Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

NAVARRABIOMED
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Caracterización del sistema sensorial de dos componentes de *Staphylococcus aureus*

Memoria presentada por

Beatriz Rapún Araiz

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra

Director: Dr. Iñigo Lasa Uzcudun

Pamplona – Iruña, 2020

“Not all those who wander are lost”

J.R.R. Tolkien

AGRADECIMIENTOS

Una persona muy sabia me dijo una vez (o más de una) que cuando haces la tesis trabajas para ti y en gran parte es cierto y es por eso que me siento muy orgullosa de haber completado este camino. Pero, también es evidente que nada de lo que en este libro se recoge hubiera sido posible sin la colaboración y la ayuda de personas y entidades a las que a continuación paso a dar las GRACIAS:

A las instituciones que han hecho posible la realización de todo el trabajo recogido en esta Tesis Doctoral, en especial a la Universidad Pública de Navarra.

A Iñigo Lasa, mi director de tesis. Por darme una oportunidad que llegó cuando ya no quedaban muchas. Por todo su trabajo y esfuerzo para que todo saliera adelante. Muchas gracias. Espero haber estado a la altura.

A todos los que antes que yo trabajaron duramente con los sistemas de dos componentes en el laboratorio e hicieron posible que yo contara con muchas e imprescindibles herramientas para continuar el trabajo. A nuestros colaboradores a lo largo de estos años, gracias a todas esas experiencias he podido aprender algo nuevo aunque no todo vaya a quedar reflejado aquí.

To Andreas, the real master of the TCSs. This is half yours, and I could not be more grateful for all your work and support.

A toda la gente estupenda del Navarrabiomed. A las chicas de diseño y comunicación por todo su trabajo. A Valle, Miren, Idoia y Amaia por todos los ratitos inolvidables. A Maribel, porque el Navarrabiomed ya no se entiende sin ti, gracias por todo tu cariño. A Espe por estar siempre dispuesta a escuchar todas mis movidas raras y acabar haciendo un afterhours de los nuestros. Gracias a todos.

A todos los compañeros pero sobretudo amigos de aquel lugar llamado IdaB: A Ale y Jaio porque sois Ciencia y referentes de los que me gustaría haber podido aprender más. A Carlos, Naiara y Pilarica, gracias a la tesis nuestros pasados inconexos ahora tienen otro sentido y es poder contar con vosotros como amigos. A Arancha, por darnos cuenta juntas que esto de la "Ciencia" no se nos daba tan mal y además, hacerlo en un pequeño paraíso. A Lorena porque eres cariño y generosidad a partes iguales, porque contigo los planes siempre salen bien, aunque llueva.

A todos mis compañeros del laboratorio: a las señoras, Cris y Bego por todas sus enseñanzas. A Maite, por seguir bailando en los anuncios. A toda la gente que ha ido pasando y habitando la Bat-cueva: Amaia (pequeña flor), Marta, Zayda, Margarita, Mati (mi alocada favorita). A Carmen por redefinir cada día qué es normal y aguantar nuestras torturas musicales. A los nuevos polluelos, Pablo, Lili y Andrea. De todos me llevo algo, de todos he aprendido y gracias a ellos estos años están llenos de grandes momentos y recuerdos.

A mi pequeña Toki por ser puro amor y querer ser siempre Team Bea (no me lo merezco).

A Pedro, por ser mi compañero y amigo durante todo este camino. No te hubiera elegido, pero ¡qué equivocada hubiera estado! Estas tesis nos han dado muchas aventuras y desventuras, espero que haya más en el próximo capítulo.

A Carmen, la palabra gracias se me queda corta. Si la vida a veces es cuestión de suerte, haber descongelado esas puertas fue mi premio gordo aunque en ese momento no lo sabía. Gracias por enseñarme tanto y por todo tu cariño.

A mis primas/hermanas mayores, con las que siendo tan diferentes conseguimos tener un equilibrio. A Sonia, porque eres auténtica y maravillosa. A Saio por enseñarme y quererme tanto y dejarme compartir tantas cosas, hasta día de cumple.¡¡Qué nunca se nos gaste la empatía telepática!!

A Marina y Miguel Ángel por todas esas cenas con mis “aitas”. Pamplona y yo os echamos de menos.

A todos los miembros de la R.I.K, por todos los buenos momentos que pasamos juntas, porque con vosotras “Vivo más de noche que de día, sueño más despierto que dormido”. Gracias por apoyarme aunque no entendierais nada de lo me estaba pasando y estar ahí incluso cuando yo estaba lejos.

A Alba y Ana, porque sin vosotras las charlas arreglando el mundo, las risas, los lloros, la vida, quizás no, seguro no tendrían tanto sentido. Por escucharme, ayudarme y abrazarme fuerte siempre que lo he necesitado y alguna más. Gracias. En especial a ti Ana, por ser mi roca siempre.

A TODA mi familia, a los que ya no están, a los que viven a miles de kilómetros, a las nuevas incorporaciones, a todos, gracias por todo vuestro apoyo siempre. Gracias por vuestra ayuda cuando os he necesitado, no solo yo sino también mis padres y mi hermano.

A mis TIAS, por ser esas segundas madres con las que sé que siempre podré contar. GRACIAS.

A mis abuelos: Manuel, Eloy y Rosalía. Me gustaría que supierais lo afortunada que me siento de haber podido disfrutar todos estos años con vosotros. Tener abuelos es un lujo. Gracias GoogleMaps por esos recuerdos.

A Pablo, no sé cómo será ser el hermano de Bea, pero tengo claro que ser la hermana de Pablo es todo un orgullo. Te quiero mucho, bro.

A mis padres, porque sin ellos esto no hubiera sido posible. Gracias por enseñarme a tener mis opiniones y a defenderlas. Gracias por respetar mis decisiones aún cuando sabíais que me estaba equivocando, gracias por guiarme y hacerme sentir orgullosa de lo que soy.

A mi padre, por ser el mayor ejemplo de cariño, dedicación y trabajo que existe. Gracias por estar siempre ahí cuando estaba a punto de rendirme y no dejarme caer nunca, ni siquiera cuando tiraba la bici al suelo.

A mi madre, por ser mi madre. Por su fuerza y valentía. A pesar de todo, sé que estarías muy orgullosa de este trabajo. Te quiero y te echo de menos. Siempre.

A mi yo del pasado, por saber pedir ayudar y levantarse y a mi yo del futuro: “Whatever happens tomorrow, we had today, and I will always remember it”. Ya sabes, ÉXITO y DISFRUTA.

