGCTTCGGCAAGGCCGCATGACTTCCGG	Mutant construction

FliCDwRv	CTTCGCTCATGTTCTGCGTGCCGG	Mutant construction and verification
FliCFwNest	GGTACACGCTGACCGTCTTGG	Mutant construction
FliCRvNest	GCCAGGGTCGAATCGCCGAC	Mutant construction
CheAUpFw	GATCGACATGACCAGCGAGGGTTTG	Mutant construction and verification
CheAUpRv	GCTATACGAAGTTATGCGGCCAGTCGGTTGTCCCGTCCGGTTAATG	Mutant construction
CheADwFw	ATTATACGAAGTTATGGATCCAGCTGCGGACGCCTGCCTGAACGGAAC	Mutant construction
CheADwRv	CGAGGGTCTTGCCAGGCTCGGGC	Mutant construction and verification
CheAUpFw	GATCGACATGACCAGCGAGGGTTTG	Mutant construction
CheAFwNest	CGTCGACCAGCAGAACCGCCCG	Mutant construction
CheARvNest	GATGTTCCCAACGCCAGTG	Mutant construction and verification
PpsbAFw	GTATTGAGCGATATCTAGAGGATCTCAATGAATATTGGTTGACAC	Mutant complementation and verification
PpsbARv	TCTCGCTCATGTTAAACAAAATTTTCTAGAGGATCG	Mutant complementation
PilComFw	TTTGTTTAACATGAGCGAGACGCGACCAACC	Mutant complementation
PilComRv	CCTGAATGATATCAAGCTTGTCAGGCGCGCTGCGGCC	Mutant complementation and verification
TransIRSFw	GCTCTACGTGTTCCCGATGCCGAC	Amplification of constructions from pRCGent-PhB-lux and pRCGent-Pps-GWY vectors
TransIRSRv	CTGTGGGAGGAGCGCAAGCTCGTCTC	Amplification of constructions from pRCGent-PhB-lux and pRCGent-Pps-GWY vectors
ComplRSFw	GGAGAAGCTCAAGTCCAACATCCAGGAAGTGCGC	Insertion verifications
ComplRSRv	CCATGAGCGACATCCCCACGTTTCCGTAC	Insertion verifications



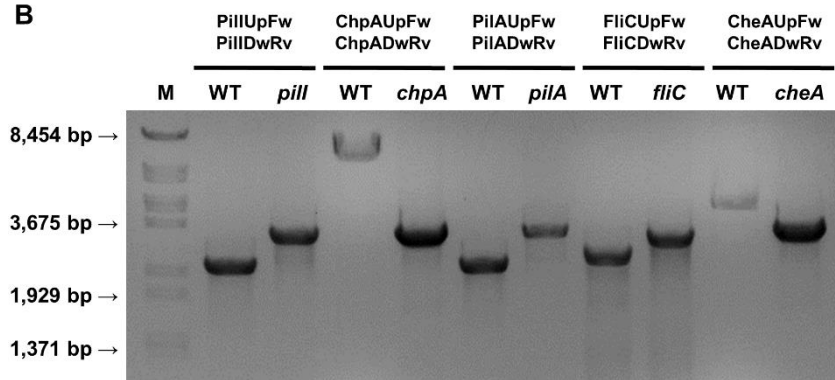
**SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**

**Figure S1.** PCR verification of the constructed mutant strains. (A) Oligonucleotides used to verify each of the indicated *R. solanacearum* knockouts. The resulting sizes of PCR products are shown in base pairs (bp). (B) PCR verifications of the indicated *R. solanacearum* strains. Lambda BsteII-digested DNA was used as a DNA marker (M).

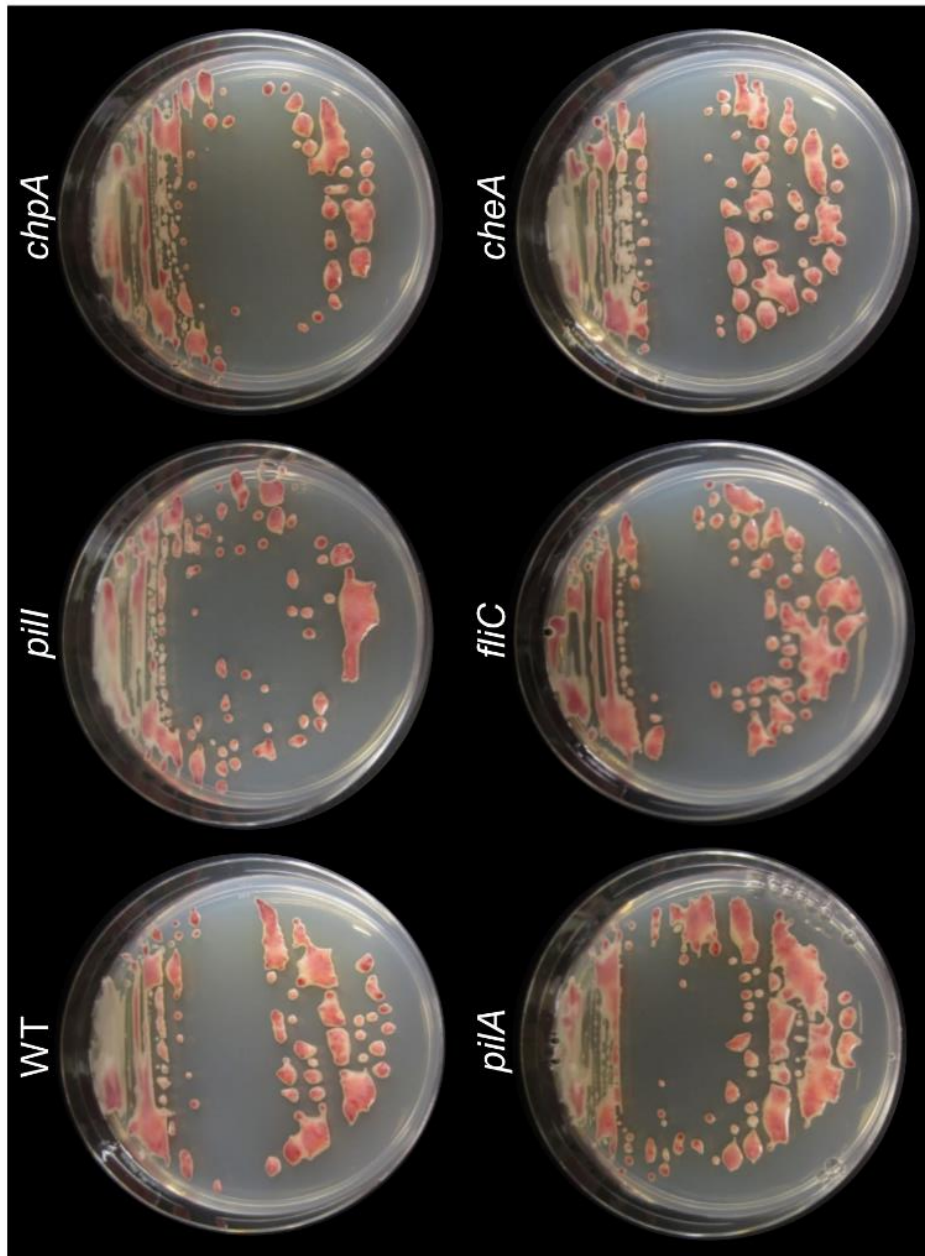
**A**

Gene	Primer pair used	Wild-type band size (bp)	Mutant band size (bp)
<i>pill</i>	PiIUUpFw - PiIIDwRv	2,512	3,306
<i>chpA</i>	ChpAUpFw - ChpADwRv	8,086	3,286
<i>pilA</i>	PiIAUpFw - PiIADwRv	2,504	3,388
<i>fliC</i>	FliCUUpFw - FliCDwRv	2,771	3,268
<i>cheA</i>	CheAUpFw - CheADwRv	4,151	3,317

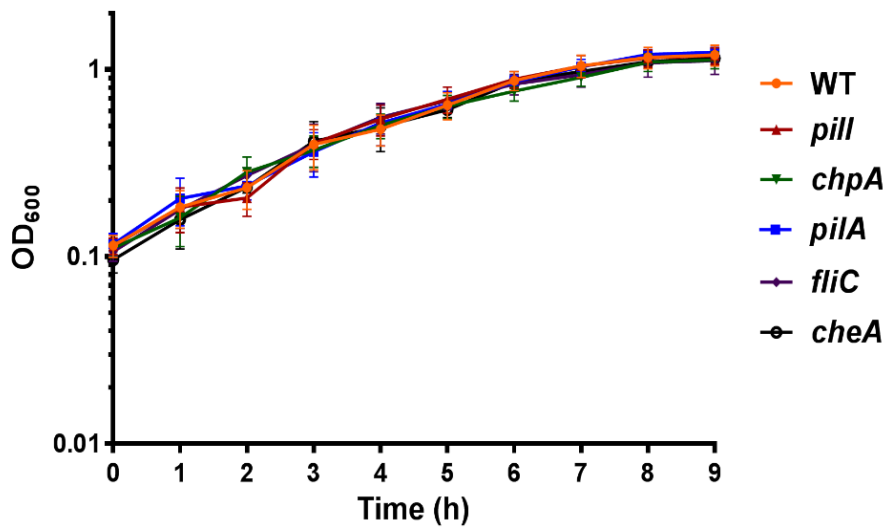
**B**



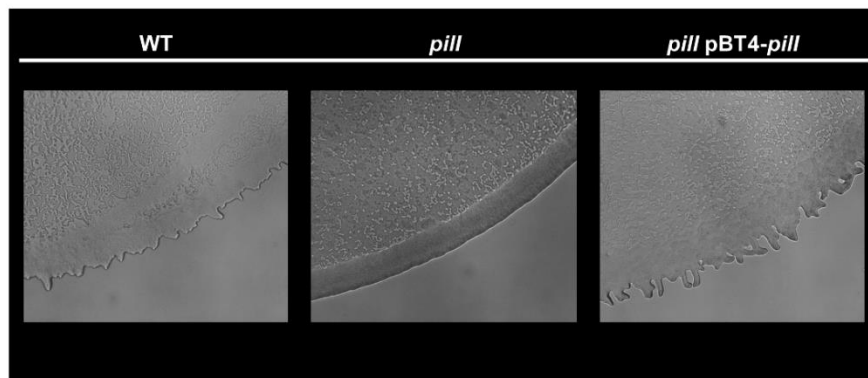
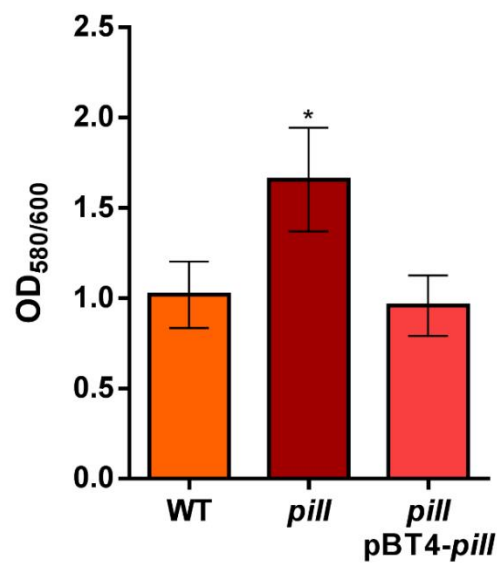
**Figure S2.** *R. solanacearum* colony phenotypes. The image shows a macroscopic view of the indicated *R. solanacearum* strains after 48 h of incubation in rich B medium plates.



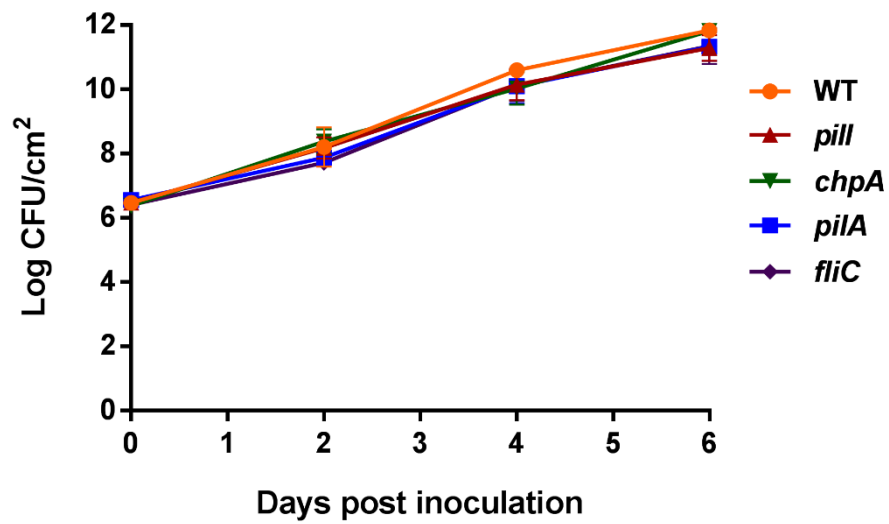
**Figure S3.** *R. solanacearum* growth assays *in vitro*. Growth curves of the indicated *R. solanacearum* strains, incubated at 28°C with 180 rpm of shaking in rich B medium broth. Error bars represent standard deviations of the means of results from at least 3 independent experiments performed with 5 replicates each.



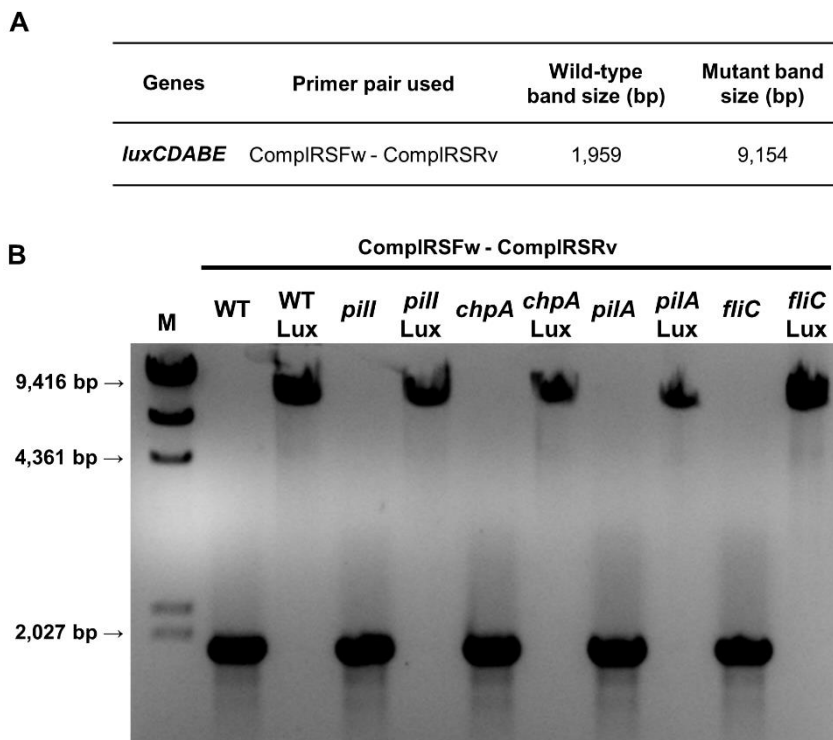
**Figure S4.** Motility assay and biofilm quantification of the complemented *pill* strain. (A) Representative optical microscope images ( $\times 100$  magnification) from three independent twitching motility assays. (B) Biofilm assay. The y-axis data represent biofilm absorbance ( $OD_{580}$ ) divided by the biomass ( $OD_{600}$ ). The error bars represent standard deviations of the means of results from 16 replicates per strain. The asterisk denotes a significant ( $P < 0.05$ ) difference from the *R. solanacearum* WT strain result. The assay was performed three times. Results of a representative experiment are shown.

**A****B**

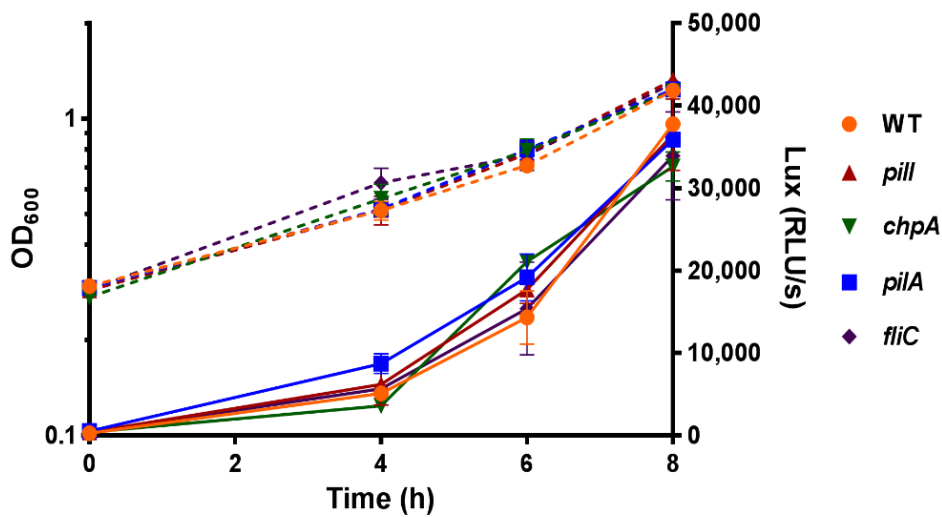
**Figure S5.** *R. solanacearum* growth assays *in planta*. Data represent log CFU per square centimeter of the indicated strains in leaf for tomato plants over 4 weeks of age. Error bars represent standard errors of the means. Data shown are representative of results from at least three independent experiments with 3 replicates each.



**Figure S6.** PCR verification of all reporter strains. (A) Oligonucleotides used to verify each of the indicated *R. solanacearum luxCDABE* strains. The resulting sizes of PCR products are shown in base pairs (bp). (B) PCR verifications of the indicated *R. solanacearum* strains. Lambda HindIII-digested DNA was used as DNA marker (M).



**Figure S7.** Correlation between bacterial growth and luminescence in reporter strains. Data represent levels of expression of the *hrpB* promoter of the *R. solanacearum* WT reporter strain and derived mutants. The left y-axis data represent bacterial growth (OD<sub>600</sub>), with each strain drawn in discontinuous lines. The right y-axis data represent luminescence (RLU per second), with each strain drawn in continuous lines. Error bars represent standard deviations of the means of results from the four independent samples, and each experiment was performed in triplicate.



## **4. DISCUSIÓN**





## 4. DISCUSIÓN

*A. baumannii* y *R. solanacearum* son dos especies bacterianas que han adquirido gran relevancia científica desde el punto de vista sanitario y agroalimentario debido a los altos costes derivados de su actuación como patógenos.

Por un lado, *A. baumannii* es la bacteria responsable de diversos cuadros clínicos graves, mayoritariamente neumonía, que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos ingresados en centros sanitarios de todo el mundo (Peleg *et al.* 2008). En los últimos años, este patógeno ha alcanzado una alarmante notoriedad, debido a que gran parte de las cepas clínicas aisladas son resistentes a la mayoría de los antimicrobianos de uso clínico. La emergencia sanitaria provocada por el aumento de cepas multirresistentes, tanto de este patógeno como de otras especies, junto a la disminución del arsenal terapéutico efectivo disponible, ha impulsado la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos alternativos con nuevas dianas sobre las que actuar (Tacconelli *et al.* 2018; Zhen *et al.* 2019).

Por otro lado, *R. solanacearum* es el agente causal de la marchitez bacteriana, una enfermedad caracterizada por la obstrucción de los vasos del xilema y la consecuente disfunción vascular, que concluye con la muerte de la planta infectada en pocos días (Peeters *et al.* 2013). Además, este microorganismo se encuentra distribuido prácticamente por todo el mundo, pudiendo sobrevivir largos periodos de tiempo en suelos de cultivo (Elphinstone 2005). Todo ello, junto al amplio rango de hospedadores, que abarca a más de 200 especies vegetales, muchas de ellas de importancia para la industria agroalimentaria (como tomateras, patateras o la planta del tabaco), hacen de esta bacteria uno de los fitopatógenos más problemáticos a día de hoy, siendo esencial el desarrollo de mecanismos efectivos para su control (Mansfield *et al.* 2012).

Una característica común de ambos microorganismos es la capacidad de moverse mediante diversos sistemas. Por un lado, *A. baumannii* se desplaza a través del movimiento asociado a los pili de tipo IV, *twitching*, y por el movimiento independiente de apéndices, *surface-associated motility*; mientras que *R. solanacearum* exhibe los movimientos *twitching* y el asociado a flagelos, *swimming* (Meng 2013; Harding *et al.* 2018). La motilidad bacteriana juega un papel determinante en la virulencia de muchos patógenos de animales y plantas, poniendo de manifiesto la posibilidad de explotar el vínculo movimiento-virulencia como fuente de nuevas dianas para futuros tratamientos, evitando así pérdidas en la producción de cultivos en todo el mundo o infecciones hospitalarias causadas por cepas multirresistentes (Josenhans y Suerbaum 2002; Erhardt 2016).

Por todo ello, el estudio de estos mecanismos de motilidad puede facilitar el esclarecimiento de las bases moleculares que regulan cada sistema, obteniendo dianas clave para futuros usos terapéuticos.

#### **4.1. Evaluación de la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like de *A. baumannii* ATCC 17978 y su efecto en la motilidad, quimiotaxis y virulencia**

El *surface-associated motility* es un tipo de motilidad característico de diversos aislados clínicos de *A. baumannii*, el cual permite su desplazamiento por distintas superficies de forma independiente al movimiento mediado por los pili de tipo IV (Harding *et al.* 2018). Este tipo de motilidad se ha relacionado con la patogenicidad de la bacteria, observando cómo un fenotipo de hipermotilidad desencadena un aumento de la virulencia (Eijkelkamp *et al.* 2013), mientras que los mutantes deficientes en *surface-associated motility* exhiben una virulencia atenuada (Pérez-Varela *et al.* 2017, 2019). La cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 es la cepa clínica más estudiada, siendo modelo de investigación en la mayoría de trabajos realizados sobre este patógeno nosocomial. Además, presenta el *surface-associated motility* como único sistema de desplazamiento (Eijkelkamp *et al.* 2011b). Recientemente, el *surface-associated motility* se ha relacionado con la proteína A1S\_2811, un híbrido similar a los componentes del sistema quimiotáctico flagelar a CheA y CheY, cuya inactivación causa una disminución significativa en este tipo de movimiento en esta cepa (Chen *et al.* 2017a). En estudios previos realizados por nuestro grupo sobre la especie *S. enterica*, se determinó que la interacción entre el componente quimiotáctico CheW con la proteína RecA, regulador positivo del sistema SOS de reparación de daño en el DNA, es imprescindible para el desarrollo de la motilidad y la respuesta quimiotáctica (Mayola *et al.* 2014). Específicamente, RecA interactúa con CheW para permitir la formación de los quimiorreceptores, promoviendo así la rotación flagelar (Irazoki *et al.* 2016a, 2016b).

Al carecer *A. baumannii* de flagelos y teniendo en cuenta los datos mostrados sobre la implicación de la proteína A1S\_2811, análoga a CheA/Y, en la motilidad de la cepa ATCC 17978 (Chen *et al.* 2017a), en este trabajo se ha querido esclarecer, no solo la implicación de RecA y otros componentes análogos al sistema quimiotáctico con el *surface-associated motility*, sino también si esta función viene mediada por la interacción entre ambas proteínas.