Dr. ÍÑIGO LASA UZCUDUN, Catedrático del área Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMA:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral “**Caracterización del sistema sensorial de dos componentes de *Staphylococcus aureus***” elaborada por Doña **Beatriz Rapún Araiz** ha sido realizada bajo su dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Pamplona, a 16 Julio de 2020

Fdo. Iñigo Lasa Uzcudun

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral están incluidos en las siguientes publicaciones:

1. Villanueva M, García B, Valle J, **Rapun B**, Ruiz de Los Mozos I, Solano C, Marti M, Penadés JR, Toledo-Arana A, Lasa I. 2018. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. **Nat Commun** 9:523.
2. **Rapun-Araiz B**, Haag AF, Solano C, Lasa I. 2020. The impact of two-component sensorial network in staphylococcal speciation. **Curr Opin Microbiol** 55:40–47.
3. Prieto JM, **Rapun-Araiz B**, Gil C, Penadés JR, Lasa I and Latasa C. Inhibiting the Two-Component System GraRS with Verteporfin to combat *Staphylococcus aureus* infections. Second revision
4. **Rapun-Araiz B**, Haag A, de Cesare V, Gil C, Dorado-Morales P, Penadés JR, Lasa I. Systematic reconstruction of the complete two-component sensorial network in *Staphylococcus aureus*. Under review

La contribución de Beatriz Rapun (BR) en estas publicaciones, es la siguiente:

1. Diseño del trabajo y preparación del manuscrito: IL
Realización de los experimentos: MV, BG, JV, **BR**, MM
Preparación de los datos estadísticos y figuras: MV, BG, ATA, CS, IRM
Escritura del manuscrito: IL, JP
2. Diseño del trabajo y preparación del manuscrito: **BR**, IL
Preparación de los datos estadísticos y figuras: **BR**, CS, AH, IL
Escritura del manuscrito: **BR**, AH, IL
3. Diseño del trabajo y preparación del manuscrito: IL, CL
Realización de los experimentos: JP, **BR**, CG,
Preparación de los datos estadísticos y figuras: JP, CL
Escritura del manuscrito: IL, JP, CL
4. Diseño del trabajo y preparación del manuscrito: **BR**, AH, IL

Realización de los experimentos: **BR**, AH, VC, CG, PDM

Preparación de los datos estadísticos y figuras: **BR**, AH

Escritura del manuscrito: **BR**, AH, JP, IL

Este trabajo ha sido realizado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

- Título del proyecto: “Descifrando las singularidades del exopolisacárido universal del biofilm (PNAG) y evaluación de su potencial biotecnológico”. BIO2014-53530-R MINECO. Duración: 2015- 2017
- Título del proyecto: “Nuevas estrategias para el control de infecciones nosocomiales”. RTC-2015-3184-1, MINECO. Duración: 2015-2017
- Título del proyecto: “Caracterización funcional de los determinantes moleculares para la adaptación de *Staphylococcus aureus* a la virulencia”. BIO2017-83035-R. MINECO. Duración: 2018-2020

ÍNDICE

RESUMEN	19
SUMMARY	25
INTRODUCCIÓN	31
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2. Sistemas de Transducción de Señales de <i>S. aureus</i>	33
2.1. Di-nucleótidos cíclicos. (c-di-GMP/c-di-AMP)	34
2.2. Fosforilación (Ser/Thr-quinasas)	37
3. Sistemas de dos componentes (TCSs).....	39
3.1. Histidina quinasas	41
3.2. Reguladores de respuesta	42
3.3. Evolución de los sistemas de dos componentes.....	44
3.4. Especificidad de la señal y <i>cross-talk</i>	46
3.5. <i>Phosphorelay</i> e integración de señales.....	48
3.6. Sistemas de dos componentes en <i>S. aureus</i>	49
4. Sistemas de dos componentes: nuevas dianas terapéuticas	52
OBJETIVOS.....	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
Oligonucleótidos, plásmidos, cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	61
Manipulación de DNA y transformación de bacterias.....	61
Construcción de los plásmidos recombinantes	61
Plásmidos expresando los mutantes fosfomiméticos para cada uno de los RR.	61
Plásmidos expresando los TCSs completos	62
Plásmidos expresando NreC marcada con 3xFLAG.....	62
Plásmidos expresando la fusiones transcripcionales de los genes diana seleccionados.	62
Plásmidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes	63
Plásmidos para la transducción de <i>S. saprophyticus</i>	64
Análisis de las condiciones de expresión de los mutante fosfomiméticos de los RR	64
Análisis de la expresión de las proteínas NreC marcada con 3xFLAG.....	65
Caracterización fenotípica.....	65
Preparación de las muestras de ARN para el análisis por RNA-Seq	68
Análisis de los resultados de RNAseq	69

Preparación de las muestras para el análisis proteómico	70
Ensayos de Proteómica.....	70
Análisis de expresión de proteínas mediante western-blot.....	71
Análisis de enriquecimiento Gene Ontology.....	72
Inducción y transducción con fagos de <i>S. saprophyticus</i>	72
Purificación del dominio de unión a ligando de WalK y nanoanticuerpos frente a WalK.....	73
Análisis de la respuesta inmunogénica frente a WalK.....	75
Reconocimiento de WalK_LBD por el anticuerpo monoclonal y los nanoanticuerpos	76
Inmunodetección de nanoanticuerpos unidos a WalK en la superficie de <i>S. aureus</i>	77
Análisis del crecimiento bacteriano en presencia de los anticuerpos	77
Análisis de la actividad de WalK: autólisis	77
CAPÍTULO I	
<i>Caracterización de la red sensorial de sistemas de dos componentes de Staphylococcus aureus</i>	87
Estrategias de activación de los TCSs	89
Análisis transcriptómico de las cepas complementadas con el TCS o con RR*.....	93
Análisis transcripcional de la red sensorial de sistemas de dos componentes.....	98
Análisis proteómico de la red sensorial de los sistemas de dos componentes	101
Generación de biosensores fluorescentes específicos para cada sistema de dos-componentes.....	102
CAPÍTULO II	
<i>Análisis comparativo del regulón de cada sistema de dos componentes</i>	107
Análisis comparativo del regulón de cada sistema de dos componentes.....	109
CAPÍTULO III	
<i>Papel de los sistemas de dos componentes en la especiación del género Staphylococcus</i>	125
Análisis comparativo de las colecciones de sistemas de dos componentes de <i>S. aureus</i> y <i>S. saprophyticus</i>	127
Transducción de TCSs en <i>S. saprophyticus</i>	136
Análisis transcripcional de <i>S. saprophyticus</i> expresando SaeSR, NreCB y BraSR de <i>S. aureus</i>	137
CAPÍTULO IV	
<i>Desarrollo de anticuerpos frente a la histidina quinasa WalK</i>	139
Elaboración de anticuerpos frente a walK.....	141

Análisis de la actividad de los anticuerpos	144
DISCUSIÓN.....	149
CONCLUSIONES.....	159
REFERENCIAS	163
ANEXO.....	199