En trabajos anteriores, se construyó el mutante *recA* en *A. baumannii* ATCC 17978, cuya inactivación supuso una reducción en la virulencia del patógeno, utilizando ratones como modelo animal de infección (Aranda *et al.* 2011). En esta Tesis, además, se ha demostrado que la inactivación de *recA* produce una disminución en la capacidad de *A. baumannii* de desplazarse mediante *surface-associated motility* (Fig.1, Artículo 1). Dada la reciente identificación del operón A1S\_2811-2815 en esta cepa de *A. baumannii*, implicado en la regulación de este tipo de motilidad y posiblemente relacionado con la quimiotaxis bacteriana (Chen *et al.* 2017a; Sampedro *et al.* 2015), se procedió a inactivar el gen A1S\_2813, anotado como *pilI* (gen que codifica una proteína análoga a CheW). Tal y como pudo observarse en el caso del mutante *recA*, la inactivación de A1S\_

2813 en la cepa ATCC 17978 abole su motilidad (Fig.1, Artículo 1). Además, la complementación de ambos mutantes, mediante la transformación de *A. baumannii* con un plásmido estable conteniendo la correspondiente secuencia codificante de los genes *recA* y *A1S\_2813*, restablece el fenotipo de motilidad salvaje. Todo ello indica que tanto *RecA* como el operón hipotéticamente implicado en quimiotaxis *A1S\_2811-2815* están involucrados en la motilidad *surface-associated motility* en la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

Como ya se ha comentado, tanto el gen *A1S\_2811* (*cheA/Y-like*) como el gen *A1S\_2813* (*cheW-like*) pertenecen al mismo operón. Sin embargo, aunque la importancia de este operón en la motilidad *surface-associated motility* de *A. baumannii* ha sido demostrada inequívocamente, su papel en la quimiotaxis bacteriana sigue sin esclarecerse. Para elucidar su función, se realizó un ensayo de detección de respuesta quimiotáctica mediante el uso de metanol como quimioatrayente, previamente descrito en distintas especies bacterianas entre las que se incluye *A. baumannii* ATCC 17978 (Tola *et al.* 2019). Los resultados obtenidos han determinado que, mientras que en la cepa salvaje puede observarse una respuesta quimiotáctica positiva frente al metanol, mostrada como un aumento en los recuentos bacterianos en presencia de quimioatrayente; en el caso de los mutantes *recA* y *A1S\_2813* no existe tal respuesta (Fig. 2, Artículo 1). Al igual que con los resultados obtenidos en los ensayos de motilidad, la complementación de los dos mutantes restablece el fenotipo de quimiotaxis a niveles equivalentes de la cepa parental.

La maquinaria molecular que controla la quimiotaxis bacteriana se ha dividido en tres grupos, en función de los componentes celulares modulados: flagelos, el primer sistema quimiotáctico en ser descrito y el mejor caracterizado (Kato *et al.* 2008); pili tipo IV, sistema caracterizado mediante estudios de homología con el sistema flagelar (Sampedro *et al.* 2015); y un sistema quimiotáctico alternativo no asociado con los apéndices de locomoción ya descritos (Wuichet y Zhulin 2010). En este último grupo se encuentran la mayoría de los sistemas quimiotácticos de *M. xanthus*, bacteria del suelo con un ciclo de vida complejo y que carece de flagelos. No obstante, en este microorganismo se han descrito hasta ocho sistemas reguladores de quimiotaxis diferentes, de los cuales solo dos regulan los sistemas de motilidad identificados en *M. xanthus*, uno dependiente de pili de tipo IV (*twitching* o *gliding* social) y otro independiente de apéndices (*gliding* aventurero) (Ward *et al.* 2000; Mauriello *et al.* 2010).

De los otros sistemas descritos no asociados a apéndices, tres vías de señalización quimiotáctica descritas en *M. xanthus* parecen regular de distinta manera la formación y el desarrollo de cuerpos fructíferos (Bellenger *et al.* 2002; Kirby y Zusman 2003), mientras que otro sistema modularía el estrés térmico ambiental y otros dos tendrían funciones aún desconocidas (Zusman *et al.* 2007). Sin embargo, en la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*, hasta la fecha solo se ha identificado un sistema quimiotáctico

## DISCUSIÓN

independiente de apéndices (el operón *A1S\_2811-2815*), cuya función podría ser la regulación del movimiento *surface-associated motility* (Chen *et al.* 2017a).

En el estudio de la proteína híbrida CheA/Y en la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* no solo se observó una disminución en la motilidad del mutante, sino también la reducción en la capacidad de formar biofilm, en el número de estructuras descritas como pili de tipo I y la cantidad de sustancias extrapoliméricas secretadas en la superficie celular (Chen *et al.* 2017a). En el presente estudio, la visualización de las distintas cepas mutantes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró, de forma similar, una reducción drástica tanto en el número de estructuras de pili de tipo I como en la cantidad de componente, presumiblemente exopolisacárido, secretado (Fig. 3, Artículo 1).

Este hallazgo corrobora estudios anteriores realizados en *A. baumannii* ATCC 17978, los cuales habían demostrado que la inactivación de transportadores pertenecientes a distintas familias de bombas de eflujo reduce drásticamente la motilidad por *surface-associated motility* (Pérez-Varela *et al.* 2019), presumiblemente debido a la reducción en la translocación de moléculas relacionadas con este tipo de motilidad, como moléculas tensioactivas o de señalización por *quorum sensing* (Clemmer *et al.* 2011; Skiebe *et al.* 2012; McQueary *et al.* 2012). Esta hipótesis también se vería reforzada con el análisis transcriptómico realizado el mutante *cheA/Y*, cuya inactivación reduce significativamente la expresión génica del operón *A1S\_0112-0119*, involucrado en la producción de acinetina 505, lipopéptido que podría actuar como surfactante durante el desarrollo del *surface-associated motility*, y una bomba de eflujo de la familia RND encargada de su extrusión (Rumbo-Feal *et al.* 2017; Chen *et al.* 2017a).

Para determinar el impacto de las proteínas *A1S\_2813* (CheW-like) y RecA en la patogenicidad de *A. baumannii* se utilizaron dos modelos animales distintos, basados en estudios de fertilidad en el nematodo *C. elegans* y de ensayos de letalidad en larvas del lepidóptero *G. mellonella*, validados previamente para este patógeno (Vallejo *et al.* 2015; Peleg *et al.* 2009). Los resultados obtenidos con ambos métodos mostraron una reducción significativa de la virulencia producida por los mutantes *recA* y *A1S\_2813* (Fig. 4, Artículo 1). En el caso del mutante *recA*, los resultados obtenidos concuerdan con los descritos previamente en modelos murinos (Aranda *et al.* 2011) y, junto con los datos adquiridos por la inactivación de la proteína CheW-like, respaldan la clara relación entre la motilidad *surface-associated motility* en *A. baumannii* ATCC 17978 y la respuesta patogénica.

Esta relación coincide con los estudios realizados sobre el mutante de *A. baumannii* con el represor transcripcional H-NS inactivado, el cual no solo presenta un patrón de hipermotilidad, sino también un aumento de su virulencia (Eijkelkamp *et al.* 2013). Otros resultados descritos son los observados tras la inactivación de distintos transportadores de membrana en *A. baumannii*, indispensables para el desarrollo de

este tipo de motilidad (Pérez-Varela *et al.* 2017, 2019). En ambos tipos de mutantes, las bombas de eflujo están involucradas en el fenotipo observado, aunque de manera opuesta. En los mutantes que sufren una reducción significativa de su motilidad y virulencia, la expresión se haya reducida (Pérez-Varela *et al.* 2017, 2019), mientras que en el mutante con hipermotilidad la expresión de genes que codifican señales de detección de *quorum sensing*, los pili tipo I y varias bombas de eflujo, incluidas las del operón *A1S\_0112-0119* mencionado anteriormente, aumenta significativamente junto a la virulencia (Eijkelkamp *et al.* 2013).

En *S. enterica*, es necesaria la interacción entre las proteínas RecA y CheW para realizar quimiotaxis y el movimiento *swarming* (Irazoki *et al.* 2016a). Para determinar si el papel de las proteínas RecA y A1S\_2813 (CheW-like) de *A. baumannii* ATCC 17978 en motilidad, quimiotaxis y virulencia viene mediado también por su interacción, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación, a partir de la sobreexpresión de ambas proteínas unidas cada una a diferentes colas antigénicas, permitiendo así su detección mediante anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos en este ensayo junto al análisis de secuencia de ambas proteínas revelaron, por un lado, la interacción específica entre las proteínas RecA y A1S\_2813 de *A. baumannii* y, por otro lado, la estructura secundaria altamente conservada de esta última con respecto a su ortólogo CheW en *S. enterica* (Fig. 5, Artículo 1).

Para profundizar más en el estudio de la interacción, se evaluó la implicación de la región conservada de la proteína A1S\_2813, junto con otra región no conservada, para comparar si los datos descritos previamente en *S. enterica* son equivalentes a los obtenidos en *A. baumannii* (Irazoki *et al.* 2016a). Para ello, se seleccionó un aminoácido de cada una de estas dos regiones, la serina 97 y la isoleucina 121, respectivamente, y se sustituyeron por otro aminoácido no reactivo. Los nuevos resultados en los ensayos de co-inmunoprecipitación, utilizando ambos derivados de la proteína A1S\_2813, revelaron que la mutagenización de la región conservada, implicada en la interacción de RecA con la proteína CheW en *S. enterica*, también impide la unión entre las proteínas RecA y A1S\_2813 de *A. baumannii*. Por otro lado, la mutagenización de la otra región, descrita en *S. enterica* como no esencial para la interacción proteica, no altera dicha interacción (Fig. 6, Artículo 1).

Finalmente, se determinó el efecto de los cambios realizados en la proteína A1S\_2813, especialmente la mutación que abole la interacción proteica, en la motilidad, quimiotaxis y virulencia. Para ello, se complementó al mutante *A1S\_2813* con un plásmido codificante de cada una de las dos proteínas mutantes y se realizaron los ensayos pertinentes. Estos ensayos corroboraron que la región mutada que abole la interacción entre las dos proteínas, la serina 97, también es determinante para la motilidad *surface-associated motility*, la respuesta quimiotáctica y la virulencia de *A. baumannii* ATCC 17978. Por el contrario, la otra región mutagenizada no tuvo efecto en ninguno de los fenotipos caracterizados (Figs. 7 y 8, Artículo 1). Dado que *A. baumannii*

carece de flagelos y los mutantes sin pili de tipo IV funcional aún pueden realizar un desplazamiento por *surface-associated motility* (Harding *et al.* 2013), se puede afirmar que la interacción entre las proteínas RecA y CheW-like (A1S\_2813) regula este tipo de movimiento independiente de apéndices, del mismo modo que los sistemas quimiotácticos no canónicos descritos en *M. xanthus* (Zusman *et al.* 2007).

### **4.2. Identificación del operón *pil-chp* en *R. solanacearum* involucrado en la motilidad *twitching***

En *R. solanacearum*, fitopatógeno causante de la marchitez bacteriana en una gran variedad de especies vegetales de interés para la industria agroalimentaria, se ha demostrado que la motilidad mediada tanto por flagelo (*swimming*) como por pili de tipo IV (*twitching*) es esencial para el ciclo de vida de la bacteria y para el desarrollo de la enfermedad que provoca en las plantas infectadas (Peeters *et al.* 2013). Sin embargo, a pesar de que ambos sistemas de desplazamiento han sido descritos con cierto detalle en esta bacteria, los mecanismos moleculares que los regulan no han sido esclarecidos del mismo modo (Genin y Denny 2012). Por todo ello, en este bloque se ha determinado la implicación de componentes hipotéticamente asociados con la regulación de la motilidad *twitching* en *R. solanacearum*, concretamente los referentes a la respuesta quimiotáctica asociada a pili de tipo IV.

El análisis realizado sobre el genoma de *R. solanacearum* GMI1000 reveló la presencia de componentes análogos al sistema quimiotáctico flagelar, CheW y CheA, identificados como *pilI* (CheW-like) y *chpA* (CheA-like), respectivamente. Además, este análisis de ortólogos puso de manifiesto que ambos genes se ubicaban en un hipotético operón que fue posteriormente confirmado mediante técnicas de transcripción inversa, y que comprende cinco genes homólogos a los que componen el sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV de *P. aeruginosa*: *RSc0668* (*pilG*), *RSc0669* (*pilH*), *RSc0670* (*pilI*), *RSc0671* (*pilJ*) y *RSc0672* (*chpA*) (Fig. 1, Artículo 2).

Este operón muestra una significativa similitud con regiones asociadas a la regulación del movimiento *twitching* en el *cluster* descrito en *P. aeruginosa*, exceptuando los genes *chpB* (*cheB-like*) y *chpC* (*cheW-like*), los cuales no fueron identificados en *R. solanacearum* (Darzins 1994; Whitchurch *et al.* 2004). Otras especies bacterianas como *Lysobacter enzymogenes* presentan un *cluster* similar al identificado en *R. solanacearum*, así como en el operón *pil-chp* de *X. fastidiosa* (Zhou *et al.* 2015; Cursino *et al.* 2011).

Para establecer el papel de *pilI* y *chpA* en la motilidad *twitching* de *R. solanacearum*, se construyeron mutantes deficientes en estos genes, mediante el reemplazamiento de sus respectivas secuencias codificantes por las de un casete que confiere resistencia a kanamicina. También se inactivaron los genes *pilA*, *fliC* y *cheA*

para utilizar las cepas resultantes como controles en distintos ensayos: el mutante *pilA*, deficiente en motilidad *twitching* (Kang *et al.* 2002); el mutante *fliC*, incapaz de desplazarse mediante *swimming* (Tans-Kersten *et al.* 2001); y el mutante *cheA*, incapaz de realizar una respuesta quimiotáctica (Yao y Allen 2006). Además, se determinó que ninguno de los mutantes construidos presentaba alteraciones fisiológicas que pudieran afectar a los posteriores ensayos a realizar, como cambios macroscópicos en la morfología colonial, en la producción de EPS o en la tasa de crecimiento *in vitro* (Fig. S2 y S3, Artículo 2).

Los ensayos realizados para poder visualizar el movimiento *twitching* revelaron que las proteínas hipotéticamente asociadas a la regulación del pili de tipo IV, PilI y ChpA, están implicadas en este tipo de motilidad (Fig. 2, Artículo 2). Estos ensayos mostraron que el mutante *fliC* exhibe una motilidad *twitching* equivalente a la observada en la cepa salvaje, un fenotipo caracterizado por bordes coloniales irregulares con múltiples proyecciones fácilmente observables bajo microscopía óptica, mientras que el mutante *chpA* presenta una disminución en su capacidad de realizar desplazamiento mediante *twitching*, descrito como una disminución en el número y longitud de las proyecciones presentes en los márgenes de la colonia. Por otro lado, el mutante *pilI* sufre una abolición total de este movimiento, sin presentar proyecciones y con los márgenes coloniales lisos, de forma similar al fenotipo descrito y observado en la cepa control *pilA*.

Esta disminución en la capacidad de realizar *twitching* por parte del mutante *chpA* (*cheA-like*) de *R. solanacearum* ha sido descrita en otras especies bacterianas como en *P. aeruginosa* y *X. fastidiosa* (Leech y Mattick 2006; Cursino *et al.* 2011); como ocurre con el fenotipo *twitching* abolido en el mutante *pilI* (*cheW-like*) en *P. aeruginosa* (Fulcher *et al.* 2010). Sin embargo, este efecto no es similar en todas las especies en las que se han identificado componentes del hipotético sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV. Por ejemplo, en *L. enzymogenes*, el mutante *pilI* sigue realizando un desplazamiento *twitching* normal (Zhou *et al.* 2017), hecho que indicaría diferencias estructurales en cuanto a los mecanismos reguladores del pili de tipo IV, dependiendo de la especie bacteriana.

Dado que varios estudios anteriores han reportado cómo la inactivación de genes específicos asociados a un tipo concreto de apéndice (flagelo o pili de tipo IV) puede afectar a la capacidad de desarrollar el otro tipo de movimiento (Bahar *et al.* 2011, 2009; Kilmury y Burrows 2018; Taguchi y Ichinose 2011), en este trabajo también se analizó el movimiento *swimming* de todos los mutantes construidos de *R. solanacearum* (Fig. 2, Artículo 2). Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes *pilI* y *chpA* exhiben un halo de crecimiento *swimming* similar al de la cepa salvaje, mientras que la cepa control *fliC* presenta una completa abolición de su motilidad dependiente de flagelo. Sorprendentemente, el mutante *pilA*, cepa deficiente de pili de tipo IV e incapaz de



## DISCUSIÓN

desplazarse por *twitching*, exhibe un incremento del halo de *swimming* en comparación con la cepa parental.

Para determinar si estos patrones de motilidad afectan a la quimiotaxis bacteriana, se realizaron los ensayos pertinentes, utilizando casaminoácidos como quimioatrayente para *R. solanacearum* y como cepa control al mutante *cheA* (Yao y Allen 2006) (Fig. 3, Artículo 2). Los resultados mostraron que, exceptuando la cepa control *cheA*, todos los mutantes construidos exhiben una respuesta de atracción frente al quimioatrayente similar a la obtenida en la cepa parental. El patrón de hipermotilidad *swimming*, observado en el mutante *pilA*, también ha sido descrito en otros mutantes de *R. solanacearum*; como por ejemplo en cepas carentes del regulador global PhcA (Brumbley y Denny 1990) o de MotN, presentando este último un fenotipo de respuesta quimiotáctica no alterado (Meng *et al.* 2011).

El efecto cruzado entre los desplazamientos dependientes de apéndices, flagelo y pili de tipo IV, probablemente se ha subestimado, ya que son pocos los estudios en los que se han llevado a cabo ensayos simultáneos de *swimming* y *twitching* sobre un mismo mutante. De los pocos estudios en los que se ha descrito la conexión entre ambos movimientos se encuentra el sistema PilS-PilR de *P. aeruginosa*, que regula la expresión de pili de tipo IV y cuya inactivación también causa una reducción en la motilidad *swimming* (Kilmury y Burrows 2018). Otro ejemplo es el descrito en *P. syringae*, donde la inactivación de los genes que codifican la pilina mayor PilA, la secretina PilO o las pilinas menores FimU y FimT, no solo produce una disminución en la capacidad de estos mutantes a desplazarse mediante *twitching*, sino que también provoca la abolición o disminución parcial de la motilidad *swimming* (Taguchi y Ichinose 2011).

Por consiguiente, las proteínas PilI y ChpA, análogas a CheW y CheA, respectivamente, y codificadas en un operón hipotéticamente asociado al sistema quimiotáctico regulador de pili de tipo IV, estarían implicadas en el desplazamiento *twitching*. Por otro lado, remarcar que la inactivación de *pilA*, subunidad principal formadora del pili de tipo IV, no solo afecta a la motilidad asociada a este apéndice, sino que también parece tener un efecto contrario en la motilidad dependiente de flagelo *swimming*, presentando un fenotipo de hipermotilidad sin efecto en la respuesta quimotáctica.

### **4.3. Caracterización de los mutantes deficientes en motilidad y su efecto en la patogénesis de *R. solanacearum***

El papel de los pili de tipo IV en la motilidad *twitching* y su implicación en la patogénesis ha sido reportado en muchas especies bacterianas (Josenhans y Suerbaum 2002). Además de mediar en la motilidad, los pili de tipo IV también participan en otros procesos esenciales en la virulencia bacteriana, como es la adhesión a superficies

bióticas o abióticas, la formación de biofilms y la captación de DNA exógeno, permitiendo al patógeno colonizar a su hospedador, resistir condiciones ambientales adversas y adquirir nuevos determinantes de virulencia mediante transferencia horizontal (Craig *et al.* 2004; Burrows 2012). Como se ha demostrado en estudios anteriores, la proteína PilA en *R. solanacearum* es esencial para la captación de DNA exógeno mediante transformación natural y para el desarrollo normal del biofilm (Kang *et al.* 2002). Bajo esta premisa, se realizaron ensayos para determinar la frecuencia de transformación natural y de cuantificación del biofilm en los mutantes *pilI*, *chpA* y *fliC*, utilizando el mutante *pilA* como cepa control.

Los resultados demostraron que tanto PilI como ChpA contribuyen a la competencia natural (Tabla 1, Artículo 3), presumiblemente a través de una regulación adecuada del pili de tipo IV, mientras que la proteína FliC no parece estar implicada en la captación de DNA exógeno. Con respecto a la formación de biofilm, los ensayos realizados mostraron que PilI y ChpA también desempeñan un papel esencial en este proceso, sin embargo, las mutaciones realizadas producen efectos contrarios (Fig. 4, Artículo 2). Mientras el mutante *chpA* exhibe una notoria disminución en su capacidad de formar biofilm, comparable al efecto producido por la inactivación de *pilA*, en el mutante *pilI* se observó un aumento significativo en la capacidad de formar biofilm.

Este fenotipo de movimiento *twitching* abolido junto al aumento significativo del biofilm formado también ha sido observado en mutantes *pilT*, siendo el producto de este gen el responsable de la retracción de los pili en distintas especies bacterianas (Chlebek *et al.* 2019). Estos resultados sugieren que los mecanismos reguladores del movimiento *twitching* y el desarrollo del biofilm no son del todo compartidos, pudiéndose obtener fenotipos de ambos procesos afectados de distinta manera. Por ejemplo, en especies del género *Xanthomonas*, la inactivación de *pilA* y *pilQ* desencadena una disminución en la motilidad *twitching*, sin embargo, la disminución del biofilm solo es significativa en el mutante *pilQ* (Das *et al.* 2009; Ryan *et al.* 2007). Por otro lado, en el mutante *fliR* de *Acidovorax citrulli*, cuyos desplazamientos *twitching* y *swimming* están inhibidos, no parece tener ningún efecto en la formación de biofilm (Bahar *et al.* 2009).

Así mismo, los resultados en la cuantificación del biofilm en el mutante *fliC* mostraron una reducción significativa similar a la del mutante *pilA*. Esto indica que los flagelos también contribuyen a este proceso en *R. solanacearum* GMI1000, tal como se había observado previamente en otras especies como *P. aeruginosa* (Belas 2014; O'Toole y Kolter 1998). Por el contrario, la inactivación de *fliC* y de otros genes implicados en la aerotaxis en la cepa K60 de *R. solanacearum* produce un aumento en el desarrollo del biofilm (Yao y Allen 2007), hecho que indica funciones específicas del pili de tipo IV dependiendo de la cepa.

Además del desplazamiento *twitching* y de la formación del biofilm, estudios previos han demostrado la implicación de los apéndices, tanto pili de tipo IV como flagelos, en la adhesión de varias especies bacterianas a raíces de plantas, siendo

## DISCUSIÓN

esenciales durante la primera etapa de contacto bacteria-planta (Wheatley y Poole 2018). Bajo esta premisa, en el presente trabajo se determinó si los mutantes construidos tienen afectado su capacidad de unión y adhesión a la superficie de raíces de tomatara. Los resultados de este ensayo mostraron que todos los mutantes relacionados con los pili de tipo IV (*pilI*, *chpA* y *pilA*) presentaron una unión a raíces significativamente menor que la obtenida con la cepa parental (Fig. 4, Artículo 2).