RESUMEN

RESUMEN

En las bacterias, la adaptación a los cambios en las condiciones ambientales está controlada principalmente a través de los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS). Un TCS prototipo está formado por una histidina quinasa (HK), la cual se autofosforila en un residuo conservado de histidina en respuesta a un estímulo extracelular. La HK fosforilada une y transfiere el grupo fosfato a un residuo conservado de ácido aspártico en el regulador de respuesta (RR) correspondiente. Los RRs presentan mayoritariamente un dominio efector de unión a ADN y actúan como activadores y/o inhibidores de la transcripción. En su estado fosforilado, los RRs presentan una mayor afinidad por sus secuencias de reconocimiento en el ADN. Así, la principal consecuencia de la activación de los TCSs es la modificación de la expresión de un grupo específico de genes controlados por cada TCS. En algunos casos, el RR no presenta dominio de unión a ADN y lleva a cabo su función reguladora estableciendo interacciones directas con moléculas de ARN o proteínas haciendo que la adaptación se produzca sin la modificación de la expresión de genes. Las bacterias pueden llegar a contener docenas de TCSs, controlando cada uno de ellos, la expresión de un conjunto de genes diana (regulón). La identificación de dichos regulones ha sido una cuestión recurrente. Sin embargo, limitaciones asociadas a las aproximaciones clásicas con las que los TCSs han sido estudiados han impedido la identificación precisa del regulón que cada TCS regula de forma específica. Por ejemplo, para la mayoría de los TCSs se desconoce cuál es la(s) señal(es) que detecta(n) y provoca(n) su activación y como consecuencia los estudios se han llevado a cabo en condiciones ambientales donde es posible que los TCSs estuvieran solo parcialmente activados. En esta situación, es muy probable que los cambios en la expresión de genes detectados mediante el análisis de mutantes en un TCS específico, solo hubieran mostrado los cambios para aquellos promotores para los cuales el RR tiene mayor afinidad o aquellos genes que tienen un mayor nivel de expresión. Otra limitación importante asociada a la utilización de mutantes individuales para identificar los regulones controlados por cada TCS es el hecho que algunos genes pueden estar regulados por varios TCSs. En este caso, la ausencia de un TCS puede no tener un impacto en la expresión de algunos genes diana porque otros TCSs pueden compensar su ausencia. Finalmente, otro problema que ha limitado la obtención de un mapa global de los regulones de los TCSs de una bacteria, es que la información se ha ido generando de forma fraccionada en estudios realizados en laboratorios distintos, utilizando cepas bacterianas distintas y en

condiciones de crecimiento diferentes. Como consecuencia de estas limitaciones, preguntas sobre el funcionamiento global de la red sensorial de los TCSs permanecen sin respuesta: ¿Cuál es regulón completo y específico de cada TCS? ¿Cuáles son los genes regulados específicamente por cada TCS? ¿Cuáles son los genes comunes regulados por varios TCSs? ¿Cómo y qué grado de solapamiento existe entre los diferentes regulones?

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena muy versátil capaz de causar infecciones tanto en la piel como en cualquier órgano que alcance cuando atraviesa la barrera epitelial: sangre (bacteriemia), corazón (endocarditis), hueso (osteomielitis), pulmón (neumonía). *S. aureus* contiene en su genoma dieciséis TCSs, aunque se ha descrito un subtipo particular de cepas resistentes a meticilina (MRSA), que presentan un TCS adicional en el elemento móvil *mec*, responsable de la resistencia a meticilina. Múltiples estudios han demostrado la relevancia de los diferentes TCSs tanto en la biología como en la patogénesis de *S. aureus*. El punto de partida para este trabajo de tesis es la disponibilidad en el laboratorio de una cepa de *S. aureus* en la que de forma simultánea habíamos delecionado todos los TCSs no esenciales (*S. aureus* Δ XV). En este trabajo demostramos que de los dieciséis TCSs solo WalRK es esencial, el resto de TCSs son prescindibles y se pueden delecionar simultáneamente en la misma cepa sin afectar la viabilidad de la misma.

Con el objetivo de contestar a las preguntas planteadas anteriormente, los dos primeros capítulos de esta tesis están dedicados a la evaluación y reconstitución del regulón completo de los TCSs de *S. aureus*. Para ello, hemos complementado la cepa *S. aureus* Δ XV con la forma activa de cada uno de los reguladores de respuesta (RR*) y hemos utilizado técnicas de RNA-seq y proteómica para determinar el regulón de cada TCS. Este análisis nos ha permitido determinar el tamaño y complejidad de cada regulón e identificar qué genes son regulados exclusivamente por un TCS y qué genes son regulados por varios TCSs. Los resultados han revelado que el tamaño de los regulones es muy diferente y que, con alguna excepción, siempre incluyen genes regulados exclusivamente por el correspondiente TCS. Por otro lado, los regulones de muchos TCSs tienen grupos de genes en común, sugiriendo que la bacteria se adapta a diferentes condiciones ambientales utilizando las mismas rutas metabólicas. Estos resultados representan la descripción por primera vez del regulón completo del sistema sensorial de TCSs de una célula viva. Estos resultados ayudarán a entender

como *S. aureus* se adapta y sobrevive en los distintos ambientes y muestran posibles dianas para el diseño de nuevas estrategias para combatir este patógeno.

Las bacterias de vida libre suelen contener docenas de TCSs, siendo cada uno de ellos responsables de detectar y responder ante diferentes señales. El número de TCSs es proporcional al tamaño del genoma, la diversidad de ambientes en los que los organismos son capaces de vivir y a la complejidad de su diferenciación celular. Las diferencias en el contenido de TCSs están relacionadas con la capacidad de las bacterias para colonizar diferentes nichos o mejorar la eficiencia del crecimiento en las condiciones de su nicho habitual. Así, es más probable que las bacterias con genomas de mayor tamaño, más versatilidad metabólica y estilos de vida más complejos contengan un número mayor de TCSs que aquellas bacterias que habitan en ambientes relativamente más estables. En el tercer capítulo hemos resaltado las diferencias en el contenido de TCSs entre *S. aureus* y *S. saprophyticus* para evidenciar cómo la habilidad para detectar y responder a cambios en el ambiente juega un papel fundamental en la biología de la bacteria y en su capacidad para colonizar y sobrevivir en diferentes tejidos. El estudio también pone de manifiesto cómo el análisis comparado de las colecciones de TCSs presentes en dos especies bacterianas cercanas puede ser de utilidad para entender por qué una especie bacteriana es capaz de colonizar un amplio rango de tejidos y causar diferentes tipos de infecciones mientras que en otra los tejidos en los que es capaz de crecer y sobrevivir y los hospedadores en lo que habita son mucho más restringidos.