Por otro lado, en el mutante *fliC* también se observó una disminución en su capacidad de adhesión a raíces, lo que denota que tanto los pili de tipo IV como los flagelos promueven la adhesión entre las células de *R. solanacearum* y las raíces de tomate, tal y como ha sido demostrado en otros patógenos bacterianos de especies vegetales (Haiko y Westerlund-Wikström 2013; Rossi *et al.* 2016; Zheng *et al.* 2015). Sin embargo, la implicación del flagelo en la unión a raíces depende de la especie bacteriana tal y como se ha visto en algunos fitopatógenos. Por ejemplo, mientras que en especies como *Azospirillum brasilense*, los mutantes deficientes en flagelos son incapaces de unirse a raíces de trigo, en especies del género *Xanthomonas* no se observa esta deficiencia (Mhedbi-Hajri *et al.* 2011; Croes *et al.* 1993).

En *R. solanacearum*, al igual que en otras especies bacterianas, la relación entre los movimientos *twitching* y *swimming* con la capacidad patogénica de este microorganismo ha sido demostrada (Liu *et al.* 2001; Tans-Kersten *et al.* 2007; Siri *et al.* 2014; Addy *et al.* 2012; Ray *et al.* 2015). Este vínculo ha podido observarse en mutantes deficientes de componentes del flagelo, como FliC y FliM (Tans-Kersten *et al.* 2001), en mutantes deficientes de componentes del pili de tipo IV, como PilA y PilQ (Kang *et al.* 2002; Narulita *et al.* 2016), y también en proteínas implicadas en la regulación del movimiento *swimming*, como CheA y CheW (Yao y Allen 2006).

Para determinar el efecto de PilI y ChpA en la patogenicidad de *R. solanacearum*, junto a PilA y FliC, se utilizaron plantas de tomate como modelo de infección, mediante tres métodos de inoculación para determinar el papel de estas proteínas en distintas fases del proceso infeccioso. El primer ensayo, realizado sobre hojas de tomatara, puso de manifiesto que los mutantes analizados no sufren disminución alguna en su tasa de crecimiento (Fig. S5, Artículo 2). Este hecho puso de relieve que cualquier alteración en su capacidad patogénica que pudiera observarse en los siguientes ensayos no era atribuible a una alteración en su capacidad de proliferación a causa de las mutaciones introducidas. El segundo método consistió en la inoculación, mediante el riego, de la cepa de estudio sobre el suelo donde se encuentra creciendo la especie vegetal, permitiendo así determinar si las mutaciones provocadas en una cepa afectan su virulencia en etapas tempranas de la infección, como la adhesión y colonización de las raíces de la planta. El tercer método fue la inoculación directa de la cepa de estudio en el xilema de la planta, permitiendo determinar si un mutante sufre alteraciones en la virulencia que afecten etapas más tardías de infección, como puede ser la colonización de distintos tejidos vegetales o la secreción de componentes efectores.

Tras la realización de estos ensayos, los resultados obtenidos, mediante el método de riego, mostraron que los cuatro mutantes analizados (*pilI*, *chpA*, *pilA* y *fliC*) presentan una notable reducción en su capacidad de desarrollar las características propias de la marchitez bacteriana en plantas, en comparación con la cepa salvaje, en cuatro grados de significancia diferente (Fig. 5, Artículo 2). El mutante *pilA* es el que sufre una mayor atenuación en su virulencia, seguido de los mutantes *pilI* y *chpA*, ambos con un fenotipo intermedio, y por último el mutante *fliC*, con una disminución significativa más tenue.

Por otro lado, cuando las plantas de tomate son infectadas mediante el método de inoculación directa, solo el mutante *pilA* muestra diferencias significativas en la atenuación de su patogenicidad (Fig. 6, Artículo 2), tal y como se había descrito anteriormente (Kang *et al.* 2002). Conjuntamente, los recuentos bacterianos, medidos a lo largo del tiempo en los tallos de las plantas infectadas en ambos ensayos, fueron similares a los alcanzados por la cepa parental en todos los mutantes, exceptuando al mutante *pilA*, que presenta una reducción significativa en la colonización de las plantas (Fig. 5 y 6, Artículo 2).

Esta peculiaridad exhibida por el mutante *pilA* también fue observada en los ensayos de inoculación directa, en las que se utilizaron cepas mutantes marcadas con el operón *luxCDABE* bajo el control del promotor *hrpB* insertado en su genoma. Los resultados de este ensayo permitieron determinar la capacidad de propagación de los distintos mutantes a por los diferentes estratos de la planta infectada, pudiendo corroborar que solo el mutante *pilA* presentaba limitada dicha capacidad (Fig 7, Artículo 2). La inactivación de componentes estructurales o reguladores del pili de tipo IV y la posterior atenuación de la virulencia también ha sido descrito en otras bacterias fitopatógenas, como *P. syringae* (Taguchi y Ichinose 2011), *Xanthomonas* spp. (McCarthy *et al.* 2008; Das *et al.* 2009), *A. citrulli* (Bahar *et al.* 2009) y *X. fastidiosa* (Shi y Lin 2016; Cursino *et al.* 2011).

Globalmente, todos estos datos indicaran que los pili de tipo IV están implicados en un conjunto de procesos que, en comparación con el ejercido por los flagelos, son más importantes para la virulencia de *R. solanacearum*. En el caso de *FliC*, estos resultados obtenidos demuestran por primera vez la implicación de los flagelos de *R. solanacearum* en la adhesión a raíces y en la capacidad de formar biofilms.

Por otro lado, los datos obtenidos demuestran que *PilI* y *ChpA*, proteínas homólogas a componentes del sistema quimiotáctico asociado a pili de tipo IV en *P. aeruginosa*, son esenciales no solo para el desplazamiento *twitching*, sino también para la patogénesis de *R. solanacearum* al inicio de su etapa infectiva, así como para otros procesos relacionados con la virulencia bacteriana, como la capacidad de transformar DNA exógeno y de formar biofilm.

## DISCUSIÓN

Por último, aunque todos los mutantes relacionados con los pili de tipo IV exhiben una atenuación en los fenotipos de motilidad *twitching*, eficiencia de transformación, formación de biofilm, adhesión a raíces y virulencia, los patrones atenuados mostrados por los mutantes *pilI* y *chpA* son en general más leves que los observados en el mutante *pilA*. Esto puede explicarse por el hecho de que, mientras PilA es la subunidad mayor de pilina, estructuralmente esencial para la biosíntesis del pili de tipo IV, PilI y ChpA son proteínas reguladoras de este apéndice, por lo que su ausencia no supondría un efecto tan adverso como el de PilA.

# **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

1. En *A. baumannii* la inactivación de los genes que codifican las proteínas RecA y A1S\_2813 (CheW-like) provoca la disminución del *surface associated-motility*, así como de la respuesta quimiotáctica y de la virulencia.
2. La interacción de las proteínas RecA y A1S\_2813 (CheW-like) de *A. baumannii*, a través del dominio proteico de CheW-like que contiene el residuo aminoacídico lisina 97, está involucrada en el *surface-associated motility*, la respuesta quimiotáctica y la virulencia.
3. *R. solanacearum* presenta un operón homólogo al *cluster IV* de *P. aeruginosa* asociado a la regulación de pili de tipo IV cuyos genes están implicados en el *twitching* y en la respuesta quimiotáctica.
4. El operón asociado a pili de tipo IV en *R. solanacearum* incluye los genes *pilI* y *chpA*, que participan en la motilidad *twitching*, la transformación natural, la formación de biofilm, la adhesión a raíces de tomatara y la patogénesis durante las primeras fases de la infección.
5. En *R. solanacearum*, la subunidad de pilina (PilA) está involucrada en la motilidad *swimming*, mientras que la subunidad de flagelina (FliC) participa en los procesos de formación del biofilm y en la adhesión a raíces de tomatara.





## **6. ANEXOS**



Manuscrito enviado para su publicación en la revista *Virulence*

**Title:** Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*

**Authors:** Jordi Corral<sup>1</sup>, María Pérez-Varela<sup>2</sup>, Miquel Sánchez-Osuna<sup>1</sup>, Pilar Cortés<sup>1</sup>, Jordi Barbé<sup>1\*</sup> and Jesús Aranda<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA.

\*Co-senior authors

#Corresponding author: [jesus.aranda@uab.cat](mailto:jesus.aranda@uab.cat)

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is a multidrug-resistant pathogen of increasing clinical importance worldwide. Motile strains of this bacterium are able to move via one or both of two types of motility: (i) twitching, driven by type IV pili, and (ii) surface-associated motility, an appendage-independent form of movement. *A. baumannii* strain MAR002 possesses both twitching and surface-associated motility. In this study, we isolated spontaneous rifampin-resistant mutants of strain MAR002 in which point mutations in the *rpoB* gene were identified that resulted in an altered motility pattern. Transcriptomic analysis of mutants lacking twitching motility, surface-associated motility, or both led to the selection of deregulated genes within each motility phenotype, based on their level of expression and their biological

function. Construction of the corresponding knockout mutants revealed several genes involved in the motility of *A. baumannii* strain MAR002: two of them involved in twitching (encoding a minor pilin subunit and an RND (Resistance Nodulation Division) component), one in surface-associated motility (encoding an amino acid permease) and eight in both (encoding RND and ABC components, the energy transducer TonB, the porin OprD, the T6SS component TagF, a transcriptional regulator, a sugar dehydrogenase and a putative pectate lyase). Virulence assays showed a reduced pathogenicity in mutants with impairments in both types of motility or only in surface-associated motility. By contrast, the virulence of twitching-affected mutants was similar to that of the wild-type strain. These results shed light on the key role of surface-associated motility and the limited role of twitching motility in the pathogenicity of *A. baumannii*.

**Keywords:** *A. baumannii*, twitching, surface-associated motility, virulence

## INTRODUCTION

*Acinetobacter baumannii* is a gram-negative bacterium that causes nosocomial infections in hospitals worldwide, mainly ventilator-associated and bloodstream infections in critically ill patients<sup>1</sup>. The pathogenic success of this bacterium can be attributed to its capacity to survive in health-care environments, its potential to acquire and develop antimicrobial resistance and to its virulence factors<sup>2</sup>. Due to the increasing clinical importance of multidrug-resistant bacteria, the World Health Organization created a priority list of antibiotic-resistant bacterial species, including *A. baumannii*, to encourage research into effective drugs and the development of novel therapeutic strategies<sup>3</sup>.

While the name *Acinetobacter* comes from the Greek word “*akineto*,” translated as “non-motile,” many strains of *A. baumannii* are in fact motile, through two different mechanisms: twitching motility and surface-associated motility. Twitching motility is a coordinated multicellular movement driven by the extension, attachment, and retraction of type IV pili<sup>4,5</sup>. It is associated with surface attachment and biofilm formation in a process that includes *pilA*, *pilD* and *pilT*<sup>4,6</sup> and the GacS/GacA two-component regulatory system<sup>7</sup>. Surface-associated motility is an appendage-independent form of movement characteristic of some *A. baumannii* clinical isolates and probably driven by the extrusion of extrapolymeric substances<sup>8,9</sup>. This type of motility is associated with the synthesis of 1,3-diaminopropane<sup>8</sup>, lipooligosaccharide production<sup>9</sup>, and proteins from at least five of the six known efflux pump superfamilies<sup>10</sup>. Its regulation includes quorum sensing<sup>11</sup>, cyclic diguanylate<sup>12</sup>, blue-light sensing<sup>13</sup>, CheW and CheA chemotactic analogs<sup>14,15</sup>, and the EnvZ/OmpR two-component system<sup>16</sup>. The capacity to move through twitching or surface-associated motility depends on the *A. baumannii* strain. Thus, strain ATCC 17978 exhibits only surface-associated motility, strain AYE only twitching, strain MAR002 is capable of both, and other strains, such as ATCC 19606, are non-motile<sup>17,18</sup>.

In many different bacterial species, virulence is closely related to motility, as is the case for *A. baumannii*<sup>2,19</sup>. This association suggests that bacterial motility can be exploited as a specific therapeutic antibacterial target, with the aim of either cure or disease prevention<sup>20</sup>. Although twitching motility has not been linked directly to

virulence<sup>2</sup>, a key role for surface-associated motility in the virulence of *A. baumannii* has been demonstrated in several reports<sup>8,10,15,21,22</sup>.

Point mutations in the bacterial *rpoB* gene, encoding the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase, confer rifampin resistance and cause substantial changes in the transcriptional profile of bacterial cells, by affecting the enzyme's affinity for several promoters<sup>23-25</sup>. In a previous study conducted in *A. baumannii* strain ATCC 17978, which possesses only surface-associated motility, we showed that some point mutations in its *rpoB* gene also impair both motility and virulence<sup>22</sup>. A transcriptional analysis of these spontaneous rifampin-resistant mutants led to the identification of six genes encoding proteins homologous to the transporters and metabolic enzymes involved in the surface-associated motility of *A. baumannii*<sup>22</sup>.

In the present work, spontaneous rifampin-resistant mutants of *A. baumannii* strain MAR002, characterized by both twitching and surface-associated motility, were isolated. Three different motility-related phenotypes were identified among the mutants: (i) twitching deficient, (ii) surface-associated motility deficient and (iii) lacking both movement phenotypes. A transcriptional analysis of these mutants allowed us to identify genes involved in each or both types of motility. Experiments with the respective knockout mutants revealed the involvement of these genes in virulence as well.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *A. baumannii* strain MAR002 and

*Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium<sup>26</sup> with shaking at 180 rpm. The pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, catalog number 451245) and pBAV1Gm-T5-gfp plasmids were used for mutant construction and complementation, respectively (Table 1). When needed, rifampin (50 mg/L), kanamycin (50 mg/L), or gentamicin (20 mg/L for *E. coli* and 40 mg/L for *A. baumannii*) was added to the growth medium. *A. baumannii* growth was monitored using bacterial cultures in LB broth inoculated with an overnight culture at a dilution of 1:100 and then incubated at 37°C with shaking at 180 rpm. The optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of the cultures was measured hourly. To obtain rifampin-resistant (Rif<sup>r</sup>) mutants, saturated cultures of wild-type (WT) *A. baumannii* strain MAR002 were plated on rifampin-containing LB plates and incubated at 37°C for 24 h.

**Motility assays.** The assays were conducted on fresh-agarose plates (0.5% tryptone, 0.25% NaCl, and 0.3% low agarose; Nzytech), prepared on the day of the experiment and using bacterial cultures at the early stationary phase. A Kolle loop was used to inoculate the plates, gently swirling the medium until the plastic surface of the plate was covered, with bacterial growth taking place at the agarose-plastic interface. The inoculated plates were incubated at 30°C for 16–24 h. Twitching movement was observed at the agarose-plastic interface as a faint bacterial growth halo, and surface-associated motility on the plate surface as a densely branched bacterial halo with irregular edges. All assays were carried out at least three times in independent experiments, each set up in triplicate, and representative images were obtained using a ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ system (Bio-Rad).



***Galleria mellonella* killing assays.** The virulence of *A. baumannii* strains was determined using the *G. mellonella* (wax worm) model, as described previously<sup>27</sup>. Briefly, ten caterpillars were inoculated via the hemocoel with 10 µl of the corresponding *A. baumannii* strain ( $\sim 10^5$  CFU). The inoculants were prepared from exponentially growing cultures ( $OD_{600} = 0.5$ ) corresponding to  $\sim 10^8$  CFU/ml and previously diluted in phosphate-buffered saline (PBS). The concentration of each inoculum was confirmed by colony counts on LB plates. As a negative control, the same number of caterpillars was inoculated with 10 µl of PBS. The control and treated caterpillars were incubated at 37°C in the dark and their survival was checked every 12 h for a total of 96 h. All *G. mellonella* killing experiments were performed at least three times.

**RNA extraction.** A High Pure RNA isolation kit (Roche) was used to isolate RNA from cultures of *A. baumannii* strain MAR002 and the corresponding Rif<sup>r</sup> mutants, according to the manufacturer's instructions. Prior to RNA extractions, bacteria growing in LB medium until the mid-exponential growth phase ( $OD_{600} = 0.4$ ) were pelleted and then treated with lysozyme (50 mg/mL; resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer) for 10 min at 37°C. To remove DNA contaminants, all RNA samples were incubated with DNase Turbo (Ambion). The removal of DNA was confirmed in PCR mixtures using RNA samples.

**RNA-seq.** Transcriptomic analysis of *A. baumannii* strain MAR002 WT and the Rif<sup>r</sup> mutants was performed by Allgenetics (A Coruña, Spain). Briefly, each strain was grown in LB until an  $OD_{600}$  of 0.4–0.6, pelleted, and then stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used in RNA-seq. RNA was extracted as described above and quality-checked in a

2100 Bioanalyzer (Agilent). To prepare each library, the ribosomal RNA was removed using the Ribo-Zero Plus rRNA depletion kit (Illumina). The RNA was then processed using the TruSeq Stranded mRNA library prep kit (Illumina), with the fragment size distribution checked using the High Sensitivity DNA kit (Agilent). The libraries were quantified using the Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific) and pooled in equimolar amounts according to the Qubit results. The resulting pool was sequenced in a HiSeq 4000 PE100 lane (Illumina).

After RNA-seq, the quality of the raw sequencing data was checked, and the trimmed and preprocessed reads were mapped to the *A. baumannii* MAR002 reference genome (NZ\_JRHB01000001.1 and NZ\_JRHB01000002.1) using STAR 2.6.0a<sup>28</sup>. Read counts were quantified, normalized, and filtered following the trimmed mean of M-values method<sup>29</sup>. Differential gene expression between *A. baumannii* MAR002 WT and the corresponding Rif<sup>r</sup> mutants was analyzed using the Bioconductor packages NOISeq and NOISeqBIO. The expression of a gene was considered to be induced or repressed when the fold change of the Rif<sup>r</sup> mutants compared to the parental strain was  $\geq 2$  or  $\leq -2$ , respectively, and the *P* value of the difference compared to the control was  $< 0.05$ . A Venn diagram was constructed using the BxToolBox program available at bioinform.com.

**Gene expression.** To corroborate the transcriptomic data, gene expression was determined by RT-qPCR as previously described<sup>30</sup>. RT-qPCR was conducted using Lightcycler RNA Master SYBR green I (Roche) and a Lightcycler 480 instrument (LC480; Roche) according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides listed in Table S1 were used to validate the expression of the selected genes

identified by RNA-seq. The relative mRNA concentrations of the genes of interest were determined according to a standard curve generated by amplifying an internal fragment of the *gyrB* gene that was not induced under the tested growth conditions. The expression factor was calculated as the ratio of the mRNA concentration of the target gene as expressed by the WT versus by the studied mutant strain.

***A. baumannii* knockout construction and complementation.** Gene inactivation was carried out as previously described<sup>31</sup>. Briefly, an internal fragment of the target gene from *A. baumannii* strain MAR002 WT strain was PCR-amplified using the appropriate primers (Table S1). The resulting fragment was cloned into the pCR-BluntII-TOPO plasmid (Invitrogen), introduced in *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroporation, and selected on kanamycin-containing LB plates. The purified plasmid was then introduced into WT *A. baumannii* by electroporation and the resulting transformants were selected on kanamycin-containing plates. Recombinant clones were confirmed by sequencing (Macrogen) of the PCR products using the appropriate primers. The stability of the *A. baumannii* knockouts was determined in ten passages without selective pressure, with colony resuspension carried out every 24 h, followed by colony counting on LB plates with and without kanamycin at the last passage.

For mutant complementation, the target gene was cloned into the pBAV1Gm-T5-gfp plasmid using the appropriate primers (Table S1), which included *Xba*I restriction sequences. The pBAV1Gm-T5-gfp derivative plasmid was generated from the pBAV1K-T5-gfp vector (a gift from Ichiro Matsumura; Addgene plasmid 26702), in which the kanamycin sequence is substituted by the gentamicin cassette

from the pVRL1 plasmid<sup>32</sup>. The recombinant plasmid was introduced by electroporation, firstly into *E. coli strain* DH5 $\alpha$  and then, once the correct construct had been verified by PCR and sequencing (Macrogen), into the corresponding *A. baumannii* knockout. The complemented mutants were selected on kanamycin- and gentamicin-containing plates.

**Statistical analysis.** Survival curves obtained in the *G. mellonella* killing assays were plotted using the Kaplan-Meier method and differences in survival were calculated using the log-rank test. Statistical significance was defined as a *P* value < 0.05.

## RESULTS

### **Twitching and surface-associated motility profiles of Rif<sup>r</sup> mutants of *A. baumannii* strain MAR002 and the effects on virulence**

As noted above, mutations in the *rpoB* gene of *A. baumannii* ATCC 17978 change the promoter affinity of the bacterium's RNA polymerase, which in turn affects several phenotypic properties including motility<sup>22</sup>. To analyze whether mutations in the *rpoB* gene of *A. baumannii* MAR002, a strain able to move through twitching and surface-associated motility, affect both motility systems, saturated cultures of this strain were plated in the presence of rifampin. Several spontaneous *A. baumannii* MAR002 Rif<sup>r</sup> mutants were isolated and their motility patterns were evaluated.

Four different movement phenotypes were identified in the mutants: (i) impaired twitching motility (T<sup>-</sup>S<sup>+</sup>), (ii) impaired surface-associated motility (T<sup>+</sup>S<sup>-</sup>), (iii)

impairments in both movement types ( $T^-S^-$ ) and (iv) a WT motility pattern. A representative from each phenotype was selected for further analysis and its *rpoB* gene was sequenced (Fig. 1A). To confirm that the motility impairments were due to point mutations located in the *rpoB* gene, further spontaneous Rif<sup>r</sup> mutants were isolated in which the specific point mutations in the *rpoB* sequence were located in the same positions as obtained previously. These mutants showed the same movement impairments (data not shown).

To evaluate the role of each form of motility in the pathogenesis of *A. baumannii* MAR002, the virulence of each of the three types of Rif<sup>r</sup> mutant with altered motility ( $T^-S^-$ ,  $T^-S^+$  and  $T^+S^-$ ) was determined through *G. mellonella* killing assays (Fig. 1B). The results showed that, compared to the WT strain, the virulence of strains with impaired surface-associated motility ( $T^-S^-$  and  $T^+S^-$ ) was significantly ( $P < 0.05$ ) reduced whereas this was not the case for the Rif<sup>r</sup> mutant with impaired twitching motility alone ( $T^-S^+$ ). In both groups of surface-associated motility mutants, > 50% survival was observed after 96 h of incubation (Fig. 1B).

#### **Identification of *A. baumannii* strain MAR002 Rif<sup>r</sup> genes involved in motility**

Global gene expression of Rif<sup>r</sup> mutants with altered motility ( $T^-S^-$ ,  $T^-S^+$  and  $T^+S^-$ ) was characterized by numerous significant changes compared to that of WT *A. baumannii* MAR002. Based on two-fold differences in the up- or down-regulation of gene expression, 771 genes were differentially expressed in the  $T^-S^-$  strain, with 282 genes up-regulated and 489 down-regulated genes (Table S2); 970 genes were differentially expressed in the  $T^-S^+$  strain: 489 of which were up-regulated and 481 down-regulated; and 700 genes were differentially expressed in the  $T^+S^-$  strain, of

which 285 were up-regulated and 415 down-regulated (Table S2). These results were validated in a RT-qPCR analysis comparing selected down-regulated genes from each of the three *Rif<sup>r</sup>* mutants with the respective WT genes from the parental strain (Fig. S1).