El aumento alarmante de bacterias patógenas resistentes a múltiples agentes antimicrobianos hace necesaria la identificación de nuevas dianas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos. Los TCSs están presentes en bacterias, arqueas y células eucariotas pero no están presentes en células de mamíferos. Por ello, los TCSs son potenciales candidatos para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Durante este trabajo de tesis hemos evaluado dos aproximaciones diferentes dedicadas a la búsqueda de fármacos que tengan como diana de acción los TCSs. Por un lado, dentro del proyecto “Nuevas estrategias para el control de infecciones nosocomiales” (RTC-2015-3184-1) hemos participado en la evaluación de una colección de fármacos aprobados por la FDA (colección Prestwick) para distintas patologías como posibles agentes antimicrobianos frente a *S. aureus*. El objetivo era reconvertir alguno de estos fármacos (*repurposing*) y que además de utilizarse para la finalidad para la que fue descrito, también actuara como antimicrobiano. En el caso concreto de nuestro

estudio, el escrutinio se hizo frente al TCS GraRS. La segunda estrategia, recogida en el cuarto capítulo de esta tesis, ha consistido en el desarrollo de dos terapias alternativas frente a *S. aureus* basadas en inmunoterapias: anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos. Para ello, hemos elegido como diana de acción la HK del TCS esencial WalKR, en particular los anticuerpos se han generado frente al dominio de unión a ligando (ligand-binding domain, LBD) de la HK. La elección de esta diana se debe a dos razones, por un lado, se trata del único TCS esencial de *S. aureus* y, por otro lado, ensayos realizados con sueros de pacientes infectados por *S. aureus* mostraron la presencia de anticuerpos frente a este dominio. A lo largo de la tesis hemos producido anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos frente a diferentes epítomos del LBD. Hemos realizado diferentes ensayos para probar el reconocimiento de la proteína tanto *in vitro* como *in vivo* y para analizar el efecto de los anticuerpos en el crecimiento de *S. aureus*. Los ensayos preliminares indican que varios de los nanoanticuerpos desarrollados activan el crecimiento de la bacteria en lugar de reducir su crecimiento. Este resultado, aunque inesperado, indica que es posible desarrollar nanoanticuerpos capaces de afectar la funcionalidad de la HK y por tanto de bloquear su actividad. En este contexto cabe señalar que serán necesarios nuevos experimentos que profundicen en el análisis del efecto de los anticuerpos desarrollados combinados con antibióticos en modelos de infección experimental para valorar la eficacia de esta estrategia.

SUMMARY

SUMMARY

In bacteria, adaptation to changes in the environment is mainly controlled through two-component systems (TCS). A prototypical two-component system contains a histidine kinase (HK), which autophosphorylates on a conserved histidine residue in response to extracellular stimuli. The phosphorylated HK then binds and transfers the phosphoryl group to a conserved aspartate residue on the response regulator (RR). The RRs are often DNA-binding transcriptional activators and/or repressors, and the affinity for their DNA targets increases when they are phosphorylated. Thus, the primary consequence of the activation of a TCS is the expression of a specific set of genes controlled by that TCS. In fewer cases, the RR lacks the DNA-binding domain and exerts its regulatory effect by establishing direct interactions with protein or RNA targets and adaptation does not necessarily imply modifications in gene expression. Most bacteria contain dozens of TCS, each of them controlling the expression of a repertoire of target genes (regulon). Identification of such regulons has been a recurrent question. However, limitations associated with the classical approaches used have left our knowledge far from complete. For example, the signal(s) sensed by TCSs remain(s), in most of the cases, unknown and consequently studies have been carried out in environmental conditions where the TCS might be only partially activated. Thus, changes in gene expression caused by the absence of the TCS might be biased towards those promoters for which the RR shows higher affinity. Other limitations include the fact that some genes can be regulated by multiple TCSs. As such, the absence of one of these TCSs may not have an impact on the expression of the regulated genes while the other TCSs are present. An additional and substantial problem that limits our knowledge about the genes controlled by specific TCSs is the fact that often, studies of different TCSs of the same bacterium have been performed in different laboratories using different bacterial strains that were grown under different environmental conditions. As a consequence of these limitations, many important questions about the TCS network remain to be determined: which are the specific and complete regulon controlled by each TCS? Which are the set of genes regulated uniquely by a single TCS? Which are the common genes activated by many different TCS? How and to which extent the regulons of individual TCSs overlap between them?

Over the past few years, global questions related with the TCS network have been addressed in the clinically important pathogen *Staphylococcus aureus*. This

bacterium can reside in and infect a wide range of host tissues from superficial surface like the skin to deeper tissues once it had penetrated epithelial barriers causing invasive infections such as bacteremia, pneumonia, endocarditis or osteomyelitis. *S. aureus* encodes sixteen TCSs and only a particular subtype of methicillin resistant *S. aureus* strains (MRSA) harbors an additional TCS in the *mec* cassette element whose function is linked to the induction of methicillin resistance. Multiple studies have demonstrated the relevance of the different TCSs both in the biology and the pathogenesis of *S. aureus*. The starting point of this thesis is based on a previous work from the laboratory in which we deleted all the non-essential TCSs present in *S. aureus* (*S. aureus* ΔXV) and demonstrated that, among the sixteen TCSs, only WalRK is essential for the bacterial growth, while the other TCSs are dispensable and can be deleted simultaneously in the same strain without affecting cell viability.

With the aim to answer the questions raised, the first two chapters of this thesis are dedicated to the reconstitution of the complete regulon of TCS of *S. aureus*. For that, we have complemented the *S. aureus* ΔXV strain with the constitutively active forms of every response regulator (RR*) to characterize the complete TCS regulon. RNA-seq and proteomics techniques allowed us to determine the size, complexity and insulation of each regulon and to identify the genes regulated exclusively by one or by many TCSs. The results revealed that the size of the direct regulons is highly diverse and with few exceptions, always include genes exclusively regulated by this TCS. At the same time, the regulons of many TCSs act in concert to control the same subgroup of genes strongly suggesting that bacterial physiology adapts to different environments using common pathways. These results provide, for the first time, the description of the complete TCS regulon in a living cell. We anticipate these results will be of enormous value to understand the biology and virulence of *S. aureus* and to design strategies to combat this important pathogen.

Free-living bacteria usually contain dozens of TCSs, each of them responsible for sensing and responding to a different range of signals. The number of TCSs is proportional to the genome size, the diversity of environments in which organisms live, and the complexity in cellular differentiation. Differences in the content of TCSs are related with the capacity of the bacteria to colonize different niches or improve the efficiency to grow under the conditions of the existing niche. Thus, bacteria with larger genomes, more metabolic versatility, and complex lifestyles are more likely to have a larger number of TCSs than bacteria inhabiting relatively stable environments.

The third chapter of this thesis highlights differences in the TCS content between *S. aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* as a case study to exemplify how the ability to sense and respond to the environment is relevant for bacterial capacity to colonize and survive in/on different body surfaces and how comparative analysis of the collection of TCSs present in two closely related bacterial species can be useful to explain why one bacterial species can colonize a wide range of tissues and cause many different types of infections, while the other is far more restricted in its distribution and pathogenicity.