To obtain insights into the involvement of the deregulated genes in the two motility systems, they were grouped according to the presence or absence of these genes in the *Rif<sup>r</sup>* mutants as determined from the RNA-seq analyses (Fig. 2). These comparisons revealed that 115 genes were shared by strains with impaired twitching motility ( $T^-S^+$  and  $T^-S^-$ ; T group) and 202 by strains with impaired surface-associated motility ( $T^+S^-$  and  $T^-S^-$ ; S group). Thus, these groups of genes, along with those exclusive to strain  $T^-S^-$  (227 genes) represented genes hypothetically involved in twitching motility (T group), in surface-associated motility (S group) or both (TS group) (Table S3).

Eighteen genes (6 per group) from the three groups (T, S, and TS) were selected to study their roles in the different types of *A. baumannii* motility, based on their level of expression and their functional group, with the latter including cell wall/membrane/envelope biogenesis, motility, transport, metabolism and transcription (Table 2).

### **Construction and motility characterization of *A. baumannii* knockout mutants of selected genes**

To assess whether the selected genes (Table 2) played a role in motility, knockout mutants were constructed (Fig. S2) and inoculated onto fresh-agarose motility

plates. The results showed that knockout of the genes encoding the RND (Resistance Nodulation Division) component AdeK and the minor prepilin Pile, belonging to the T and TS group, respectively, produced a loss in twitching motility, without effects on surface-associated motility (Fig. 3). Conversely, inactivation of the permease encoded by the *LH92\_RS05285* gene, belonging to the S group, abolished surface-associated motility, without an effect on twitching motility (Fig. 3). A complete loss of both twitching and surface-associated motility was observed in knockouts with disruption in genes belonging to the T group, including those encoding the energy transducer TonB, the porin OprD, the type VI secretion system component TagF, a transcriptional regulator and a putative lyase; in those belonging to the S group, including those encoding an ABC transporter component and a dehydrogenase; and in the gene belonging to the TS group, encoding an RND component (Fig. 3).

The remaining knockout mutants (Table 2) showed no alterations in their motility and their behavior was similar to that of the WT strain (Fig. 3). Since the growth curves of all mutants grown in LB broth were comparable to that of the parental strain (data not shown), the observed impairments in motility could not be attributed to reductions in the bacterial growth rate.

To demonstrate a direct relation between specific gene disruptions and subsequent movement patterns, the pBAV1Gm-T5-gfp plasmid, carrying the corresponding WT gene, was introduced into all mutants with impaired motility. As expected, complementation restored the parental phenotype in all cases (Fig. S3).

### **Impaired surface-associated motility but not twitching motility significantly reduce *A. baumannii* virulence**

The above-described knockout mutants with altered motility were then studied for their pathogenicity, determined in *G. mellonella* killing assays. Mutants lacking genes involved in surface-associated motility showed a significant ( $P < 0.05$ ) reduction in their virulence, independent of their twitching behavior (Fig. 4). Specifically,  $> 75\%$  of worms inoculated with any of the knockout mutants with impairments in both twitching and surface-associated motility (Fig. 4) and  $\sim 60\%$  of the worms inoculated with the *LH92\_RS05285* mutant, with impaired surface-associated motility only, survived until the end of the 96-h experiment (Fig. 4). By contrast, virulence was not significantly affected in knockout mutants with impaired twitching but not surface-associated motility (Fig. 4). Likewise, knockout mutants with a motility pattern similar to that of the MAR002 WT strain did not show a significant reduction in their virulence, as  $< 25\%$  of the inoculated worms survived. Finally, when the worms were inoculated with the corresponding complemented strains, survival of the larvae was reduced in all cases to the level determined in the WT strain, indicating a restoration of virulence (Fig. 4).

## **DISCUSSION**

The motility of *A. baumannii* involves two different motility systems: twitching and surface-associated motility. Depending on the strain, one, both or neither of these movement types is expressed<sup>17,18</sup>. *A. baumannii* MAR002, a virulent clinical strain, is able to move through both twitching and surface-associated motility<sup>33,34</sup>. In previous work, we showed that spontaneous rifampin-resistant mutants of *A. baumannii* strain ATCC 17978 carried point mutations in the  $\beta$ -subunit of the RNA



polymerase that altered the transcriptional pattern of genes involved in surface-associated motility<sup>22</sup>. In this study, the isolation of spontaneous Rif<sup>r</sup> mutants in *A. baumannii* strain MAR002 included strains with phenotypical changes in surface-associated motility and/or twitching motility (Fig 1A). Rifampin inhibits DNA-dependent RNA synthesis through its interaction with the RpoB subunit. Mutations in the *rpoB* gene that produce conformational changes in the region of rifampin interaction reduce the affinity of RpoB for this antimicrobial and thus confer resistance. Moreover, the new conformation of RpoB modifies the polymerase's affinity for some promoters, causing changes in gene expression<sup>35</sup>. In other bacterial species such as *E. coli* or *Pseudomonas aeruginosa*, mutations in the *rpoB* gene produce pleiotropic effects in processes that include, sporulation<sup>36</sup>, the stringent response<sup>24,37</sup>, the motility and the virulence<sup>23,38</sup>.

The connection between motility and virulence has been previously reported in several pathogenic bacterial species, among them flagellated bacteria<sup>19,20</sup>, bacteria displaying type IV pili<sup>39</sup> and bacteria with appendage-independent motility<sup>8,40,41</sup>. In the *A. baumannii* MAR002 Rif<sup>r</sup> mutants lacking twitching motility the virulence was not decreased, unlike those mutants deficient in surface-associated motility (Fig 1B). Transcriptomic studies have shown an increase in the expression of genes related to the synthesis of type IV pili during the growth of *A. baumannii* in human serum, thus demonstrating the importance of these appendages during bacteremia<sup>2,7,42</sup>.

The transcriptional analysis of Rif<sup>r</sup> mutants with the three types of altered motility (Table S2) revealed three groups of genes putatively assumed to be involved in

either one or the other or both motility systems (Fig. 2). In *P. aeruginosa*, a phylogenetic neighbor of *A. baumannii*, transcriptomic studies of motile versus non-motile cells revealed an overexpression of genes involved in metabolism and secretion during the development of motility by this species<sup>43,44</sup>. Given the pleiotropic effects produced by *rpoB* gene mutations and the complexity of motility network regulation, the wide range of deregulated genes identified in the transcriptomic analysis was not surprising. The identified genes included those involved in the above-mentioned processes<sup>22,37,45</sup> as well as genes that co-regulate motility and other biological processes under the control of key bacterial regulators, such as cyclic diguanylate<sup>12,46</sup>, chemotaxis<sup>14,15,47</sup>, and two-component systems<sup>16,48</sup>.

Based on the transcriptional data, 18 down-regulated genes belonging to the three gene groups were determined to be inactivated (Table 2). In 11 of these derivative knockout mutants, twitching and/or surface-associated motility were reduced (Fig. 3). However, although the deregulated genes could be classified according to their putative involvement in twitching motility (T group), surface-associated motility (S group), or both (TS group), not all knockouts exhibited the expected phenotype. These results can be explained by the wide range of deregulated genes that lead to a disturbed motility<sup>24,45</sup>, as shown by the transcriptomic data (Table S2), whereas in the knockout mutants only one of these genes was inactivated.

In the virulence assays, the pathogenicity of the knockout mutants was similar to that of the Rif<sup>r</sup> mutants and could be linked to their motility pattern. Specifically, the pathogenicity of the mutants with a phenotype similar to that of the T<sup>-</sup>S<sup>-</sup> or T<sup>+</sup>S<sup>-</sup> strains but not the T<sup>-</sup>S<sup>+</sup> strain was significantly attenuated (Figs. 3 and 4),

highlighting the role of surface-associated motility over twitching in the virulence of *A. baumannii*. This finding is consistent with the results of previous studies of *A. baumannii* strain ATCC 17978<sup>8,15,21,22</sup>. The more modest role of twitching motility in the pathogenesis of *A. baumannii* suggests that this type of movement, driven by type IV pili, is directed towards surface attachment to ensure the persistence of this bacterium<sup>2,4,6</sup>.

In the *A. baumannii* MAR002 Rif<sup>r</sup> mutants, all of the down-regulated genes identified in this work encode putative proteins related to cell envelope biogenesis, transporters and metabolic enzymes, i.e., functions that play important roles in motility and/or virulence. For instance, *LH92\_RS15870* was shown in our study and in others to encode the prepilin PilE, involved in type IV pili biogenesis and twitching motility<sup>49,50</sup>. By contrast, the minor pilin PilW encoded by the *LH92\_RS02585* gene does not contribute to either the motility or the pathogenicity of *A. baumannii*, unlike in *P. aeruginosa*<sup>51</sup>. We also studied three RND efflux pump subunits encoded by: *LH92\_RS16130*, a periplasmic adaptor involved in both motility systems of *A. baumannii*; *LH92\_RS13935* (*adeK*), an outer membrane subunit involved in twitching but not in surface-associated motility; and *LH92\_RS12010* (*adeH*), whose inactivation did not affect motility. The involvement of efflux pumps from different superfamilies in surface-associated motility has been attributed to their role in the secretion of extrapolymeric substances<sup>8-10,52</sup>. Interestingly, AdeK (encoded by *LH92\_RS13935*) is the first RND component reported in *Acinetobacter* spp. that participates in both surface-associated and twitching motility, probably through the secretion of extrapolymeric substances. Similarly, *Myxococcus xanthus* requires extracellular polysaccharides

for attachment and for the retraction of type IV pili<sup>53</sup>. Among the other transporter proteins, our results showed that, like the permeases described in ATCC strain 17978<sup>22</sup>, the amino acid permease encoded by *LH92\_RS05285* participates in the surface-associated motility and subsequent virulence of *A. baumannii* strain MAR002.

Other proteins described in this study that were shown to participate in both motility systems were a sulfate ABC transporter component, a putative pectate lyase, and a sugar dehydrogenase, encoded by the genes *LH92\_RS16065*, *LH92\_RS13540* and *LH92\_RS17175*, respectively. Metabolic enzymes and transporters promote different types of motility, both in *A. baumannii*<sup>22</sup> and in other bacterial species, such as *Pseudomonas* spp.<sup>54</sup>, *E. coli*<sup>55</sup>, and *Xanthomonas oryzae*<sup>56</sup>. Altered motility was also observed in the *LH92\_RS04440* mutant, lacking the energy transducer TonB, whose homolog in *Aeromonas hydrophila* is involved in metal uptake, motility, and virulence<sup>57,58</sup>.

The *A. baumannii* gene *LH92\_RS06715* encodes an IclR family transcriptional regulator, involved in protocatechuate catabolism in *Acinetobacter baylyi* strain ADP1<sup>59</sup>. In other bacterial species this protein is associated with multidrug resistance, the degradation of aromatics, the inactivation of quorum sensing signals, and sporulation<sup>60</sup>. The inactivation of this gene in *A. baumannii* strain MAR002 led to decreases in both twitching and surface-associated motility, as did inactivation of the genes *LH92\_RS05405* and *LH92\_RS06300*, encoding the OprD porin and the T6SS protein TagF, respectively. The OprD porin of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* have been related to metabolic transport and outer membrane

stability<sup>61–63</sup>. The expression of TagF, whose role in motility has not been previously reported, is increased in the presence of mucin, as also demonstrated for other genes encoding proteins related to adherence in *A. baumannii* ATCC strain 19606<sup>64</sup>.

In summary, this work is the first to compare the molecular mechanisms of twitching and surface-associated motility in an *A. baumannii* strain capable of both movement types. Identified genes are mainly involved in cell envelope biogenesis, transport and metabolism, but also clearly associated with motility and virulence. Specifically, genes encoding the minor pilin PileE and a RND efflux pump were shown to be associated with twitching motility, a gene encoding an amino acid permease with surface-associated motility, and genes encoding various metabolic enzymes, an efflux pump, and proteins related to the cell membrane with both types of motility. The transcriptomic profiles described herein constitute a starting point for further investigations of the molecular basis of the pathogenic processes of this multidrug-resistant bacterium and thus for the development of new therapeutic agents aimed at novel targets.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Joan Ruiz (UAB) and Susana Escibano (UAB) for their excellent technical assistance, the Germán Bou lab (Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Spain) for the *A. baumannii* MAR002 strain, and Paolo Visca (University Roma Tre, Rome, Italy) for kindly providing plasmid pVRL1. This study was supported by a grant (BIO2016-77011-R) from the Ministerio de Economía y Competitividad. The funders had no role in the study design, data collection or data

interpretation, nor the decision to submit the work for publication. J.A. is a Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain.

## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest is reported by the authors.

## REFERENCES

1. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin Microbiol Rev 2017;30(1):409-447.
2. Harding CMM, Hennon SWW, Feldman MFF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat Rev Microbiol 2018;16(2):91-102.
3. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 2018;18(3):318-327.
4. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS, Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. MBio 2013;4(4):e00360-13.
5. Chlebek JL, Hughes HQ, Ratkiewicz AS, Rayyan R, Wang JCY, Herrin BE, Dalia TN, Biais N, Dalia AB. PilT and PilU are homohexameric ATPases

- that coordinate to retract type IVa pili. PLoS Genet 2019;15(10):e1008448.
6. Dhabaan GN, Abubakar S, Cerqueira GM, Al-Haroni M, Pang SP, Hassan H. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. Antimicrob Agents Chemother 2015;60(3):1370-1376.
  7. Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A, Peleg AY. A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. J Infect Dis 2014;210(1):46-55.
  8. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, *et al.* Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol 2012;302(3):117-128.
  9. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, Zurawski D V. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. J Microbiol 2012;50(3):434-443.
  10. Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. Antimicrob Agents Chemother 2019;63(3):e02190-18.
  11. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiology 2011;157(9):2534-2544.
  12. Ahmad I, Nygren E, Khalid F, Myint SL, Uhlin BE. A cyclic-di-GMP

- signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Sci Rep* 2020;10(1):1991.
13. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, Actis LA. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol* 2010;192(24):6336-6345.
  14. Chen R, Lv R, Xiao L, Wang M, Du Z, Tan Y, Cui Y, Yan Y, Luo Y, Yang R, *et al.* AIS\_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *Microbiologyopen* 2017;6(5):e00510.
  15. Corral J, Pérez-Varela M, Barbé J, Aranda J. Direct interaction between RecA and a CheW-like protein is required for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978. *Virulence* 2020;11(1):315-326.
  16. Tipton KA, Rather PN. An ompRenvZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol* 2017;199(3):e00705-16.
  17. Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2011;323(1):44-51.
  18. Skerniškyte J, Krasauskas R, Péchoux C, Kulakauskas S, Armalyte J, Sužiedeliene E. Surface-related features and virulence among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to international clones I and II. *Front*



- Microbiol 2019;9:3116.
19. Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;291(8):605-614.
  20. Erhardt M. Strategies to block bacterial pathogenesis by interference with motility and chemotaxis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;398:185-205.
  21. Eijkelkamp BA, Strocher UH, Hassan KA, Elbourne LDH, Paulsen IT, Brown MH. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun* 2013;81(7):2574-2583.
  22. Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Bou G, Aranda J, Barbé J. Mutations in the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2017;85(8):e00327-17.
  23. Alifano P, Palumbo C, Pasanisi D, Talà A. Rifampicin-resistance, *rpoB* polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *J Biotechnol* 2015;202:60-77.
  24. Qi Q, Preston GM, Maclean RC. Linking system-wide impacts of RNA polymerase mutations to the fitness cost of rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 2014;5(6):e01562.
  25. Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988;202(1):45-58.
  26. Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, NY; 1972.

27. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;(6)53:2605-2609.
28. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29(1):15-21.
29. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11(3):R25.
30. Aranda J, Garrido ME, Cortés P, Llagostera M, Barbé J. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 2008;76(4):1590-1598.
31. Aranda J, Poza M, Pardo BG, Rumbo S, Rumbo C, Parreira JR, Rodriguez-Velo P, Bou G. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2010;10:279.
32. Lucidi M, Runci F, Rampioni G, Frangipani E, Leoni L, Visca P. New shuttle vectors for gene cloning and expression in multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(4):e02480-17.
33. Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 2015;3(4):e00824-15.
34. Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck

- EJ, Edelmann RE, Beceiro A, Vázquez-Ucha JC, Valle J, *et al.* Analysis of the role of the *LH92\_11085* gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* 2016;7(4):443-55.
35. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001;104(6):901-912.
36. Cai XC, Xi H, Liang L, Liu JD, Liu CH, Xue YR, Yu XY. Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects. *Front Microbiol* 2017;8:178.
37. Chatnaparat T, Li Z, Korban SS, Zhao Y. The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its survival on tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 2015;28(7):776-89.
38. Gliniewicz K, Wildung M, Orfe LH, Wiens GD, Cain KD, Lahmers KK, Snekvik KR, Call DR. Potential mechanisms of attenuation for rifampicin-passaged strains of *Flavobacterium psychrophilum*. *BMC Microbiol* 2015;15:179.
39. Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(5):363-78.
40. Veith PD, Glew MD, Gorasia DG, Reynolds EC. Type IX secretion: the generation of bacterial cell surface coatings involved in virulence, gliding motility and the degradation of complex biopolymers. *Mol Microbiol* 2017;106(1):35-53.

41. Pérez-Pascual D, Rochat T, Kerouault B, Gómez E, Neulat-Ripoll F, Henry C, Quillet E, Guijarro JA, Bernardet JF, Duchaud E. More than gliding: involvement of GldD and GldG in the virulence of *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Microbiol* 2017;8:2168.
42. Jacobs AC, Sayood K, Olmsted SB, Blanchard CE, Hinrichs S, Russell D, Dunman PM. Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64(3):403-12.
43. Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008;190(8):2671-2679.
44. Tremblay J, Déziel E. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 2010;11:587.
45. Karthik M, Meenakshi S, Munavar MH. Unveiling the molecular basis for pleiotropy in selected rif mutants of *Escherichia coli*: possible role for tyrosine in the Rif binding pocket and fast movement of RNA polymerase. *Gene* 2019;713:143951.
46. Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* 2017;15(5):271-284.
47. Waite AJ, Frankel NW, Emonet T. Behavioral variability and phenotypic diversity in bacterial chemotaxis. *Annu Rev Biophys* 2018;47:595-616.
48. Prüß BM. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and

- biofilm development. *J Bacteriol* 2017;199(18):e00259-17.
49. Lobanovska M, Tang CM, Exley RM. Contribution of  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^N$  factors to expression of class II *pilE* in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 2019;201(20):e00170-19.
  50. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:289-314.
  51. Marko VA, Kilmury SLN, MacNeil LT, Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. *PLoS Pathog* 2018;14(5):e1007074.
  52. Knight DB, Rudin SD, Bonomo RA, Rather PN. *Acinetobacter nosocomialis*: defining the role of efflux pumps in resistance to antimicrobial therapy, surface motility, and biofilm formation. *Front Microbiol* 2018;9:1902.
  53. Zusman DR, Scott AE, Yang Z, Kirby JR. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(11):862-872.
  54. Kato T, Morohoshi T, Someya N, Ikeda T. The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates cellular motility, pectate lyase activity, and virulence in potato opportunistic pathogen *Pseudomonas* sp. StFLB209. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015;79(4):673-680.
  55. Winther T, Xu L, Berg-Sørensen K, Brown S, Oddershede LB. Effect of energy metabolism on protein motility in the bacterial outer membrane. *Biophys J* 2009;97(5):1305-1312.

56. Guo W, Zou LF, Cai LL, Chen GY. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for extracellular polysaccharide production, cell motility and the full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Microb Pathog* 2015;78:87-94.
57. Dong Y, Geng J, Liu J, Pang M, Awan F, Lu C, Liu Y. Roles of three TonB systems in the iron utilization and virulence of the *Aeromonas hydrophila* Chinese epidemic strain NJ-35. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;103(10):4203-4215.
58. Abdollahi S, Rasooli I, Mousavi Gargari SL. The role of TonB-dependent copper receptor in virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Genet Evol* 2018;60:181-190.
59. Kok RG, D'Argenio DA, Ornston LN. Mutation analysis of PcbR and PcaU, closely related transcriptional activators in *Acinetobacter*. *J Bacteriol* 1998;180(19):5058-5069.
60. Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, Segura A, Ramos JL. Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(2):157-186.
61. Hemamalini R, Khare S. A proteomic approach to understand the role of the outer membrane porins in the organic solvent-tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *PLoS One* 2014;9(8):e103788.
62. Catel-Ferreira M, Nehmé R, Molle V, Aranda J, Bouffartigues E, Chevalier S, Bou G, Jouenne T, Dé E. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents*

Chemother 2012;56(7):3826-3832.

63. Tamber S, Ochs MM, Hancock REW. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2006;188(1):45-54.
64. Ohneck EJ, Arivett BA, Fiester SE, Wood CR, Metz ML, Simeone GM, Actis LA. Mucin acts as a nutrient source and a signal for the differential expression of genes coding for cellular processes and virulence factors in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 2018;13(1):e01905991.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>E. coli</i> strain</b>		
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> supE4 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Clontech
<b><i>A. baumannii</i> strains</b>		
MAR002	Wild-type strain	33
T <sup>-</sup> S <sup>-</sup>	Spontaneous rifampin-resistant MAR002 derivative strain with an impairment in twitching and surface-associated motility, Rif <sup>r</sup>	This work
T <sup>+</sup> S <sup>-</sup>	Spontaneous rifampin-resistant MAR002 derivative strain with an impairment in twitching motility, Rif <sup>r</sup>	This work
T <sup>-</sup> S <sup>+</sup>	Spontaneous rifampin-resistant MAR002 derivative strain with an impairment in surface-associated motility, Rif <sup>r</sup>	This work
LH92_RS00045	MAR002 derivative strain with LH92_RS00045::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS01675	MAR002 derivative strain with LH92_RS01675::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS02585	MAR002 derivative strain with LH92_RS02585::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS04440	MAR002 derivative strain with LH92_RS04440::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS04440 complemented	LH92_RS04440 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS05285	MAR002 derivative strain with LH92_RS05285::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS05285 complemented	LH92_RS05285 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS05405	MAR002 derivative strain with LH92_RS05405::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS05405 complemented	LH92_RS05405 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS06300	MAR002 derivative strain with LH92_RS06300::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS06300 complemented	LH92_RS06300 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS06715	MAR002 derivative strain with LH92_RS06715::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS06715 complemented	LH92_RS06715 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS07135	MAR002 derivative strain with LH92_RS07135::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS08005	MAR002 derivative strain with LH92_RS08005::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS12010	MAR002 derivative strain with LH92_RS12010::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS13540	MAR002 derivative strain with LH92_RS13540::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS13540 complemented	LH92_RS13540 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS13935	MAR002 derivative strain with LH92_RS13935::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS13935 complemented	LH92_RS13935 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS15870	MAR002 derivative strain with LH92_RS15870::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS15870 complemented	LH92_RS15870 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS16065	MAR002 derivative strain with LH92_RS16065::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS16065 complemented	LH92_RS16065 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS16130	MAR002 derivative strain with LH92_RS16130::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS16130 complemented	LH92_RS16130 strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
LH92_RS16880	MAR002 derivative strain with LH92_RS16880::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work
LH92_RS17175	MAR002 derivative strain with LH92_RS17175::pCR-BluntII-TOPO disruption, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	This work



## ANEXOS

<i>LH92_RS17175</i> complemented	<i>LH92_RS17175</i> strain carrying the pBAV1K-T5-gfp plasmid with the corresponding gene cloned, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	This work
<b>Plasmids</b>		
pCR-BluntII-TOPO	Cloning vector, Km <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	Invitrogen
pBAV1K-T5-gfp	Complementation vector, Km <sup>r</sup>	Addgene
pVRL1	Plasmid carrying a gentamicin cassette, Gm <sup>r</sup>	<sup>32</sup>
pBAV1Gm-T5-gfp	pBAV1K-T5-gfp derivative vector carrying gentamicin cassette, Gm <sup>r</sup>	This work

Rif<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Zeo<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup> stand for resistance to rifampin, kanamycin, zeocin and gentamicin, respectively.