The increasing occurrence of resistance to multiple antimicrobial agents in pathogenic bacteria has reemerged bacterial infections as a serious public health threat. Regarding TCS, these are present in Bacteria, Archaea and Eucarya but there are no homologous to these proteins in mammalian cells. Therefore, TCSs have the potential to serve as effective drug targets. During the course of the thesis we have participated in the development of two potential complementary therapies against *S. aureus*. The first strategy was carried out within the framework of the project “New strategies to control nosocomial infections” (RTC-2015-3184-1) and we have participated in the screening of a collection of FDA’s approved drugs (Prestwick collection) as new antimicrobial agents. The objective was to repurpose one the compounds as a new drug against *S. aureus*, in this case the target of the screening was the TCS GraRS.

The second strategy is presented in the fourth chapter of the thesis. The goal was to develop a potential complementary therapy against *S. aureus* based on two different immunotherapy strategies: monoclonal antibodies and nanobodies. For that, we have focused on the HK of *S. aureus* and in particular the antibodies were developed against the ligand-binding domain (LBD) of the HK from WalRK. We have selected this target because WalRK is the only essential TCS of *S. aureus* and besides, assays performed with serum from patients with an *S. aureus* infection showed an immunogenic response against the LBD. We have been able to obtain both, the monoclonal antibody and also different nanobodies against the LBD region of WalK able to recognize the peptide *in vitro* and *in vivo*. Unexpectedly, incubation of *S. aureus* with various nanobodies promoted instead of inhibited bacterial growth. These surprising results indicate that nanobodies can modify the activity of HKs and as a consequence, interfere with the signal transduction system. Additional experiments

Summary

will be necessary to evaluate the efficiency of the nanobodies in combination with antibiotics in animal infection models.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco gram-positivo, ubicuo y muy versátil capaz de adaptarse a numerosos ambientes. En el hombre, *S. aureus* es un comensal habitual de distintas zonas de la piel pero también puede ser un patógeno muy virulento (Wilson et al., 2002). Su principal nicho de colonización son las fosas nasales, aunque también se puede encontrar colonizando otras regiones del organismo como la piel, las axilas, el tracto gastrointestinal, el perineo o la vagina. Se estima que el 20% de la población son portadores persistentes de la bacteria (Wertheim et al., 2005) y que entre un 30-60% son portadores intermitentes (Kluytmans et al., 1997). Las razones que motivan la colonización intermitente no se conocen y tampoco si existe una predisposición hacia el estado de portador de esta bacteria debido a las características genéticas de la persona o a la presencia de una determinada microbiota en su piel. La colonización es un claro factor de predisposición a la infección porque facilita que la bacteria atraviese la barrera epitelial y acceda a tejidos internos donde se convierte en un patógeno capaz de multiplicarse en multitud de tejidos y producir un amplio rango de infecciones que van desde infecciones cutáneas (impétigo), dermatitis exfoliante (producida por toxinas exfoliantes que atacan a proteínas de la epidermis), abscesos, neumonía, septicemia, endocarditis, osteomielitis, fascitis necrosante, síndrome de shock tóxico o infecciones asociadas a todo tipo de implantes médicos (Mehraj et al., 2016).

Además de su enorme capacidad patogénica, el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* se ha agravado debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos, denominadas *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Estas cepas, se pueden adquirir tanto en los hospitales (HA-MRSA) como en la comunidad (CA-MRSA) (Mehraj et al., 2016) y son únicamente sensibles a antibióticos glucopeptídicos como la vancomicina, teicoplanina o daptomicina (David and Daum, 2017; Jones, 2008; Turner et al., 2019). Sin embargo, el uso extensivo de vancomicina ha venido acompañado de la selección de cepas de *S. aureus* resistentes a este antibiótico (Jones, 2008).

La elevada patogenicidad de *S. aureus* se debe principalmente a la gran cantidad de factores de virulencia que es capaz de producir, muchos de los cuales están dedicados a la evasión del sistema inmune del hospedador y a los refinados

mecanismos de regulación de su expresión durante el proceso infeccioso (Foster, 2005; Jenkins et al., 2015). Entre los factores de virulencia de *S. aureus* destacan:

- Proteínas que favorecen la adhesión a tejidos: la familia de componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz adhesiva (MSCSCC) está compuesta por proteínas que se adhieren entre otras a fibrinógeno, fibronectina o colágeno.
- Proteínas que inhiben los procesos de quimiotaxis y extravasación de los neutrófilos hacia el foco de la infección: *S. aureus* secreta proteínas inhibidoras de la quimiotaxis (CHIPS) y proteínas de adhesión extracelular (EAPS) que bloquean diferentes receptores en la membrana de las células del hospedador, como neutrófilos o células endoteliales.
- Proteínas que inhiben la fagocitosis: Proteínas de superficie como proteína A, que reconoce la fracción constante de las inmunoglobulinas o proteínas de unión a fibrinógeno, como ClfA y ClfB favorecen la evasión de procesos de opsonización y fagocitosis.
- Proteínas que inhiben la vía del complemento: *S. aureus* secreta proteínas que inhiben el complemento (SCIN) pero también otras, como la proteína extracelular de adhesión a fibrinógeno (Efb), puede participa en esta función.
- Proteínas con actividad citotóxica: γ -toxina, γ -hemolisina (Hlg), Panton-Valentine leucocidina (PVL) y leucocidinas se encargan de lisar la membrana celular de leucocitos o eritrocitos.
- Enzimas que favorecen la destrucción de tejidos: Diferentes proteasas, lipasas, hialuronidasas, nucleasas, etc. ayudan en la expansión de la infección.
- Superantígenos: moléculas que se unen a receptores MHC de clase II en células presentadoras de antígeno y que activan una respuesta exacerbada del sistema inmune, aumentando la producción de citoquinas. *S. aureus* secreta hasta 23 superantígenos, los más importantes son la toxina del síndrome de shock tóxico-1 (TSST1) y enterotóxicas B y C (SEB, SEC) (Goldmann and Medina, 2018).
- Modificaciones en la pared celular: Alteraciones en la carga de la membrana disminuyen la afinidad de péptidos catiónicos

antimicrobianos y cambios en los enlaces del ácido murámico favorecen la resistencia de la lisozima.

- Síntesis de exopolisacáridos: se distinguen dos tipos de exopolisacáridos:

- Cápsula: suele encontrarse firmemente unido a la envoltura rodeando una única bacteria. Según la composición del polisacárido se distinguen distintos serotipos y su función es inhibir la fagocitosis.

- Biofilm: el polisacárido de poli-N-acetil-glucosamina (PIA/PNAG) normalmente rodea a grupos de bacterias favoreciendo la agregación y formación del biofilm. Su presencia no solo evita la acción del sistema inmune sino que facilita la persistencia de la bacteria cuando se adhiere a implantes médicos o tejidos del hospedador (válvulas cardíacas, epitelio de las glándulas mamarias, hueso) y la resistencia a agentes antimicrobianos (Brady et al., 2008).