**Table 2.** Downregulated genes analysed in this study.

	Gene	ID. Protein	Description	Log2 Fold change		
				T <sup>-</sup> S <sup>-</sup>	T <sup>+</sup> S <sup>-</sup>	T <sup>+</sup> S <sup>+</sup>
TS group	<i>LH92_RS01675</i>	WP_001072475.1	HlyD family secretion protein	-4.50		
	<i>LH92_RS02585</i>	WP_000537695.1	Type IV pilus biogenesis/stability protein PilW	-1.03		
	<i>LH92_RS07135</i>	WP_000229914.1	Malonate transporter subunit MadM	-2.14		
	<i>LH92_RS15870</i>	WP_001046417.1	Prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein PilE	-1.68		
	<i>LH92_RS16130</i>	WP_021510165.1	Efflux RND transporter periplasmic adaptor	-3.90		
	<i>LH92_RS16880</i>	WP_045900525.1	Type VI secretion system protein VgrG	-2.00		
S group	<i>LH92_RS00045</i>	WP_047479431.1	ABC transporter ATP-binding protein	-2.64	-2.13	
	<i>LH92_RS05285</i>	WP_079267361.1	Amino acid permease	-4.66	-2.55	
	<i>LH92_RS08005</i>	WP_001162376.1	Phosphoglycerate mutase family protein	-5.93	-3.99	
	<i>LH92_RS12010</i>	WP_004840631.1	Multidrug efflux RND transporter outer membrane subunit AdeH	-2.69	-1.10	
	<i>LH92_RS16065</i>	WP_000521916.1	Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	-3.45	-1.30	
	<i>LH92_RS17175</i>	WP_161782838.1	PQQ-dependent sugar dehydrogenase	-4.10	-1.72	
T group	<i>LH92_RS04440</i>	WP_000837758.1	Energy transducer TonB	-1.81		-6.48
	<i>LH92_RS05405</i>	WP_125535337.1	Outer membrane porin family OprD	-1.28		-1.22
	<i>LH92_RS06300</i>	WP_045899602.1	Type VI secretion system-associated protein TagF	-1.07		-1.17
	<i>LH92_RS06715</i>	WP_000996083.1	IcIR family transcriptional regulator	-1.38		-6.70
	<i>LH92_RS13540</i>	WP_000669945.1	Hypothetical protein (putative lyase)	-1.30		-7.77
	<i>LH92_RS13935</i>	WP_001174793.1	Multidrug efflux RND transporter outer membrane subunit AdeK	-2.01		-1.73

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** (A) Representative image of the motility patterns of *A. baumannii* strain MAR002 and derivative Rif<sup>r</sup> mutants. Twitching and surface-associated motility are indicated by thick and thin arrows, respectively. The wild-type (WT) strain and the amino acidic substitutions of each mutant derivative are also indicated. (B) Representative results of a *G. mellonella* killing assay using the specified strains. Larvae (n = 10 per group) were inoculated with ~10<sup>5</sup> CFU of the indicated *A. baumannii* strain or PBS as a negative control. A significant decreased in virulence (*P* value of < 0.05) compared to the parental strain is indicated with an asterisk (\*).

**Figure 2.** Venn diagram of the distribution of deregulated genes in *A. baumannii* strains T<sup>-</sup>S<sup>-</sup>, T<sup>+</sup>S<sup>-</sup> and T<sup>-</sup>S<sup>+</sup>. Overlapping areas represent deregulated genes identified in two or all three strains, and the numbers in bold the group of genes hypothetically involved in surface-associated motility, twitching motility, or both in *A. baumannii* strain MAR002. In the indicated groups, the total number of up-regulated (green) or down-regulated (red) genes is also shown.

**Figure 3.** Representative image of the motility patterns of the indicated *A. baumannii* derivative mutants with respect to the deregulated-gene groups in each Rif<sup>r</sup> mutant. Twitching and surface-associated motility are indicated by thick and thin arrows, respectively. Each experiment was carried out in triplicate in a minimum of three independent motility assays.

**Figure 4.** Representative results of a *G. mellonella* killing assay of the specified strains. Larvae (n = 10 per group) were inoculated with  $\sim 10^5$  CFU of the indicated *A. baumannii* strain. All assays were carried out at least three times. For clarity, the results of a representative assay are presented separately and compared with those obtained with the wild-type (WT) strain (dotted line). In strains marked with an asterisk (\*), virulence was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) compared with the parental strain (MAR002). In those cases, the survival of worms inoculated with the complemented mutants are also shown (discontinued line). The motility profile of the inoculated strain is indicated by the colored background of each graph.

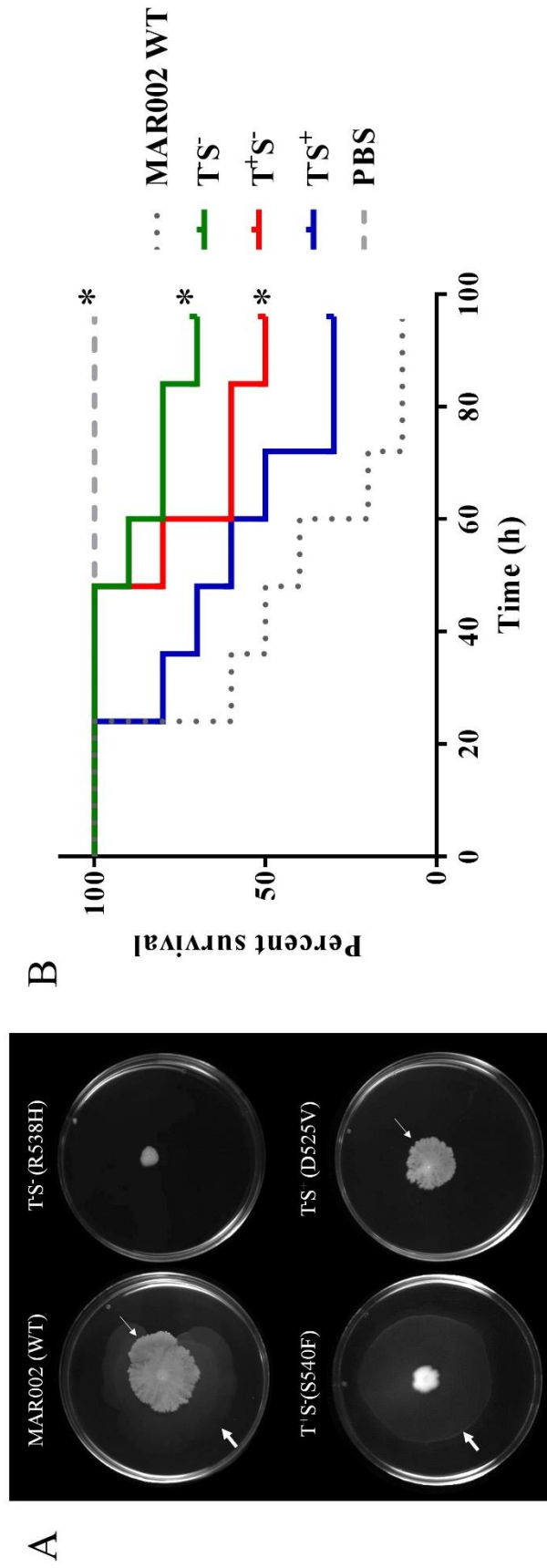


Figure 1

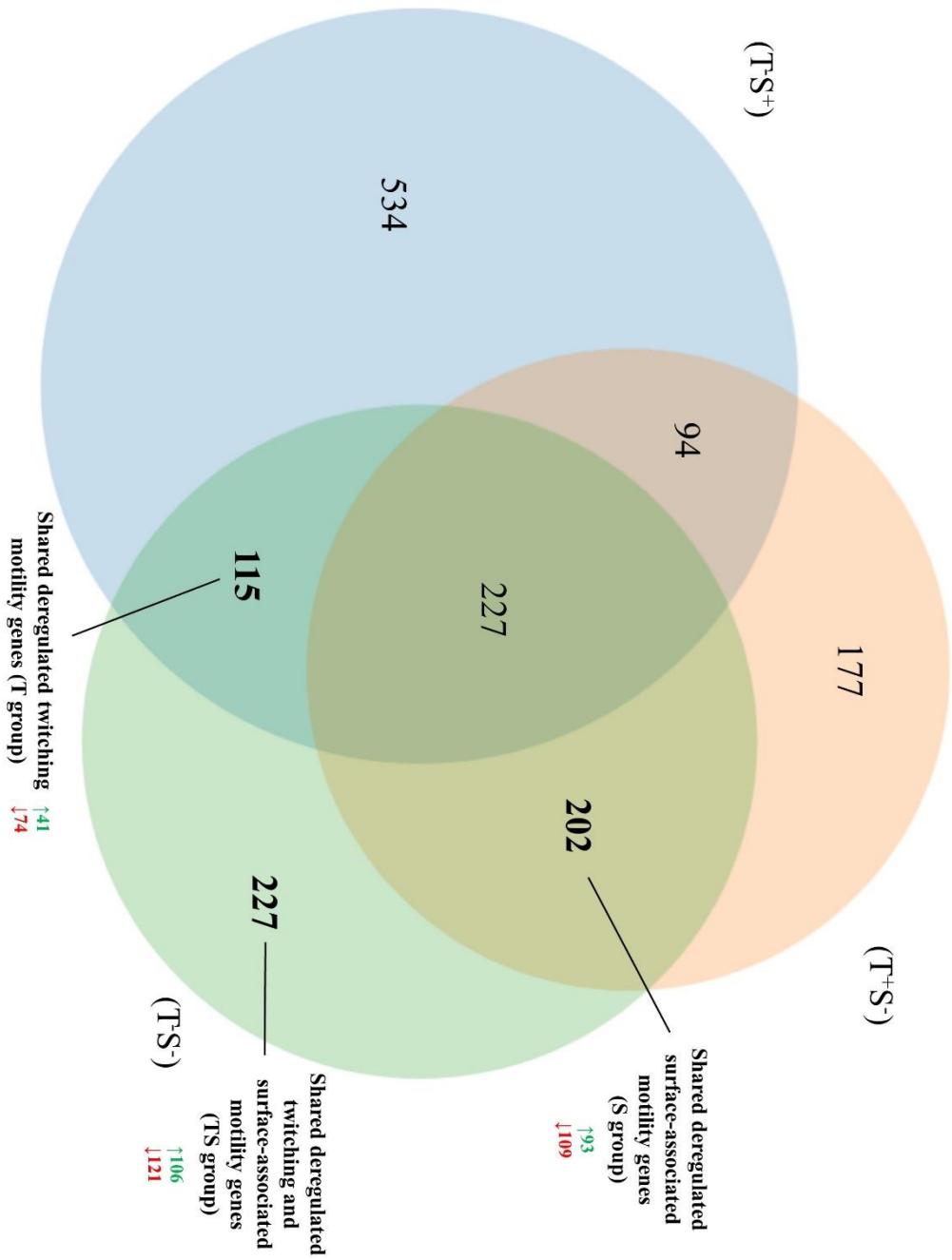


Figure 2

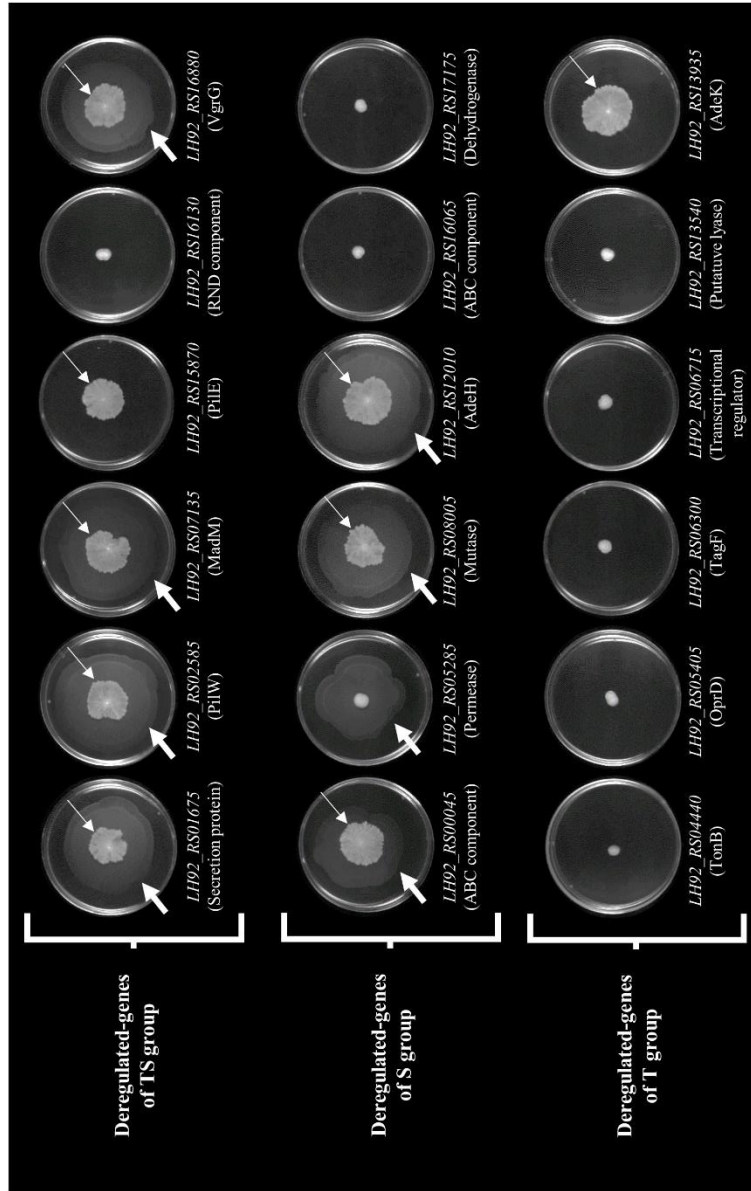


Figure 3

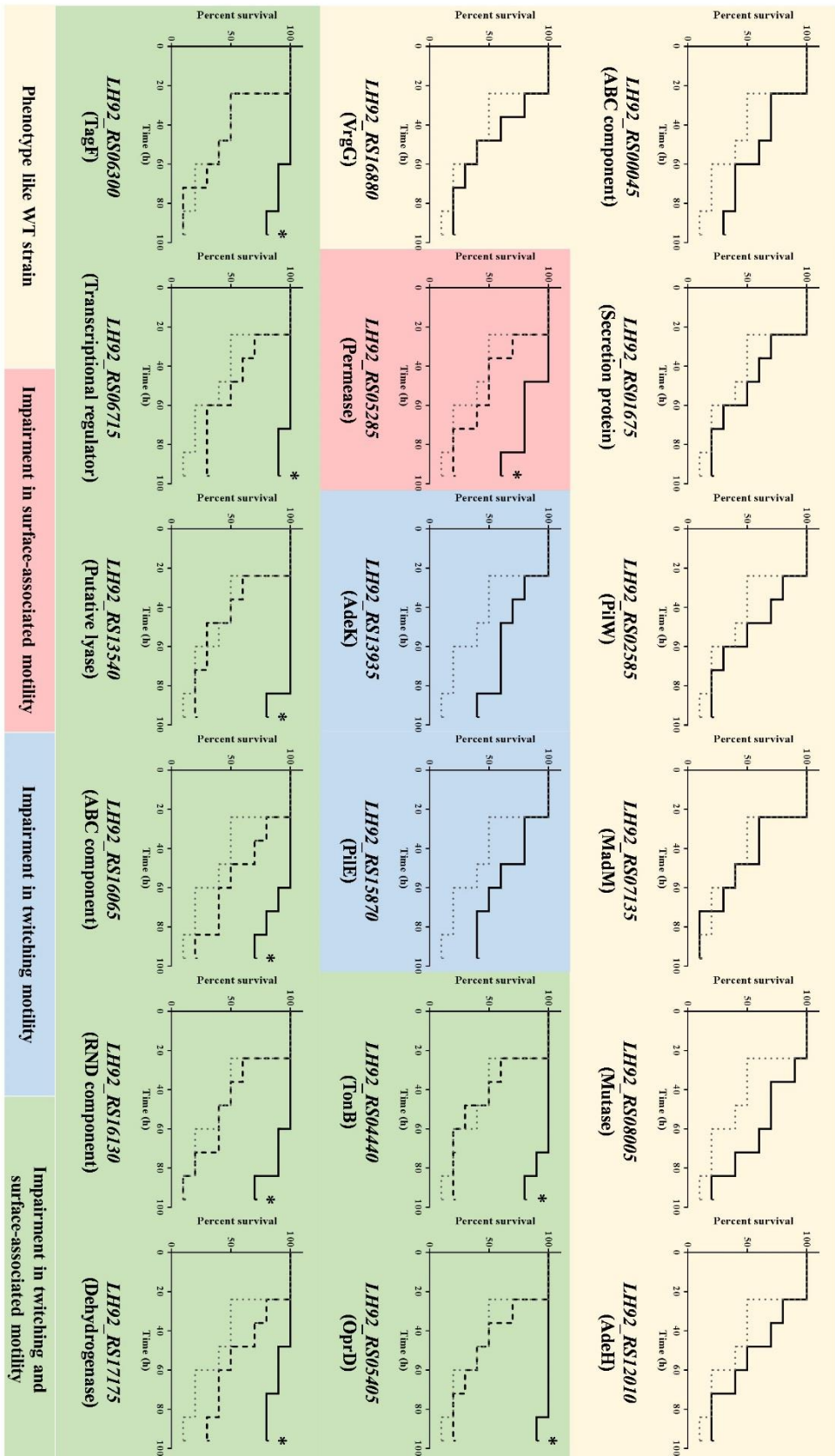


Figure 4



**Supplementary Table 1.** Oligonucleotides used in this work.

<b>Name</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>	<b>Application</b>
rpoB-1441F	GAGCGTGCTGTAAAGAGCG	<i>rpoB</i> sequencing
rpoB-2095R	CTGCCTGACGTTGCATGT	<i>rpoB</i> sequencing
1675RTFw	GTCTAGCCCAAGCCAAAGCAAAC	RT-qPCR assay
1675RTRv	TTACCCGGACGCAATCAAAG	RT-qPCR assay
5285RTFw	ATCGGGCTGGAATTATTGGGTAGT	RT-qPCR assay
5285RTRv	AAAAAGGCGAGCATATAAAACAGG	RT-qPCR assay
6300RTFw	AGCCCTGCGCGTGGTGAT	RT-qPCR assay
6300RTRv	GGAAAAGCTCGGCCTGAACTGT	RT-qPCR assay
6715RTFw	GCATTAGCACGTGGTTAGAGC	RT-qPCR assay
6715RTRv	AGAGCGAATCGATACGTTAGACAG	RT-qPCR assay
7135RTFw	GCGGTGCAATGCTTCGTGACT	RT-qPCR assay
7135RTRv	ACCCGTAACAGGCCCAACAATG	RT-qPCR assay
8005RTFw	AGCCCTGAGCCGAATACACTAC	RT-qPCR assay
8005RTRv	ACCATACAAACAGCCCTCCATC	RT-qPCR assay
13935RTFw	AGTGCAATTCGTCAGGTTTCTCAA	RT-qPCR assay
13935RTRv	GCTACATCATTACGCGAGTTTCT	RT-qPCR assay
15870RTFw	TGCTTCAATGCTATCCCTTCAT	RT-qPCR assay
15870RTRv	AAATTCCTGTGTCGTATCATCA	RT-qPCR assay
17175RTFw	ACCCTGCCAAAATATGAAAAGTA	RT-qPCR assay
17175RTRv	CTGGGCGCGTGTGATGAT	RT-qPCR assay
GyrBRTFw	TACAGACGACGGTACCGG	RT-qPCR assay
GyrBRTRv	CTGACCGATTCATCTTCG	RT-qPCR assay
0045IntFw	GCGTCTATGCAATTACAC	Mutant construction
0045IntRv	GAATATCCCAATATTCTTC	Mutant construction
0045ComFw	CAGTtctagaATGATTCAATTTGACCAAG	Mutant verification
0045ComRv	CAGTtctagaTTAGTTTTCAAATGAGGC	Mutant verification
1675IntFw	GGAACTACTATAATGCAGCACCG	Mutant construction
1675IntRv	CGGCTAACTTAATGTTAGTAC	Mutant construction
1675ComFw	CAGTtctagaATGAATCAATTGGAGTTG	Mutant verification
1675ComRv	CAGTtctagaTTATTTTTCAATAATATGTAC	Mutant verification
2585IntFw	GAAAAAGCAGTAAAAGTGCG	Mutant construction
2585IntRv	CCAGCAATACGAAATTGCTC	Mutant construction
2585ComFw	CAGTtctagaATGGGGTTGCTGTTGCAC	Mutant verification
2585ComRv	CAGTtctagaTTATTTCCATACGGCCTCAG	Mutant verification

4440IntFw	GATTGTTATGTTGCCTTTAC	Mutant construction
4440IntRv	CTATTGGCGTTTTGTGTCAACTG	Mutant construction
4440ComFw	CAGTtctagaATGAAATCAAAATCATTATTC	Mutant complementation and verification
4440ComRv	CAGTtctagaTTAACGGCCCCGATTGAGTTTG	Mutant complementation and verification
5285IntFw	CACATCCAGTTAATCGCTATG	Mutant construction
5285IntRv	GTACACTACCCAATAATTCCAG	Mutant construction
5285ComFw	CAGTtctagaTTGAGTAACTCATCTTCCC	Mutant complementation and verification
5285ComRv	CAGTtctagaTTAGAGTGATTTTTTCCAACCTC	Mutant complementation and verification
5405IntFw	CTCTGGTTCAGTGTGGGCTGGC	Mutant construction
5405IntRv	CTTCAATGCAGGATTAACCTG	Mutant construction
5405ComFw	CAGTtctagaATGTCGAAATTATGGATGTAC	Mutant complementation and verification
5405ComRv	CAGTtctagaTTATTTAAATTTCCATGTGTAG	Mutant complementation and verification
6300IntFw	GATTTCTTAAAGACAAAAGGTC	Mutant construction
6300IntRv	CCAATCATGCTTTGAGCTAACTC	Mutant construction
6300ComFw	CAGTtctagaATGCTTACATTA AAAACA ACTCC	Mutant complementation and verification
6300ComRv	CAGTtctagaTTATTCACCCAAAAAAGTCTG	Mutant complementation and verification
6715IntFw	CAGAAAAATTATTAGCGCC	Mutant construction
6715IntRv	GGCATTGCAGCTAAACATGCAC	Mutant construction
6715ComFw	CAGTgaattcATGAATGATGCAGTTGATGC	Mutant complementation and verification
6715ComRv	CAGTgaattcTTAGCTAATCTCGGTACGAATA	Mutant complementation and verification
7135IntFw	CCAATGGACGTGTGCATGC	Mutant construction
7135IntRv	CCAGCTTTTTTGGCCTCAG	Mutant construction
7135ComFw	CAGTtctagaATGGTTGAATTATTATTA AAAAG	Mutant verification
7135ComRv	CAGTtctagaTTAACCCACCAAAGCTTTAAC	Mutant verification
8005IntFw	CTGATGCTTCGACCCCTG	Mutant construction
8005IntRv	GCTACCAGTTCAACCAAC	Mutant construction
8005ComFw	CAGTtctagaATGGCACTCGATTTATTGCC	Mutant verification
8005ComRv	CAGTtctagaTTACTGTACTTTATGGAAC	Mutant verification
12010IntFw	GCTTCTTGCAGGCTGCTC	Mutant construction
12010IntRv	GCATTGTCATCTAAACCGAG	Mutant construction
12010ComFw	CAGTtctagaGTGATTACATCAAAAACAAAAC	Mutant verification
12010ComRv	CAGTtctagaTTAACTACTCCAACCGCCCCCT	Mutant verification
13540IntFw	CTGCTCATCTGCATTTGCTC	Mutant construction
13540IntRv	GATGCATTCAAAGTATCAACAG	Mutant construction
13540ComFw	CAGTtctagaATGAAATTTAAATACTTATC	Mutant complementation and verification

## ANEXOS

13540ComRv	CAGTtctagaTTATTGGACCCGACTTATTTTGATC	Mutant complementation and verification
13935IntFw	CTGCACTTGCCTTGTCTTGGC	Mutant construction
13935IntRv	CGAATTGCACTACCACCTTGC	Mutant construction
13935ComFw	CAGTtctagaATGCAAAAAGTATGGTCTATTTTC	Mutant complementation and verification
13935ComRv	CAGTtctagaTTATTGCTTTTTAAGTTCAGC	Mutant complementation and verification
15870IntFw	GCTATCCCTTCATATCAAAG	Mutant construction
15870IntRv	CGTCAATAAATTTCTGTGCG	Mutant construction
15870ComFw	CAGTtctagaATGAATAAGTACTCTATTC	Mutant complementation and verification
15870ComRv	CAGTtctagaTCATTGCCAATTCTCACTATTTG	Mutant complementation and verification
16065IntFw	CAGTAAGTGTGTGTCAGGC	Mutant construction
16065IntRv	GCCTGTCTTTACAATTTTCATC	Mutant construction
16065ComFw	CAGTtctagaATGAAAAGAAATAGCAATAATTG	Mutant complementation and verification
16065ComRv	CAGTtctagaCTACTGCTTTCCATCATAAATC	Mutant complementation and verification
16130IntFw	GAACAAGCTGAACTAGGTG	Mutant construction
16130IntRv	GTTACAGCTCATAGTCTGACG	Mutant construction
16130ComFw	CAGTtctagaATGTCGGCAAATTTAAAGAA	Mutant complementation and verification
16130ComRv	CAGTtctagaTTAATGTCCATGCTCAGCCTC	Mutant complementation and verification
16880IntFw	GACTGAGGCCAGTTATGGAC	Mutant construction
16880IntRv	CGCCACAAACGTGTGAGAAAAG	Mutant construction
16880ComFw	CAGTtctagaATGCTTTTTAATATATTTAG	Mutant verification
16880ComRv	CAGTtctagaTTATACTCCAAATTTATTAATAATC	Mutant verification
17175IntFw	GGCCTGTGGCTCTAATAATAC	Mutant construction
17175IntRv	GTGATTTTTGGCAAAGTC	Mutant construction
17175ComFw	CAGTtctagaATGAGACGATTAGCAGCCCCCT	Mutant complementation and verification
17175ComRv	CAGTtctagaTTAAGAGGGTTTCTTACTC	Mutant complementation and verification
M13FpUC	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO
M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing primer for pCR-BluntII-TOPO
Gm <sup>f</sup> Fw	GAGTCCAAGCGAGCTCGGTATTAGGTGGCGGTACTTGG	Amplification of the gentamicin cassette from pVRL1
Gm <sup>r</sup> Rv	AAAGAGGAAGGAAATAATAAATGTTACGCAGCAGCAAC	Amplification of the gentamicin cassette from pVRL1
pBAV1KInvFw	TTATTATTTCTTCTCTTTTCTACAGTATTTAAAG	Amplification of the pBAV1K-T5-gfp vector
pBAV1KInvRv	TACCGAGCTCGCTTGGAC	Amplification of the pBAV1K-T5-gfp vector
pBAV1KExtFw	ATCCAGATGGAGTTCTGAGGT	pBAV1Gm-T5-gfp vector verification
pBAV1KExtRv	CGTCTTGTATAATTAGCTT	pBAV1Gm-T5-gfp vector verification

pBAV1Fw	GACGAACTCCAATTCACTGTCCTTGC	Sequencing primer for pBAV1Gm-T5-gfp
pBAV1Rv	ATTGGGACAACCTCCAGTGAA	Sequencing primer for pBAV1Gm-T5-gfp

---

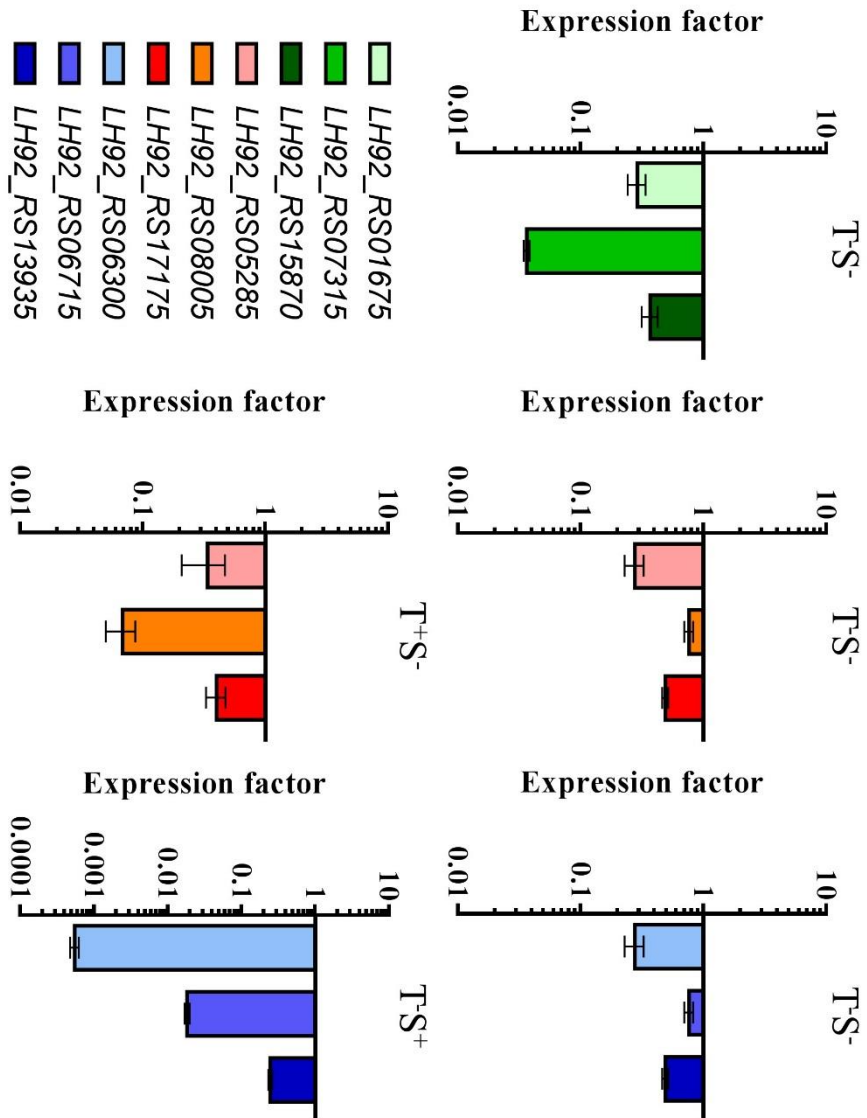
Restriction endonuclease sites are indicated in lower case.

**SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**

**Figure S1.** Verification of the expression of the indicated genes by qRT-PCR in *A. baumannii* T<sup>-</sup>S<sup>-</sup>, T<sup>+</sup>S<sup>-</sup> and T<sup>-</sup>S<sup>+</sup> strains. The expression factor is the ratio of the mRNA concentration of each gene from the indicated strain with respect to the WT strain *A. baumannii* MAR002. Error bars represent the standard deviations of the mean of at least three independent experiments.

**Figure S2.** PCR verification of the constructed mutant strains. (A) Oligonucleotides used to verify each of the indicated *A. baumannii* knockouts. The sizes of the PCR products are shown in base pairs (bp). (B) PCR verifications of the indicated *A. baumannii* strains. The NZYDNA ladder VII (Nzytech) was used as a DNA marker (M).

**Figure S3.** (A) PCR verification of all complemented knockout mutants. The sizes of the PCR products are shown in base pairs (bp), according to the pBAV1Fw-pBAV1Rv oligonucleotides used to verify each cloned gene. The NZYDNA ladder VII (Nzytech) was used as a DNA marker (M). (B) Representative image of the motility patterns of the indicated *A. baumannii* complemented mutants belonging to the deregulated-gene groups of each Rif<sup>r</sup> mutant. Twitching and surface-associated motility are indicated by thick and thin arrows, respectively. Each experiment was carried out in triplicate in a minimum of three independent motility assays.

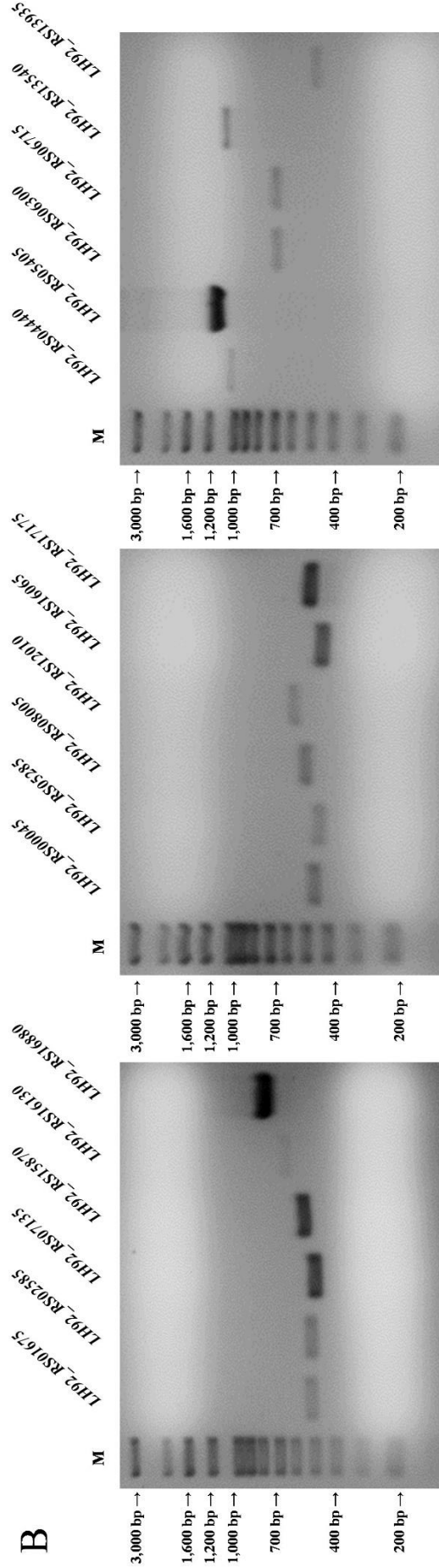


Supplementary Figure 1

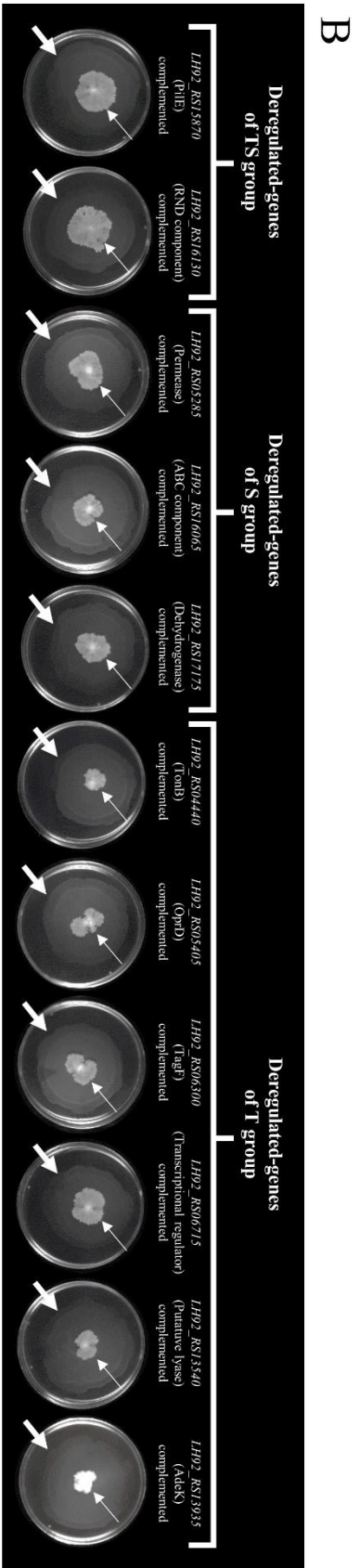
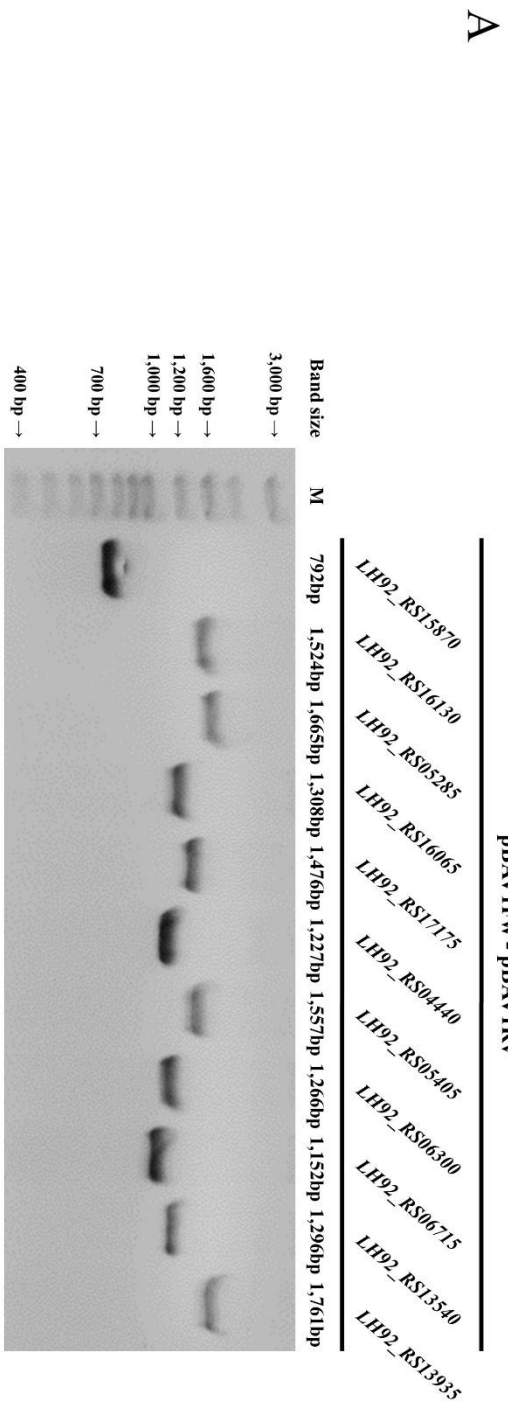
**A**

Motility group	Gene	Primer pair used	Mutant band size (bp)	Motility group	Gene	Primer pair used	Mutant band size (bp)	Motility group	Gene	Primer pair used	Mutant band size (bp)
IS group	LH92_RS01675	M13RpUC - ComFw	505	S group	LH92_RS00045	M13RpUC - ComFw	443	L	LH92_RS04440	M13RpUC - ComRv	1,030
	LH92_RS02585	M13RpUC - ComFw	499		LH92_RS05285	M13RpUC - ComFw	428		LH92_RS05405	M13RpUC - ComRv	1,297
	LH92_RS07155	M13RpUC - ComFw	468		LH92_RS08005	M13RpUC - ComFw	496		LH92_RS06300	M13RpUC - ComFw	693
	LH92_RS15870	M13RpUC - ComRv	536		LH92_RS12010	M13RpUC - ComFw	550		LH92_RS06715	M13RpUC - ComFw	689
	LH92_RS16130	M13RpUC - ComFw	634		LH92_RS16065	M13RpUC - ComFw	438		LH92_RS13540	M13RpUC - ComRv	1,075
	LH92_RS16880	M13RpUC - ComFw	701		LH92_RS17175	M13RpUC - ComFw	455		LH92_RS13955	M13RpUC - ComFw	492

**B**



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3





# **7. REFERENCIAS**



## 7. REFERENCIAS

- Adams, M. D., Nickel, G. C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A. R., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3628-3634.
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by  $\phi$ RSM filamentous phages. *Phytopathology.* 2012;102(5):469-477.
- Ahmad, I., Nygren, E., Khalid, F., Myint, S. L., Uhlin, B. E. A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Sci Rep.* 2020;10(1):1991.
- Ajiboye, T. O., Skiebe, E., Wilharm, G. Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. *Microb Pathog.* 2018;119:35-41.
- Alfano, J. R., Collmer, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* 1997;179(18):5665-5662.
- Allen, C., Gay, J., Simon-Buela, L. A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 1997;10(9):1054-1064.
- Allen, C., Prior, P., Hayward, A. C. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society Press; St Paul.
- Álvarez, B., López, M. M., Biosca, E. G. Influence of native microbiota on survival of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in river water microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(22):7210-7217.
- Álvarez, B., López, M. M., Biosca, E. G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology.* 2008;154(11):3590-3598.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailliau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., Genin, S. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(39):14620-14625.
- Antunes, L. C. S., Imperi, F., Towner, K. J., Visca, P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol.* 2011;162(3):279-284.
- Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M. P., Barbé, J., Bou, G. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J Bacteriol.* 2011;193(15):3740-3747.
- Arias, C. A., Murray, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(4):266-278.
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W., Mansfield, J. W. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: From "has bean" to supermodel. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(7):617-627.
- Bahar, O., Goffer, T., Burdman, S. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(8):909-920.
- Bahar, O., Levi, N., Burdman, S., Burdman, S. The cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* requires a polar flagellum for full virulence before and after host-tissue penetration. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(9):1040-1050.

## REFERENCIAS

- Baker, A. E., Diepold, A., Kuchma, S. L., Scott, J. E., Ha, D. G., Orazi, G., Armitage, J. P., O'Toole, G. A. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2016;198(13):1836-1846.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M., Jarrell, K. F. Prokaryotic motility structures. *Microbiology.* 2003;149(2):295-304.
- Barker, J., Maxted, H. Observations on the growth and movement of *Acinetobacter* on semi-solid media. *J Med Microbiol.* 1975;8(3):443-446.
- Bassler, B. L., Losick, R. Bacterially Speaking. *Cell.* 2006;125(2):237-246.
- Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. Y. Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol.* 1968;95(5):1520-1541.
- Belas, R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 2014;22(9):517-527.
- Bellenger, K., Ma, X., Shi, W., Yang, Z. A CheW homologue is required for *Myxococcus xanthus* fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis. *J Bacteriol.* 2002;184(20):5654-5660.
- Bentancor, L. V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G. B., Maira-Litrán, T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2012;194(15):3950-3960.
- Berg, H. C. The Rotary Motor of Bacterial Flagella. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:19-54.
- Bergogne-Bérézin, E., Towner, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):148-165.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., De Wit, P. J. G. M., Marco, Y., Deslandes, L. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell.* 2008;20(8):2252-2264.
- Bertrand, J. J., West, J. T., Engel, J. N. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2010;192(4):994-1010.
- Bhatt, G., Denny, T. P. *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *J Bacteriol.* 2004;186(23):7896-7904.
- Bi, S., Sourjik, V. Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:22-29.
- Blevins, S. M., Bronze, M. S. Robert Koch and the "golden age" of bacteriology. *Int J Infect Dis.* 2010;14(9):e744-51.
- Boucher, C. A., Barberis, P. A., Demery, D. A. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *Microbiology.* 1985;131(9):2449-2457.
- Boucher, C., Genin, S., Arlat, M. [Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria]. *C R Acad Sci III.* 2001; 324(10):915-22.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
- Boudet, J. F., Mathelié-Guinlet, M., Vilquin, A., Douliez, J. P., Béven, L., Kellay, H. Large variability in the motility of spiroplasmas in media of different viscosities. *Sci Rep.* 2018;8(1):17138.
- Bourras, S., Rouxel, T., Meyer, M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology.* 182

- 2015;105(10):1288-1301.
- Bouvet, P. J. M., Grimont, P. a D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 1986;36(2):228-240.
- Brisou, J., Prevot, A. R. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. Ann Inst Pasteur. 1954;86(6):722-728.
- Brown, D. G., Swanson, J. K., Allen, C. Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. Appl Environ Microbiol. 2007;73(9):2777-2786.
- Brumbley, S. M., Denny, T. P. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. J Bacteriol. 1990;172:(10)5677-5685.
- Buddenhagen, I., Kelman, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu Rev Phytopathol. 1964;2:203-230.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L., Kelman, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. 1962;52:726.
- Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. Annu Rev Microbiol. 2012;66:493-520.
- Caldwell, D., Kim, B.-S., Iyer-Pascuzzi, A. S. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. Phytopathology. 2017;107(5):528-536.
- Carr, E. L. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C. K. C., Gürtler, V., Seviour, R. J. J. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(4):953-963.
- Carretero-Ledesma, M., García-Quintanilla, M., Martín-Peña, R., Pulido, M. R., Pachón, J., McConnell, M. J. Phenotypic changes associated with colistin resistance due to lipopolysaccharide loss in *Acinetobacter baumannii*. Virulence. 2018;9(1):930-942.
- Caruso, P., Palomo, J. L., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M. M., Biosca, E. G. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. Appl Environ Microbiol. 2005;71(1):140-148.
- Castillo, J. A., Greenberg, J. T. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Appl Environ Microbiol. 2007;73(4):1225-1238.
- Cerqueira, G. M., Kostoulas, X., Khoo, C., Aibinu, I., Qu, Y., Traven, A., Peleg, A. Y. A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. J Infect Dis. 2014;210(1):46-55.
- Chaban, B., Hughes, H. V., Beeby, M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. Semin Cell Dev Biol. 2015;46:91-103.
- Chambers, H. F., DeLeo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7(9):629-641.
- Charon, N. W., Goldstein, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. Annu Rev Genet. 2002;36:47-73.
- Chen, R., Lv, R., Xiao, L., Wang, M., Du, Z., Tan, Y., Cui, Y., Yan, Y., Luo, Y., Yang, R., Song, Y. A1S\_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. Microbiologyopen. 2017;6(5):e00510.
- Chen, Y., Chai, Y., Guo, J. hua, Losick, R. Evidence for cyclic Di-GMP-mediated signaling in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2012;194(18):5080-5090.
- Chen, Z., Wang, X., Ren, X., Han, W., Malhi, K. K., Ding, C., Yu, S. Riemerella anatipestifer GldM is required for bacterial gliding motility, protein secretion, and