2. Sistemas de Transducción de Señales de *S. aureus*

La adaptación de las bacterias a diferentes ambientes se produce gracias a su capacidad para detectar las condiciones físicas o químicas de dicho ambiente y adecuar su fisiología y funciones metabólicas al mismo. El número de proteínas implicadas en la transducción de señales (histidina quinasas, quimiorreceptores, diadenilato ciclasas, diguanilato ciclasas, diferentes fosfodiesterasas o serina-treonina quinasas) presentes en los genomas bacterianos se correlaciona con el tamaño del mismo, con la complejidad de su ciclo de vida y con la heterogeneidad de ambientes en los que puede crecer (Galperin et al., 2010).

De acuerdo con las bases de datos de proteínas de transducción de señales codificadas en los genomas bacterianos *S. aureus* contiene las siguientes proteínas de transducción de señales (Barakat et al., 2009; Galperin et al., 2010; Gumerov et al., 2019)(<http://mistdb.com>, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html, <http://www.p2cs.org>): (i) Sistemas de transducción de señal de dos-componentes (TCSs). El genoma de la mayoría de las cepas contiene dieciséis TCSs, pero algunas cepas que contienen un TCS adicional en un elemento móvil (elemento *mec*); (ii) una

única diguanilato ciclasa que posee el dominio GGDEF conservado (GdpS); (iii) una única diadenilato ciclasa (DacA) y (iv) dos serina-treonina quinasas y dos serina-treonina fosfatasas (Stk1/2 y Stp1 y RsbU).

2.1. Di-nucleótidos cíclicos. (c-di-GMP/c-di-AMP)

Muchas de las vías de señalización bacterianas se basan en la actividad de mensajeros secundarios que se encargan de transmitir las señales del exterior, desde los receptores de membrana hasta el/los efector(es) en el interior de la célula. Los principales mensajeros secundarios en bacterias son los nucleótidos cíclicos de bis-(3-5)-monofosfato de guanosina (c-di-GMP) y adenosina (c-di-AMP).

c-di-GMP

El c-di-GMP es un mensajero secundario ubicuo en bacterias e implicado en la regulación de múltiples procesos bacterianos como la virulencia, el ciclo celular, la movilidad y la formación de biofilms. El número de proteínas que las distintas especies dedican a la síntesis y degradación de c-di-GMP es variable, pero en general es muy elevado (20 proteínas en *Salmonella typhimurium*, 29 en *Escherichia coli*, 51 en *Pseudomonas aeruginosa*, 62 en *Vibrio cholerae*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/c-di-GMP.html). Existe un amplio consenso acerca de la relación entre niveles elevados de c-di-GMP y la activación de la biosíntesis de polisacáridos de la matriz extracelular de los biofilms y de adhesinas, al mismo tiempo que inhibe la movilidad bacteriana (Jenal et al., 2017; Römling et al., 2013). Por tanto, se considera que este nucleótido tiene un papel esencial en la regulación de la transición entre un modo de vida planctónico a un modo de vida sésil (Pérez-Mendoza and Sanjuán, 2016; Simm et al., 2004). Los niveles de c-di-GMP en la bacteria dependen de proteínas con actividad diguanilato ciclasa (caracterizadas por tener dominios GGDEF conservados) encargadas de la síntesis del nucleótido y de enzimas fosfodiesterasas (caracterizadas por tener dominios EAL o HD-GYP), que lo degradan a 5'GMP-GMP (EAL) ó a 2 moléculas de GMP (HD-GYP) (Schmidt et al., 2005). Para llevar a cabo la transmisión de señal, el c-di-GMP necesita unirse a moléculas efectoras que a su vez activan dianas específicas que desencadenan una respuesta o cambio fenotípico en la bacteria. Los principales efectores del c-di-GMP son moléculas de ARN (riboswitch), proteínas con dominios tipo PilZ y diversos factores de transcripción que, como consecuencia de la unión del c-di-GMP regulan, la transcripción de genes implicados en la síntesis de la matriz del biofilm o en la

actividad flagelar (Hengge, 2016). En general, el número de receptores de c-di-GMP conocidos es muy pequeño en relación al número de proteínas que intervienen en su síntesis/degradación. Esta desproporción es una de las grandes cuestiones abiertas en el campo del c-di-GMP y sugiere que todavía hay muchos receptores de c-di-GMP que no han sido descubiertos.

S. aureus presenta en su genoma dos proteínas con dominio GGDEF, GdpS (GGEEF) y GdpP, cuyo dominio GGDEF está degenerado (SSDQF) (Holland et al., 2008). Por otro lado, en el genoma de *S. aureus* no se identifican proteínas con dominios EAL o HD-GYP necesarias para degradar el c-di-GMP, ni proteínas con dominios receptores del nucleótido (Holland et al., 2008). El único componente de la vía de señalización regulada por c-di-GMP presente en *S. aureus* es GdpS y la función de esta proteína en la biología de la bacteria sigue siendo confusa. Existen distintos trabajos en los que se ha relacionado a GdpS con un aumento de la producción del polisacárido PIA/PNAG (Holland et al., 2008; Zhu et al., 2017). Sin embargo, también existen trabajos en los que la presencia de GdpS no afecta o afecta negativamente a la síntesis del polisacárido (Fischer et al., 2014; Shang et al., 2009). Hacen falta nuevos estudios para determinar si estas diferencias se deben a distintas condiciones experimentales o al uso de distintas cepas de *S. aureus*. Con independencia de cuál sea el papel de GdpS en la síntesis del PIA/PNAG y la producción de biofilms, todos los datos apuntan a que esta proteína no es capaz de sintetizar c-di-GMP y que por tanto, su función en la bacteria no está relacionada con la síntesis de este mensajero secundario (Zhu et al., 2017).

c-di-AMP

Desde su identificación en 2008 (Witte et al., 2008), el papel regulador del c-di-AMP ha sido activamente estudiado en *S. aureus* (Corrigan et al., 2011). La síntesis de c-di-AMP depende de proteínas que presentan dominios tipo DAC y su degradación de fosfodiesterasas con dominios tipo DHH. A diferencia del gran número de proteínas que las bacterias dedican a sintetizar/degradar c-di-GMP, el número de proteínas dedicadas a la síntesis/degradación de c-di-AMP suele ser muy reducido. *S. aureus* contiene una única diadenilato ciclasa (DacA) y una única enzima con actividad fosfodiesterasa denominada GdpP. Ante la presencia de determinadas señales ambientales las proteínas de síntesis o degradación del c-di-AMP se activan y modifican el nivel intracelular del dinucleótido (Corrigan and Gründling, 2013).