## REFERENCIAS

- virulence. *Vet Res.* 2019;50(1):43.
- Chevance, F. F. V., Hughes, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(6):455-65.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell.* 1977;11(2):263-271.
- Chlebek, J. L., Hughes, H. Q., Ratkiewicz, A. S., Rayyan, R., Wang, J. C. Y., Herrin, B. E., Dalia, T. N., Biais, N., Dalia, A. B. PilT and PilU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili. *PLoS Genet.* 2019;15(10):e1008448.
- Choi, A. H. K., Slamti, L., Avci, F. Y., Pier, G. B., Maira-Litrán, T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- $\beta$ -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2009;191(19):5953-5963.
- Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):687-693.
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., Rather, P. N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology.* 2011;157(9):2534-2544.
- Clough, S. J., Flavier, A. B., Schell, M. A., Denny, T. P. Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth. *Appl Environ Microbiol.* 1997a;63(3):844-850.
- Clough, S. J., Lee, K. E., Schell, M. A., Denny, T. P. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol.* 1997b;179(11):3639-3648.
- Colin, R., Sourjik, V. Emergent properties of bacterial chemotaxis pathway. *Curr Opin Microbiol.* 2017;39:24-33.
- Coll, N. S., Valls, M. Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microb Biotechnol.* 2013;6(6):614-620.
- Cother, E. Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Ed. J. Vanneste. Australas Plant Pathol. 2001.
- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on *Eucalyptus*: opportunists or primary pathogens? *Front Plant Sci.* 2017;8:761.
- Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(5):363-378.
- Croes, C. L., Moens, S., van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., Michiels, K. W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J Gen Microbiol.* 1993;139(9):2261-2269.
- Cursino, L., Galvani, C. D., Athinuwat, D., Zaini, P. A., Li, Y., De, L., Fuente, L., Hoch, H. C., Burr, T. J., Mowery, P. Identification of an operon, Pil-Chp, that controls twitching motility and virulence in *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(10):1198-1206.
- Darzins, A. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* 1994;11(1):137-153.
- Das, A., Rangaraj, N., Sonti, R. V. 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(1):73-85.
- Denny, T. Plant pathogenic *Ralstonia* species. *Plant-Associated Bacteria*, Springer, Dordrecht. 2007;573-644.
- Denny, T. P. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of

- Pseudomonas solanacearum*. Mol Plant Microbe Interact. 1991;4(2):198-206.
- Deslandes, L., Genin, S. Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. Curr Opin Plant Biol. 2014;20:110-117.
- Dexter, C., Murray, G. L., Paulsen, I. T., Peleg, A. Y. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;13(5):567-73.
- Dhabaan, G. N., Abubakar, S., Cerqueira, G. M., Al-Haroni, M., Pang, S. P., Hassan, H. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(3):1370-1376.
- Digonnet, C., Martinez, Y., Denancé, N., Chasseray, M., Dabos, P., Ranocha, P., Marco, Y., Jauneau, A., Goffner, D. Deciphering the route of *Ralstonia solanacearum* colonization in *Arabidopsis thaliana* roots during a compatible interaction: focus at the plant cell wall. Planta. 2012;236(5):1419-1431.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5:939-951.
- Di Domenico, E. G., Farulla, I., Prignano, G., Gallo, M. T., Vespaziani, M., Cavallo, I., Sperduti, I., Pontone, M., Bordignon, V., Cilli, L., De Santis, A., Di Salvo, F., Pimpinelli, F., La Parola, I. L., Toma, L., Ensoli, F. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. Int J Mol Sci. 2017;18(5):1077.
- Dong, Y., Geng, J., Liu, J., Pang, M., Awan, F., Lu, C., Liu, Y. Roles of three TonB systems in the iron utilization and virulence of the *Aeromonas hydrophila* Chinese epidemic strain NJ-35. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;103(10):4203-4215.
- Dordet-Frisoni, E., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., y Leroy, S. Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media. Res Microbiol. 2008;159(4):263-269.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., Luisi, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nat Rev Microbiol. 2018;16(9):523-539.
- Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T., Brown, M. H. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics. 2011a;12:126.
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I. T., y Brown, M. H. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. Infect Immun. 2013 Jul;81(7):2574-2583.
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol Lett. 2011b;323(1):44-51.
- Elhosseiny, N. M., Attia, A. S. *Acinetobacter*: An emerging pathogen with a versatile secretome. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):33.
- Elphinstone, J. G. The current bacterial wilt situation: global overview in Bacterial wilt diseases and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN: American Phytopathological Society. 2005;9-28.
- Elsas, J. D. van, Kastelein, P., de Vries, P. M., van Overbeek, L. S. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. Can J Microbiol. 2001;47(9):842-854.
- Erhardt, M. Strategies to block bacterial pathogenesis by interference with motility and chemotaxis. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:185-205.
- Falagas, M. E., Karveli, E. A., Kelesidis, I., Kelesidis, T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. Eur J Clin Microbiol. Infect Dis. 2007;26(12):857-868.



## REFERENCIAS

- Fang, X., Gomelsky, M. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol.* 2010;76(5):1295-1305.
- Fatima, U., Senthil-Kumar, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Front Plant Sci.* 2015;6:750.
- Fegan, M., Prior, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex in Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN: American Phytopathological Society. 2005;449-461.
- Feng, T., Han, Y., Li, B., Li, Z., Yu, Y., Sun, Q., Li, X., Du, L., Zhang, X. H., Wang, Y. Interspecies and intraspecies signals synergistically regulate *Lysobacter enzymogenes* twitching motility. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(23):e01742-19.
- Fernández, L., Hancock, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):661-681.
- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., Denny, T. P. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol.* 1997a;26(2):251-259.
- Flavier, A. B., Ganova-Raeva, L. M., Schell, M. A., Denny, T. P. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol.* 1997b;179(22):7089-7097.
- Flavier, A. B., Schell, M. A., Denny, T. P. An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol.* 1998;28(3):475-86.
- Flores-Cruz, Z., Allen, C. Necessity of OxyR for the hydrogen peroxide stress response and full virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6426-6432.
- Flores-Cruz, Z., Allen, C. *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(7):773-782.
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M. P., Gutierrez, C., Cam, K. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2003;49(3):823-832.
- Frutos-Grilo, E., Marsal, M., Irazoki, O., Barbé, J., Campoy, S. The interaction of RecA with both CheA and CheW is required for chemotaxis. *Front Microbiol.* 2020;11:583.
- Fulcher, N. B., Holliday, P. M., Klem, E., Cann, M. J., Wolfgang, M. C. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol Microbiol.* 2010;76(4):889-904.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet.* 2001;35:439-468.
- García-Garmendia, J. L., Ortiz-Leyba, C., Garnacho-Montero, J., Jiménez-Jiménez, F. J., Pérez-Paredes, C., Barrero-Almodóvar, a E., Gili-Miner, M. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):939-946.
- Geisinger, E., Isberg, R. R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):e1004691.
- Geisinger, E., Mortman, N. J., Vargas-Cuevas, G., Tai, A. K., Isberg, R. R. A global regulatory system links virulence and antibiotic resistance to envelope homeostasis in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 2018;14(5):e1007030.
- Genin, S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 2010;187(4):920-908.
- Genin, S., Boucher, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol.* 2004;42:107-134.

- Genin, S., y Denny, T. P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:67-89
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C., Boucher, C. A. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol.* 1992;6(20):3065-3076.
- Gerlach, R. G., Hensel, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2007;297(6):401-415.
- Gilad, R., Porat, A., Trachtenberg, S. Motility modes of *Spiroplasma melliferum* BC3: a helical, wall-less bacterium driven by a linear motor. *Mol. Microbiol.* 2003;47(3):657-669.
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., Wood, T. K. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol.* 2006;188(1):305-16.
- González, E. T., Brown, D. G., Swanson, J. K., Allen, C. Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(12):3779-3786.
- Gordon, V. D., Wang, L. Bacterial mechanosensing: The force will be with you, always. *J Cell Sci.* 2019;132(7):jcs227694.
- Granada, G. A., Sequeira, L. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Can J Microbiol.* 1983;29(4):433-440.
- Grey, B. E., Steck, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):3866-3872.
- Gurich, N., González, J. E. Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa symbiosis. *J. Bacteriol.* 2009;191(13):4372-4382.
- Haiko, J., Westerlund-Wikström, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel).* 2013;2(4):1242-1267.
- Harding, C. M. M., Hennon, S. W. W., Feldman, M. F. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2):91-102.
- Harding, C. M., Pulido, M. R., Di Venanzio, G., Kinsella, R. L., Webb, A. I., Scott, N. E., Pachón, J., Feldman, M. F. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. *J Biol Chem.* 2017;292(22):9075-9087.
- Harding, C. M., Tracy, E. N., Carruthers, M. D., Rather, P. N., Actis, L. A., Munson, R. S., Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio.* 2013;4(4):e00360-13.
- Harshey, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:249-273.
- Hassan, K. A., Liu, Q., Henderson, P. J. F., Paulsen, I. T. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *MBio.* 2015;6(1):e01982-14.
- Hayward, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol.* 1991;29:65-87.
- Hayward, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol.* 1992;21:163-168.
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., Parkinson, J. S. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(1):9-19.
- Henrichsen, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev.* 1972;36(4):478-503.

## REFERENCIAS

- Hernández-Romero, D., Solano, F., Sanchez-Amat, A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6808-6815.
- Hikichi, Y., Mori, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K. Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci.* 2017;8:967.
- Hobley, L., Fung, R. K. Y., Lambert, C., Harris, M. A. T. S., Dabhi, J. M., King, S. S., Basford, S. M., Uchida, K., Till, R., Ahmad, R., Aizawa, S. I., Gomelsky, M., Sockett, R. E. Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002493.
- Hölscher, T., Kovács, Á. T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiol.* 2017;19(7):2537-2545.
- Hou, Y.-J., Yang, W.-S., Hong, Y., Zhang, Y., Wang, D.-C., Li, D.-F. Structural insights into the mechanism of c-di-GMP-bound YcgR regulating flagellar motility in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2020;295(3):808-821.
- Hu, X., Zhao, Z., Zhuo, T., Fan, X., Zou, H. The RSc0454-encoded FAD-linked oxidase is indispensable for pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* GMI1000. *Mol Plant Microbe Interact.* 2019;32(6):697-707.
- Huang, J., Carney, B. F., Denny, T. P., Weissinger, A. K., Schell, M. A. A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol.* 1995;177(5):1259-1267.
- Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Garg, R. P., Denny, T. P., Schell, M. A. Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol.* 1998;180(10):2736-2743.
- Irazoki, O., Aranda, J., Zimmermann, T., Campoy, S., Barbé, J. Molecular interaction and cellular location of reca and chew proteins in *Salmonella enterica* during SOS response and their implication in swarming. *Front Microbiol.* 2016a;7:1560.
- Irazoki, O., Mayola, A., Campoy, S., Barbé, J. SOS system induction inhibits the assembly of chemoreceptor signaling clusters in *Salmonella enterica*. *PLoS One.* 2016b;11(1):e0146685.
- Jacobs, A. C., Sayood, K., Olmsted, S. B., Blanchard, C. E., Hinrichs, S., Russell, D., Dunman, P. M. Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012a;64(3):403-412.
- Jacobs, J. M., Babujee, L., Meng, F., Milling, A., Allen, C. The in planta transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *MBio.* 2012b;3(4):e00114-12.
- Jain, R., Sliusarenko, O., Kazmierczak, B. I. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly. *PLoS Pathog.* 2017;13(8):e1006594.
- Jarrell, K. F., McBride, M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(6):466-476.
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):271-284.
- Jeong, Y., Cheong, H., Choi, O., Kim, J. K., Kang, Y., Kim, J., Lee, S., Koh, S., Moon, J. S., Hwang, I. An HrpB-dependent but type III-independent extracellular aspartic protease is a virulence factor of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(4):373-380.
- Josenhans, C., Suerbaum, S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol.* 2002;291(8):605-614.
- Jovanovic, M., James, E. H., Burrows, P. C., Rego, F. G. M., Buck, M., Schumacher, J.

- Regulation of the co-evolved HrpR and HrpS AAA+ proteins required for *Pseudomonas syringae* pathogenicity. *Nat Commun.* 2011;2:177.
- Juttukonda, L. J., Chazin, W. J., Skaar, E. P. *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *MBio.* 2016;7(5):e01475-16.
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T., Sintim, H. O. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev.* 2013;42(1):305-341.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., Denny, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol.* 2002;46(2):427-437.
- Kang, Y., Huang, J., Mao, G., He, L. Y., Schell, M. A. Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. *Mol Plant Microbe Interact.* 1994;7(3):370-377.
- Kato, J., Kim, H. E., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H. *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J Biosci Bioeng.* 2008;106(1):1-7.
- Kazmierczak, B. I., Lebron, M. B., Murray, T. S. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006;60(4):1026-1043.
- Kearns, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):634-644.
- Kearns, D. B., Robinson, J., Shimkets, L. J. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits directed twitching motility up phosphatidylethanolamine gradients. *J Bacteriol.* 2001;183(2):763-767.
- Khan, F., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., Kim, Y. M. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(1):33-49.
- Khokhani, D., Lowe-Power, T. M., Tran, T. M., Allen, C. A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MBio.* 2017;8(5):e00895-17.
- Kilmury, S. L. N., y Burrows, L. L. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR two-component system regulates both twitching and swimming motilities. *MBio.* 2018;9(4):e01310-18.
- Kirby, J. R., Zusman, D. R. Chemosensory regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):2008-2013.
- Krin, E., Danchin, A., Soutourina, O. RcsB plays a central role in H-NS-dependent regulation of motility and acid stress resistance in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 2010;161(5):363-371.
- Kurt, H. P., Eric, J. S. Motility and adhesion through type IV pili in Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(6):1659-1666.
- Kuo, H. Y., Chao, H. H., Liao, P. C., Hsu, L., Chang, K. C., Tung, C. H., Chen, C. H., Liou, M. L. Functional characterization of *Acinetobacter baumannii* lacking the RNA chaperone Hfq. *Front Microbiol.* 2017;8:2068.
- L. Dijkshoorn, A. N. The diversity of the genus *Acinetobacter*. *Acinetobacter* Mol Microbiol. Caister Academic Press. 2008;1-34.
- Lee, CR., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, CJ., Jeong, B. C., Lee, S. H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55.
- Leech, A. J., Mattick, J. S. Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer

## REFERENCIAS

- domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. *J Bacteriol.* 2006;188(24):8479-8486.
- Li, F. J., Starrs, L., Burgio, G. Tug of war between *Acinetobacter baumannii* and host immune responses. *Pathog Dis.* 2018;76(9):ftz004
- Lin, M.-F. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J Clin Cases.* 2014;2(12):787-814.
- Lin, M. F., Lin, Y. Y., Lan, C. Y. The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132843.
- Lin, M. F., Lin, Y. Y., Yeh, H. W., Lan, C. Y. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility. *BMC Microbiol.* 2014;14:119.
- Lin, M. H., Ke, W. J., Liu, C. C., Yang, M. W. Modulation of *Staphylococcus aureus* spreading by water. *Sci Rep.* 2016;6:25233.
- Liu, C. C., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., Chang, K. C., Liou, M. L. Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics.* 2014;104(3):215-223.
- Liu, H., Kang, Y., Genin, S., Schell, M. A., Denny, T. P. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology.* 2001;147(12):3215-3229.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M. A., Denny, T. P. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005;18(12):1296-1305.
- Loh, J., Pierson, E. A., Pierson, L. S., Stacey, G., Chatterjee, A. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* 2002;5(4):285-290.
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., Dalsing, B. L., Ricca, P., Naidoo, J., Cook, D., Jancewicz, A., Masson, P., Thomma, B., Lahaye, T., Michael, A. J., Allen, C. Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environ Microbiol.* 2018;20(4):1330-1349.
- Luna, C. M., Aruj, P. K. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. *Respirology.* 2007;12(6):787-791.
- Luo, Y., Zhao, K., Baker, A. E., Kuchma, S. L., Coggan, K. A., Wolfgang, M. C., Wong, G. C. L., O'Toole, G. A. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *MBio.* 2015;6(1):e02456-14.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., Charkowski, A. O. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology.* 2007;97(9):1150-1163.
- Macho, A. P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzón, C. R., Genin, S. A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 2010;23(9):1197-205.
- Maier, B., Wong, G. C. L. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends Microbiol.* 2015;23(12):775-788.
- Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., Caldwell, D. R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol.* 1974;28(3):456-459.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., DOW, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(6):614-629.

- Maragakis, L. L., Perl, T. M. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008;46(8):1254-1263.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., Lambert, T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3298-3304.
- Martínez, A., Torello, S., Kolter, R. Sliding Motility in *Mycobacteria*. *J Bacterio*. 1999;181(23):7331-7338.
- Mattick, J. S. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:289-314.
- Mauriello, E. M. F., Mignot, T., Yang, Z., Zusman, D. R. Gliding motility revisited: how do the *Myxobacteria* move without flagella? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(2):229-249.
- Mayola, A., Irazoki, O., Martínez, I. A., Petrov, D., Menolascina, F., Stocker, R., Reyes-Darias, J. A., Krell, T., Barbé, J., Campoy, S. RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*. *PLoS One*. 2014;9(8):e105578.
- McBride, M. J. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:49-75.
- McCallum, M., Burrows, L. L., Howell, P. L. The dynamic structures of the type IV pilus in Protein Secretion in Bacteria: American Society of Microbiology. 2019;113-128.
- McCarthy, Y., Ryan, R. P., O'Donovan, K., He, Y.-Q., Jiang, B.-L., Feng, J.-X., Tang, J.-L., Dow, J. M. The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol*. 2008;9(6):819-824.
- McConnell, M. J., Actis, L., Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(2):130-155.
- McGarvey, J. A., Bell, C. J., Denny, T. P., Schell, M. A. Analysis of extracellular polysaccharide I in culture and in planta using immunological methods: new insights and implications. *Bacterial Wilt Disease*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1998;157-163.
- McGarvey, J. A., Denny, T. P., Schell, M. A. Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology*. 1999;89(12):1233-1239.
- McQueary, C. N., Kirkup, B. C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L. A., Craft, D. W., Zurawski, D. V. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol*. 2012;50(3):434-443.
- Melotto, M., Kunkel, B. N. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria in The Prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013;61-82.
- Melville, S., Craig, L. Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(3):323-341.
- Meng, F. The Virulence Factors of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Plant Pathol Microbiol*. 2013;1-4.
- Meng, F., Yao, J., Allen, C. A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *J Bacteriol*. 2011;193(10):2477-2486.
- Merz, A. J., So, M., Sheetz, M. P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*. 2000;407(6800):98-102.
- Metan, G., Alp, E., Aygen, B., Sumerkan, B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: Clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(1):197-199.
- Mhedbi-Hajri, N., Jacques, MA., Koebnik, R. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic *Xanthomonadaceae*. *Adv Exp Med Biol*. 2011;715:71-89.

## REFERENCIAS

- Mignot, T., Shaevitz, J. W., Hartzell, P. L., Zusman, D. R. Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science*. 2007;315(5813):853-856.
- Miller, M. B., Bassler, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:165-199.
- Miller, R. M., Tomaras, A. P., Barker, A. P., Voelker, D. R., Chan, E. D., Vasil, A. I., Vasil, M. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol*. 2008;190(11):4038-4049.
- Milling, A., Babujee, L., Allen, C. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS One*. 2011;6(1):e15853.
- Minamino, T., Imada, K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol*. 2015;23(5):267-274.
- Miyata, M., Robinson, R. C., Uyeda, T. Q. P., Fukumori, Y., Fukushima, S., Haruta, S., Homma, M., Inaba, K., Ito, M., Kaito, C., Kato, K., Kenri, T., Kinoshita, Y., Kojima, S., Minamino, T., Mori, H., Nakamura, S., Nakane, D., Nakayama, K., Nishiyama, M., Shibata, S., Shimabukuro, K., Tamakoshi, M., Taoka, A., Tashiro, Y., Tulum, I., Wada, H., Wakabayashi, K. Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes to Cells*. 2020;25(1):6-21.
- Moon, K. H., Weber, B. S., Feldman, M. F. Subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole prevent biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* through inhibition of Csu pilus expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):e00778-17.
- Mori, Y., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Higashimoto, C., Ohnishi, K., Kiba, A., Hikichi, Y. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Mol Plant Pathol*. 2016;17(6):890-902.
- Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K., Hikichi, Y. Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(2):454-463.
- Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulas, X., Uddin, M. I., Peleg, A. Y. The Mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2019;10:1601.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., Pardesi, K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2019;10:539.
- Murray, T. S., Kazmierczak, B. I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol*. 2008;190(8):2700-2708.
- Mussi, M. A., Gaddy, J. A., Cabruja, M., Arivett, B. A., Viale, A. M., Rasia, R., Actis, L. A. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol*. 2010;192(24):6336-6345.
- Mutlu Yilmaz, E., Sunbul, M., Aksoy, A., Yilmaz, H., Guney, A. K., Guvenc, T. Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(4):332-336.
- Nairn, B. L., Lonergan, Z. R., Wang, J., Braymer, J. J., Zhang, Y., Calcutt, M. W., Lisher, J. P., Gilston, B. A., Chazin, W. J., De Crécy-Lagard, V., Giedroc, D. P., Skaar, E. P. The response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc starvation. *Cell Host Microbe*. 2016;19(6):826-836.
- Nakamura, S., Minamino, T. Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules*. 2019;9(7):279.
- Nan, B., Zusman, D. R. Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Mol Microbiol*. 2016;101(2):186-193.