En muchas bacterias, el c-di-AMP es un mensajero secundario esencial y su acumulación puede resultar tóxica, por lo que la homeostasis de este dinucleótido cíclico necesita estar altamente regulada. El c-di-AMP está involucrado en la reparación de ADN, la síntesis de la pared celular, la homeostasis del potasio o la virulencia de la bacteria (Commichau et al., 2015). En todos los Firmicutes estudiados hasta el momento *Lysteria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus* el gen *dacA* es esencial (Chaudhuri et al., 2009; Corrigan et al., 2015; Luo and Helmann, 2012; Mehne et al., 2013; Song et al., 2005; Woodward et al., 2010). La esencialidad del c-di-AMP en Firmicutes se ha relacionado con dos motivos: el c-di-AMP podría actuar como co-factor de proteínas esenciales o podría inhibir la actividad de compuestos tóxicos y por tanto tener un efecto protector, como ya se ha observado en otros ejemplos de proteínas esenciales en *B. subtilis* (Commichau et al., 2013).

Al igual que el c-di-GMP, la molécula de c-di-AMP se une a diferentes receptores diana y modifica alostéricamente la función de estos o de otras moléculas de la cascada de señalización. Las proteínas capaces de unir c-di-AMP en *S. aureus* descritas hasta el momento son: KtrA, componente de uno de los transportadores de K⁺ en *S. aureus*; CpaA, transportador de Na⁺/K⁺; la histidina quinasa, KdpD, encargada de regular un sistema secundario de adquisición de potasio dependiente de ATP, KdpFABC, y el receptor PstA (Corrigan and Gründling, 2013).

Cambios en los niveles de c-di-AMP se han relacionado con procesos como la síntesis y homeostasis de la pared celular. El aumento de los niveles de c-di-AMP, debido a la mutación de la enzima GdpP, disminuye la susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos y permiten que *S. aureus* pueda crecer en ausencia de ácidos lipoteicoicos, componente principal de la pared celular, por un mecanismo desconocido (Corrigan et al., 2011; Griffiths and O'Neill, 2012).

Por otro lado, el c-di-AMP producido por bacterias intracelulares es reconocido por una proteína de la célula del hospedador, denominada STING, que induce la producción de interferón tipo I (Burdette and Vance, 2013; Woodward et al., 2010). *S. aureus* es capaz de sintetizar c-di-AMP cuando está formando parte de un biofilm y secretar el nucleótido durante la lisis celular. Se ha descrito que el c-di-AMP liberado es detectado por células del sistema inmune como macrófagos y da lugar a una activación de la respuesta mediada por interferón tipo I (Gries et al., 2016).

2.2. Fosforilación (Ser/Thr-quinasas)

Los procesos de transducción de señal basados en la fosforilación reversible de proteínas son mecanismos utilizados tanto en células eucariotas como en procariotas. La fosforilación se produce mediante la actividad de proteínas con actividad quinasa específicas que, generalmente, tienen asociada una proteína con actividad fosfatasa (Ohlsen and Donat, 2010). Las bacterias presentan gran cantidad de quinasas con capacidad para fosforilar diferentes aminoácidos (Mijakovic et al., 2016). En procariotas la detección de señales y la transmisión de la información al interior de la célula es llevada a cabo principalmente por los sistemas de transducción de señal de dos componentes (TCSs), donde el receptor de membrana se fosforila en un residuo de histidina que luego se transfiere a un residuo de ácido aspártico del regulador de respuesta (RR). Sin embargo, las bacterias también utilizan la fosforilación en residuos de serina/treonina (Ser/Thr) o tirosina como sistema de transducción de señal (Janczarek et al., 2018; Ohlsen and Donat, 2010). La fosforilación de estos aminoácidos es característica de células eucariotas, porque esta fosforilación es más estable y alarga la vida media de las proteínas fosforiladas, lo cual resulta necesario para que las proteínas puedan transmitir la información en su viaje hasta el núcleo.

Las primeras evidencias de la relevancia de la fosforilación en serina/treonina provienen de los análisis del fosfoproteoma de *B. subtilis*. Los resultados mostraron que este sistema de fosforilación regulaba el metabolismo de carbohidratos, transporte, respuesta a estrés y desarrollo (Eymann et al., 2007; Lévine et al., 2006). En el caso de *S. aureus*, el genoma contiene dos serina/treonina quinasas (Stk1 y Stk2) (Kalantari et al., 2015; Ohlsen and Donat, 2010). Como ya se ha indicado, la fosforilación en residuos de serina y treonina es más estable que en los residuos de histidina y por tanto los fenómenos de fosforilación basados en STKs necesitan de la actividad de una fosfatasa específica que se encargue de apagar la ruta de señalización cuando desaparece el estímulo (Dworkin, 2015). En el genoma de *S. aureus* se han identificado dos proteínas con actividad serina/treonina fosfatasa, Stp1 (fosfatasa asociada a Stk1) y RsbU. RsbU regula positivamente al factor de respuesta a estrés de bacterias Gram positivas, SigB. En condiciones de estrés RsbU desfosforila al factor anti-anti-sigma RsbV permitiendo la unión de este a RsbW (factor anti-sigma) y liberando así a SigB. Una vez liberado, SigB se asocia a la RNA polimerasa y activa la transcripción de genes (Yang et al., 1996).

A diferencia del caso de las HKs en los TCSs, los sustratos de Stk1/2 pueden ser muy variados. En *S. aureus* el sistema Stk/Stp está implicado en la regulación de la expresión de genes a través de la fosforilación de diferentes factores de transcripción como MgrA (Truong-Bolduc et al., 2008), CcpA (Leiba et al., 2012) y SarA (Didier et al., 2010). La fosforilación de residuos de serina en MgrA afecta al dominio de dimerización del factor de transcripción y como consecuencia la unión de MgrA al ADN. Esto provoca la desregulación de factores como NorA, una bomba de antibióticos que provoca un aumento en la resistencia de las bacterias a antibióticos como norfloxacino o ciprofloxacino (Truong-Bolduc et al., 2008). Del mismo modo, la fosforilación de residuos de treonina en el dominio de unión a ADN del factor CcpA provoca la disminución de la interacción entre la proteína y las secuencias promotoras de los genes regulados por esta. Como consecuencia, se produce una alteración en la regulación de factores implicados en la síntesis de biofilm y en el metabolismo de azúcares (Leiba et al., 2012). En el caso de SarA, este puede ser fosforilado tanto por Stk1, en residuos de treonina, como por Stk2, en residuos de serina. En el primer caso, este proceso aumenta la afinidad de la interacción entre la proteína y el ADN, mientras que en el segundo caso se produce una disminución de la misma (Didier et al., 2010).