- Narulita, E., Addy, H. S., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469(4):868-872.
- Nasser, W., Reverchon, S. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387(2):381-390.
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., van der Reijden, T. J. K. J. K., Ježek, P., Vaneechoutte, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(5):1563-1567.
- Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., Van Den Broek, P., Dijkshoorn, L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* 2004;53(12):1233-1240.
- Nesper, J., Hug, I., Kato, S., Hee, C. S., Habazettl, J. M., Manfredi, P., Grzesiek, S., Schirmer, T., Emonet, T., Jenal, U. Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of cheY-like regulators. *Elife.* 2017;6:e28842.
- Niu, C., Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., Rather, P. N. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2008;190(9):3386-3392.
- Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., Soto, M. J. ExpR Is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 2012;194(8):2027-35.
- O'Toole, G. A., Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):295-304.
- Ohneck, E. J., Arivett, B. A., Fiester, S. E., Wood, C. R., Metz, M. L., Simeone, G. M., Actis, L. A. Mucin acts as a nutrient source and a signal for the differential expression of genes coding for cellular processes and virulence factors in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190599.
- Orgambide, G., Montrozier, H., Servin, P., Roussel, J., Trigalet-Demery, D., Trigalet, A. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *J Biol Chem.* 1991;266(13):8312-8321.
- Orr, M. W., Lee, V. T. A PilZ domain protein for chemotaxis adds another layer to c-di-GMP-mediated regulation of flagellar motility. *Sci Signal.* 2016;9(450):fs16.
- Pallegar, P., Peña-Castillo, L., Langille, E., Gomelsky, M., Lang, A. S. Cyclic di-GMP-mediated regulation of gene transfer and motility in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* 2020;202(2):e00554-19.
- Park, S. Y., Pontes, M. H., Groisman, E. A. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(6):1850-1855.
- Partridge, J. D., Harshey, R. M. Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol.* 2013;195(5):909-918.
- Patamatamkul, S., Klungboonkrong, V., Praisarnti, P., Jirakiat, K. A case-control study of community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia and melioidosis pneumonia in northeast Thailand: an emerging fatal disease with unique clinical features. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):79-86.
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol.* 2013;14(7):651-62.
- Peleg, A. Y., Jara, S., Monga, D., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Mylonakis, E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2605-2609.



## REFERENCIAS

- Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-582.
- Pellicic, V. Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol.* 2008;68(4):827-837.
- Pérez-Pascual, D., Rochat, T., Kerouault, B., Gómez, E., Neulat-Ripoll, F., Henry, C., Quillet, E., Guijarro, J. A., Bernardet, J. F., Duchaud, E. More than gliding: Involvement of GldD and GldG in the virulence of *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Microbiol.* 2017;8:2168.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., Barbé, J. Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9):e00906-18.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., Barbé, J. Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(3):e02190-18.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Vallejo, J. A., Rumbo-Feal, S., Bou, G., Aranda, J., Barbé, J. Mutations in the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2017;85(8):e00327-17.
- Pérez, A., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Álvarez-Fraga, L., Vallejo, J. A., Beceiro, A., Ohneck, E. J., Mateos, J., Fernández-Puente, P., Actis, L. A., Poza, M., Bou, G. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12o-A2 strain. *Virulence.* 2017;8(6):959-974.
- Perrier, A., Barlet, X., Peyraud, R., Rengel, D., Guidot, A., Genin, S. Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb Pathog.* 2018;116:273-278.
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N. S., Bassler, B. L., Gitai, Z., Stone, H. A. The mechanical world of bacteria. *Cell.* 2015;161(5):988-997.
- Petersen, K., Riddle, M. S., Danko, J. R., Blazes, D. L., Hayden, R., Tasker, S. A., Dunne, J. R. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann Surg.* 2007;245(5):803-811.
- Pezza, A., Tuttobene, M., Abatedaga, I., Valle, L., Borsarelli, C. D., Mussi, M. A. Through the eyes of a pathogen: light perception and signal transduction in *Acinetobacter baumannii*. *Photochem Photobiol Sci.* 2019;18(10):2363-2373.
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., Malone, J. G. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(8):1298-1313.
- Piddock, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):629-636.
- Piepenbrink, K. H., Lillehoj, E., Harding, C. M., Labonte, J. W., Zuo, X., Rapp, C. A., Munson, R. S., Goldblum, S. E., Feldman, M. F., Gray, J. J., Sundberg, E. J. Structural diversity in the type IV Pili of multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem.* 2016;291(44):22924-22935.
- Plachouras, D., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kentepozidis, N., Baziaka, F., Karagianni, V., Giamarellou, H. In vitro postantibiotic effect of colistin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol* 2007;57(4):419-422.
- Plener, L., Boistard, P., González, A., Boucher, C., Genin, S. Metabolic adaptation of *Ralstonia solanacearum* during plant infection: a methionine biosynthesis case study. *PLoS One.* 2012;7(5):e36877.
- Pollitt, E. J. G., Diggie, S. P. Defining motility in the Staphylococci. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(16):2943-2958.
- Poueymiro, M., Genin, S. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred

- tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(1):44-52.
- Prüß, B. M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development. *J Bacteriol.* 2017;199(18):e00259-17.
- Purcell, A. H., Hopkins, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 1996;34:131-151.
- Queenan, A. M., Bush, K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458.
- Rather, P. N. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol.* 2005;7(8):1065-1073.
- Ray, S. K., Kumar, R., Peeters, N., Boucher, C., Genin, S. RpoN1, but not RpoN2, is required for twitching motility, natural competence, growth on nitrate, and virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Front Microbiol.* 2015;6:229.
- Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008;197(8):1079-1081.
- Richmond, G. E., Evans, L. P., Anderson, M. J., Wand, M. E., Bonney, L. C., Ivens, A., Chua, K. L., Webber, M. A., Mark Sutton, J., Peterson, M. L., Piddock, L. J. V. The *Acinetobacter baumannii* two-component system AdeRS regulates genes required for multidrug efflux, biofilm formation, and virulence in a strain-specific manner. *MBio.* 2016;7(2):e00430-16.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., Schell, M. A. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol.* 1988;170(4):1445-1451.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., De Ley, J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41(2):310-319
- Rossi, F. A., Medeot, D. B., Liudat, J. P., Pistorio, M., Jofré, E. In *Azospirillum brasilense*, mutations in *flmA* or *flmB* genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots. *Microbiol Res.* 2016;190:55-62.
- Rumbo-Feal, S., Pérez, A., Ramelot, T. A., Álvarez-Fraga, L., Vallejo, J. A., Beceiro, A., Ohneck, E. J., Arivett, B. A., Merino, M., Fiester, S. E., Kennedy, M. A., Actis, L. A., Bou, G., Poza, M. Contribution of the *A. baumannii* *A1S\_0114* gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:108.
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F., Bou, G. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3084-3090.
- Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Sauberman, S. L., MacDonald, U., Schultz, L. W., Umland, T. C., Campagnari, A. A. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* 2010;78(9):3993-4000.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Jiang, BL., He, YQ., Feng, JX., Tang, JL., Dow, J. M. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol.* 2007;63(2):429-442.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., Kappler, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(9):3087-3103.
- Safni, I., Subandiyah, S., Fegan, M. Ecology, epidemiology and disease management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. *Front Microbiol.* 2018;9:419.
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A., Denny, T. P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia*

## REFERENCIAS

- solanacearum*. *Phytopathology*. 1997;87(12):1264-1271.
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T., Hill, J. E. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(1):17-46.
- Santajit, S., Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067.
- Schell, M. A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol*. 2000;38:263-292.
- Schell, M. A., Denny, T. P., Huang, J. VsrA, a second two-component sensor regulating virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol*. 1994;11(3):489-500.
- Schell, M. A., Roberts, D. P., Denny, T. P. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J Bacteriol*. 1988;170(10):4501-4508.
- Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., Mancuso, J., Milstrey, E., Bautista, C. T., Patel, J., Ewell, A., Hamilton, T., Gaddy, C., Tenney, M., Christopher, G., Petersen, K., Endy, T., Petrucci, B. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis*. 2007;44(12):1577-1584.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., Hengge, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio*. 2013;4(2):e00103-13.
- Shi, W., Ngok, F. K., Zusman, D. R. Cell density regulates cellular reversal frequency in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4142-4146.
- Shi, X., Lin, H. Visualization of twitching motility and characterization of the role of the PilG in *Xylella fastidiosa*. *J Vis Exp*. 2016;(110):53816.
- Shrivastava, S., Mande, S. S. Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes. *PLoS One*. 2008;3(8):e2955.
- De Silva, P. M., Kumar, A. Effect of sodium chloride on surface-associated motility of *Acinetobacter baumannii* and the role of AdeRS two-component system. *J Membr Biol*. 2018;251(1):5-13.
- De Silva, P. M., Kumar, A. Signal transduction proteins in *Acinetobacter baumannii*: role in antibiotic resistance, virulence, and potential as drug targets. *Front Microbiol*. 2019;10:49.
- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marinho, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., Rosa, A. J. M., de Rosa, V. E., de Sá, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C. R., da Silva, A. M., da Silva, F. R., Silva, W. A., da Silveira, J. F., Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., de Souza, A. A., de Souza, A. P., Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada,

- H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., Setubal, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*: The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature*. 2000;406(6792):151-159.
- Siri, M. I., Sanabria, A., Boucher, C., Pianzola, M. J. New type IV pili-related genes involved in early stages of *Ralstonia solanacearum* potato infection. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(7):712-724.
- Skariyachan, S., Taskeen, N., Ganta, M., Venkata Krishna, B. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Rev Microbiol*. 2019;45(3):315-333.
- Skerker, J. M., Berg, H. C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(12):6901-6904.
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., Wichelhaus, T. A., Hunfeld, K. P., Borgmann, S., Gröbner, S., Higgins, P. G., Seifert, H., Busse, H. J., Witte, W., Pfeifer, Y., Wilharm, G. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(3):117-128.
- Skotnicka, D., Petters, T., Heering, J., Hoppert, M., Kaefer, V., Søgaard-Andersen, L. Cyclic dI-GMP regulates type IV pilus-dependent motility in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*. 2015;198(1):77-90.
- Skotnicka, D., Søgaard-Andersen, L. Type IV pili-dependent motility as a tool to determine the activity of c-di-GMP modulating enzymes in *Myxococcus xanthus*. *Methods Mol Biol*. 2017;1657:157-165.
- Smani, Y., Fabrega, A., Roca, I., Sañchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1806-1808.
- Sourjik, V., Wingreen, N. S. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(2):262-268.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Kaper, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol*. 2002;43(3):809-821.
- Stewart, C. R., Rossier, O., Cianciotto, N. P. Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J Bacteriol*. 2009;191(5):1537-46.
- Strange, R. N., Scott, P. R. Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:83-116.
- Suchanek, V. M., Esteban-López, M., Colin, R., Besharova, O., Fritz, K., Sourjik, V. Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2020;113(4):728-739.
- Sun, E., Liu, S., Hancock, R. E. W. Surfing motility: a conserved yet diverse adaptation among motile bacteria. *J Bacteriol*. 2018;200(23):e00394-18.
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., Yang, C. H. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2016;17(9):1506-1518.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., Allen, C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*. 2005;95(2):136-143.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh,

## REFERENCIAS

- N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., Aboderin, A. O., Al-Abri, S. S., Awang Jalil, N., Benzonana, N., Bhattacharya, S., Brink, A. J., Burkert, F. R., Cars, O., Cornaglia, G., Dyar, O. J., Friedrich, A. W., Gales, A. C., Gandra, S., Giske, C. G., Goff, D. A., Goossens, H., Gottlieb, T., Guzman Blanco, M., Hryniewicz, W., Kattula, D., Jinks, T., Kanj, S. S., Kerr, L., Kieny, M. P., Kim, Y. S., Kozlov, R. S., Labarca, J., Laxminarayan, R., Leder, K., Leibovici, L., Levy-Hara, G., Littman, J., Malhotra-Kumar, S., Manchanda, V., Moja, L., Ndoye, B., Pan, A., Paterson, D. L., Paul, M., Qiu, H., Ramon-Pardo, P., Rodríguez-Baño, J., Sanguinetti, M., Sengupta, S., Sharland, M., Si-Mehand, M., Silver, L. L., Song, W., Steinbakk, M., Thomsen, J., Thwaites, G. E., van der Meer, J. W., Van Kinh, N., Vega, S., Villegas, M. V., Wechsler-Fördös, A., Wertheim, H. F. L., Wesangula, E., Woodford, N., Yilmaz, F. O., Zorzet, A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-327.
- Taguchi, F., Ichinose, Y. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(9):1001-11.
- Tans-Kersten, J., Brown, D., Allen, C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17(6):686-695.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., Allen, C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol.* 2001;183(12):3597-3605.
- Tipton, K. A., Rather, P. N. An *ompR-envZ* two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol.* 2017;199(3):e00705-16.
- Tola, Y. H., Fujitani, Y., Tani, A. Bacteria with natural chemotaxis towards methanol revealed by chemotaxis fishing technique. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(11):2163-2171.
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., Actis, L. A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology.* 2003;149(12):3473-3484.
- Towner, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.* 2009;73(4):355-363.
- Tsompanidou, E., Denham, E. L., Becher, D., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., Manson, W. L., Back, J. W., van Dijl, J. M., Dreisbach, A. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(3):886-895.
- Ujita, Y., Sakata, M., Yoshihara, A., Hikichi, Y., Kai, K. Signal production and response specificity in the *phc* Quorum sensing systems of *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem Biol.* 2019;14(10):2243-2251.
- Vallejo, J. A., Beceiro, A., Rumbo-Feal, S., Rodríguez-Palero, M. J., Russo, T. A., Bou, G. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;S0924-8579(15)00241-1.
- Valls, M., Genin, S., Boucher, C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2006;2(8):e82.
- Vanneste, J. L. The scientific, economic, and social impacts of the New Zealand outbreak of bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Annu Rev Phytopathol.* 2017;55:377-399.
- Varga, J. J., Nguyen, V., O'Brien, D. K., Rodgers, K., Walker, R. A., Melville, S. B. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol Microbiol.* 2006;62(3):680-694.

- Veith, P. D., Glew, M. D., Gorasia, D. G., Reynolds, E. C. Type IX secretion: the generation of bacterial cell surface coatings involved in virulence, gliding motility and the degradation of complex biopolymers. *Mol Microbiol.* 2017;106(1):35-53.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 2008;16(10):496-506.
- Vincent, M. S., Durand, E., Cascales, E. The PorX response regulator of the *Porphyromonas gingivalis* PorXY two-component system does not directly regulate the type IX secretion genes but binds the PorL subunit. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:96.
- Visca, P., Seifert, H., Towner, K. J. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 2011;63(12):1048-1054.
- Wairuri, C. K., Van Der Waals, J. E., Van Schalkwyk, A., Theron, J. *Ralstonia solanacearum* needs Flp pili for virulence on potato. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012;25(4):546-556.
- Waite, A. J., Frankel, N. W., Emonet, T. Behavioral Variability and Phenotypic Diversity in Bacterial Chemotaxis. *Annu Rev Biophys.* 2018;47:595-616.
- Ward, M. J., Lew, H., Zusman, D. R. Social motility in *Myxococcus xanthus* requires FrzS, a protein with an extensive coiled-coil domain. *Mol Microbiol.* 2000;37(6):1357-1371.
- Weber, B. S., Ly, P. M., Irwin, J. N., Pukatzki, S., Feldman, M. F. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(30):9442-9447.
- Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Prüß, B. M., Babitzke, P., Romeo, T. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001;40(1):245-256.
- West, A. H., Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):369-376.
- Wheatley, R. M., Poole, P. S. Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(4):448-461.
- Whitchurch, C. B., Leech, A. J., Young, M. D., Kennedy, D., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., Semmler, A. B. T., Mellick, A. S., Martin, P. R., Alm, R. A., Hobbs, M., Beatson, S. A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J. C., Engel, J. N., Darzins, A., Mattick, J. S. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):873-893.
- Whitfield, C., Trent, M. S. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:99-128.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., Prior, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(21):6790-6801.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., De Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 2012;6(5):961-974.
- Wieland, K., Chhatwal, P., Vonberg, R. P. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: results of a systematic review. *Am J Infect Control.* 2018;46(6):643-648.
- Wuichet, K., Zhulin, I. B. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci Signal.* 2010;3(128):ra50.
- Xin, L., Zeng, Y., Sheng, S., Chea, R. A., Liu, Q., Li, H. Y., Yang, L., Xu, L., Chiam, K. H., Liang, Z. X. Regulation of flagellar motor switching by c-di-GMP phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2019;294(37):13789-13799.

## REFERENCIAS

- Xin, X. F., Kvitko, B., He, S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2019;16(5):316-328.
- Yabuuchi, E., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., Kosako, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol Immunol.* 1995;39(11):897-904.
- Yao, J., Allen, C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* 2006;188(10):3697-3708.
- Yao, J., Allen, C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol.* 2007;189(17):6415-6424.
- Yoshimochi, T., Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi, Y., Ohnishi, K. Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. *J Gen Plant Pathol.* 2009;75:196-204.
- Yuliar, Asi Nion, Y., Toyota, K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 2015;30(1):1-11.
- Zatakia, H. M., Nelson, C. E., Syed, U. J., Scharf, B. E. ExpR coordinates the expression of symbiotically important, bundle-forming Flp pili with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(8):2429-2439.
- Zhang, L., Xu, J., Xu, J., Zhang, H., He, L., Feng, J. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Pathog.* 2014;74:1-7.
- Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi, Y., Ohnishi, K. *prhKLM* genes of *Ralstonia solanacearum* encode novel activators of *hrp* regulon and are required for pathogenesis in tomato. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;317(1):75-82.
- Zhen, X., Lundborg, C. S., Sun, X., Hu, X., Dong, H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: A systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:137.
- Zheng, H., Mao, Y., Teng, J., Zhu, Q., Ling, J., Zhong, Z. Flagellar-dependent motility in *Mesorhizobium tianshanense* is involved in the early stage of plant host interaction: study of an *flgE* mutant. *Curr Microbiol.* 2015;70(2):219-227.
- Zhou, M., Shen, D., Xu, G., Liu, F., y Qian, G. ChpA controls twitching motility and broadly affects gene expression in the biological control agent *Lysobacter enzymogenes*. *Curr Microbiol.* 2017;74(5):566-574.
- Zhou, X., Qian, G., Chen, Y., Du, L., Liu, F., Yuen, G. Y. PilG is involved in the regulation of twitching motility and antifungal antibiotic biosynthesis in the biological control agent *Lysobacter enzymogenes*. *Phytopathology.* 2015;105(10):1318-1324.
- Zusman, D. R. "Frizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 1982;150(3):1430-1437.
- Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z., Kirby, J. R. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):862-872.

## **8. AGRADECIMIENTOS**





## 8. AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta Tesis Doctoral han contribuido muchas personas que, de un modo u otro, han hecho posible que a día de hoy pueda poner punto final a una de las etapas más importantes de mi vida. Por ello, quiero agradecer brevemente a muchas personas, tanto dentro como fuera del laboratorio, toda la ayuda prestada y el apoyo incondicional que me han dado durante todos estos largos años.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis dos directores de Tesis, Jordi Barbé y Jesús Aranda, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación; iniciándome en el mundo de la ciencia desde mis tiempos de estudiante de grado, pasando por el máster y rematando con mi incorporación como investigador predoctoral. Durante todo este tiempo, he tenido la oportunidad de aprender mucho de ambos, no solo de sus indudables conocimientos en la materia, sino también del saber que da la experiencia de haber vivido tantos años dentro del mundillo de la ciencia y, de forma complementaria, su erudición en lenguaje, cine y humor negro, respectivamente, que para bien o para mal han hecho mella en mí. También quiero agradecer a las doctoras Montserrat Llagostera, Susana Campoy y Pilar Cortés sus consejos y asesoramiento siempre que lo he precisado.

Muchas gracias a Susana Escribano, distribuidora oficial de medios, material estéril y mantitas para gatitos; por tu ayuda en el día a día del lab, en los siempre tan frustrantes cálculos moles/gramos y amigos, y por los momentos de desconexión en un lugar secreto.

Gracias también a Joan Ruiz, relaciones públicas, consejero y galán; por encontrar siempre los mejores reactivos y kits al mejor precio, así como por tener siempre tiempo para ejercer de psicólogo y abrir debates de la actualidad y la vida en general.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes he convivido durante estos últimos años pudiendo disfrutar y/o sufrir un sinfín de aventuras. No tengo palabras para describir lo mucho que agradezco haber compartido esta experiencia con vosotros.

¡Ay María, aciago destino! Han pasado eones desde que nos conocimos, compartiendo muchas vivencias juntos, aprendiendo día a día y trabajando codo con codo entre sufrimientos, desesperación y locura, pero también disfrutando de grandes momentos de risas, chismorreos y bailes que amenizaban cualquier bache en el camino. También recuerdo las charlas en el piso hasta horas intempestivas (como si nos viésemos poco...), los correbars, los no suficientes viajes a Chantada corazón de Galicia, Santiago, Sevilla, NY y muchos otros momentos memorables. Y aunque tu viaje en la vida te ha llevado al otro lado del charco, sé que siempre podré contar contigo.

A Miquel, que ya son casi diez años de Uni aguantándote. Gracias por soportar mis humorcitos, por resolverme cualquier duda relacionada con ordenadores, por tu nula

## AGRADECIMIENTOS

capacidad de recordar cualquier hecho pasadas 24 horas, a enseñarme la diferencia entre fandangos y alegrías, tus refranes, tus incisivas correcciones en mi deficiente ortografía y por ser diana de burlas varias (principalmente de Eli).

A mi pequeña Eli, muchas gracias por compartir conmigo tu curiosa forma de ver y entender el mundo, siempre llena de inocencia, reflexiones y preguntas filosóficas raras raras raras. También por dejarme ser tu psicólogo personal, por ser tan asustadiza, por hacerme un hueco en tu vida (con Wendy) y poder reírme de tus momentos de lucidez, ya sea entre PCRs y coinmunos, como de tapeo.

Tampoco quiero olvidar al resto de compañeros del departamento de la tercera y cuarta planta, estén aún o ya hayan abandonado el nido; a Marc B., Sandra, Víctor, Paula, Laia, Ferrán, Denis, Nuria, Eloi, Carrasquilla, Jennifer, Oihane y Julia; por compartir vivencias, trabajo y la cháchara durante la comida. Muchas gracias también a los alumnos de prácticas o nuevas incorporaciones; a Pau, Carlos, Dani, Caterina, Paula, Marc G., Ángela y Gaby; futuras promesas en la ciencia, y en especial a los que han participado activamente en la realización de este trabajo.

Gracias también a los miembros del CRAG, Marc Valls y Pau Sebastià, por introducirme y asesorarme en el exótico mundo de la investigación con vegetales. Quién hubiese imaginado que tras años de estudios en microbiología acabaría trabajando con gusanos o tomateras.

Tampoco quiero olvidarme de los compis de máster: Marcos, Irene, Esther, Sergio; sin duda lo mejor de ese año fue conocerlos. Y aunque nuestros caminos se han separado, solo de recordar los momentos vividos me alegran el día.

También merecen mención especial mis compañeros de piso: Adri, Laura, Mathias, Diana y Jose Luis; por los rejos, la pizza con piña, el humor negro, la contagiosa pasión por Egipto y, por supuesto, hacerme desconectar y disfrutar de una convivencia que me ha facilitado enormemente mi "emancipación". Otra mención también a Alex, Wendy, Andrés, Carrasqui, Dani y Ana; por escucharme siempre que lo he necesitado, vuestros consejos, anécdotas, actitud *happyflower* y, simplemente, haber formado parte de mi vida en Cerdanyola o Vallirana.

Por último, y no menos importante, agradecer a toda mi familia, especialmente a mis padres, por enseñarme a ser constante, a no conformarme, por el apoyo recibido estos años, las viajes y, sobre todo, por los *tuppers* de lentejas. Sin duda, nada de esto hubiese sido posible sin vosotros.

iMuchas gracias a todos!