Por otro lado, existen estudios que prueban el papel de sistema Stk/Stp en la síntesis y metabolismo de la pared celular de *S. aureus*. Cepas mutantes en Stk1 presentan fenotipos con tamaños celulares alterados, crecimiento más lento y alteraciones en la formación del septo durante la división celular. Además, estas cepas son más susceptibles a antibióticos dirigidos a la pared celular (betalactámicos) (Beltramini et al., 2009; Didier et al., 2010; Jarick et al., 2018; Liebeke et al., 2010). Se ha demostrado también la participación de Stk1 en el proceso de virulencia de *S. aureus* en un modelo murino de infección renal. La capacidad para colonizar los riñones se ve disminuida en cepas mutantes en Stk1 debido principalmente a limitaciones metabólicas que reducen su capacidad para sobrevivir en el hospedador (Débarbouillé et al., 2009)

Por último, es especialmente destacable la relación cruzada entre las vías de señalización reguladas por Stk/Stp y los TCSs, debido a la capacidad de Stk1 para fosforilar los reguladores de respuesta GraR y VraR. En ambos casos, la fosforilación de múltiples residuos de treonina en el dominio de unión a ADN de GraR y VraR afecta negativamente a su interacción con el ADN (Canova et al., 2014; Fridman et al., 2013).

3. Sistemas de dos componentes (TCSs)

Un sistema de dos-componentes (TCS) canónico está formado por una histidina quinasa (HK) encargada de monitorizar la presencia de estímulos externos y transferir la información al correspondiente regulador de respuesta (RR) a través de un proceso de fosforilación. Las señales externas modulan la actividad de la HK a través de su dominio sensor. Una vez activada, la HK se autofosforila en un residuo conservado de histidina localizado en el núcleo quinasa de la proteína. Posteriormente, el grupo fosfato es transferido al residuo conservado de ácido aspártico del RR en su dominio regulador (Fig. 1) (Stock et al., 2000).

Figura 1. Representación esquemática de un sistema de dos componentes canónico, una histidina quinasa híbrida y una histidina quinasa de clase II. A. La vía de fosforilación típica de los TCSs está basada en la transferencia de un grupo fosfato entre los dominios conservados de la HK (DHp y CA) y el dominio receptor (REC) del RR. Los diferentes tipos de dominios de las HKs y la clasificación de los RRs en función del tipo de dominio efector que presentan están indicados en los paneles laterales e inferior respectivamente. B. Las HKs híbridas presentan dominios tipo REC y/o de fosfotransferencia (HPT) adicionales. Los dominios HPT pueden localizarse también en proteínas accesorias. En este caso se da una fosfotransferencia con retardo (*phosphorelay*) que favorece la regulación de señales a diferente nivel. C. Las HKs de clase II presentan un dominio HPT separado del dominio CA mediante un dominio sensor y de dimerización.

3.1. Histidina quinasas

La principal característica estructural de las HKs es su núcleo quinasa, formado por el dominio de dimerización (DHP) y el dominio catalítico (CA) encargado de la unión y transferencia de los grupos ATP/ADP. Por otro lado, en la región amino-terminal de la proteína se localiza el dominio sensor, responsable de la detección directa o indirecta de las señales activadoras de la HK. Existe una gran variedad de dominios sensores y la diversidad de las secuencias que los forman, apoyan la idea que estos están diseñados para detectar estímulos específicos. Este dominio conecta con el centro catalítico a través de dominios transmembrana esenciales para la correcta transducción de la señal (Stock et al., 2000).

Las proteínas sensoras se pueden clasificar en función de la estructura de los dominios sensores y los mecanismos de detección de los estímulos. En un primer grupo, se encuentran las HKs con dominios sensores extracelulares. Son el grupo más extenso y se caracterizan por presentar un dominio sensor flanqueado por dos hélices transmembrana que lo separan del dominio quinasa que se localiza en un compartimento celular diferente. En este caso, la HK detecta nutrientes u otros solutos. Un segundo grupo de HKs son las que presentan mecanismos de detección asociados a la membrana. Estas HKs detectan estímulos relacionados con la membrana celular o con procesos que ocurren en la interfaz de la membrana, a través de dominios transmembrana. Por último se encuentran las HKs citoplasmáticas, que pueden estar ancladas a la membrana o solubles pero cuyos dominios sensores se localizan en el interior del citoplasma. Esta clase de HKs detecta la presencia de solutos citoplasmáticos o proteínas determinantes del estado metabólico y/o del desarrollo de la célula o el ciclo celular. Otros TCSs citoplasmáticos responden a la presencia de moléculas difusibles internas como el oxígeno y el hidrogeno molecular, así como a estímulos transmitidos a través de sensores transmembrana (Mascher et al., 2006).

Los dominios sensores más comunes en las HKs que se activan a través de señales externas son los dominios PAS. Podemos encontrar dos tipos: los dominios PAS, como los que se describen para CitA (Sevvana et al., 2008) o PhoQ en *Salmonella typhimurium* (Bader et al., 2005) que reconocen a sus ligandos en estructuras tipo bolsillo o sobre la superficie molecular expuesta, respectivamente; y los dominios sensores extracelulares de tipo alfa hélices como en el caso del quimiorreceptor Tar

(Milburn et al., 1991). Los dominios sensores más frecuentes en HKs que detectan estímulos a nivel de la membrana son de tipo HAMP o STAC, que establecen conexiones entre la región transmembrana y los dominios citoplasmáticos (Zschiedrich et al., 2016). En el caso de los dominios sensores citoplasmáticos, estos pueden ser dominios citoplasmáticos tipo PAS y/o GAF (Fig. 1).

Las HKs también se pueden clasificar en función de su dominio DHp, dividiéndose en cuatro familias Pfam: la sub-familia HisKA a la que pertenecen la mayoría de las HKs, siendo EnvZ y NtrB sus principales ejemplos, y las subfamilias menos frecuentes HisKA_2, HisKA_3 e His_kinase (Fig. 1).

También podemos encontrar HKs denominadas de clase II que, en vez de dominio DHp, presentan un dominio HPt separado del dominio CA a través del dominio sensor y de dimerización y que presenta un residuo de histidina que le permite participar en procesos de fosforilación. La función de estos dominios parece basarse en la comunicación entre proteínas diferentes (Bilwes et al., 1999; Dutta et al., 1999). Finalmente, el dominio catalítico de las HKs pertenece a una única familia Pfam, HATPase_c (Zschiedrich et al., 2016) (Fig. 1).

Toda esta estructura molecular sirve en última instancia para que ante la presencia de un estímulo, la HK inicie la cascada de señalización. El primer paso es la autofosforilación del residuo de histidina en el dominio DHp. El proceso de autofosforilación puede ocurrir tanto en *cis* (cada monómero de HK se fosforila así mismo) como en *trans* (cada monómero de HK fosforila a otra molécula de HK), dependiendo de la orientación (izquierda o derecha) de las hélices que forman los dominios transmembrana, que son esenciales para la transferencia de la información al interior de la célula (Ashenberg et al., 2013; Casino et al., 2014). Así, la autofosforilación, el proceso de dimerización y los cambios conformacionales en los dominios transmembrana son claves en la activación de las HKs.

3.2. Reguladores de respuesta

Los reguladores de respuesta (RR) reciben el grupo fosfato de la histidina de la HK en un residuo de ácido aspártico. La fosforilación del RR provoca cambios conformacionales que facilitan la interacción entre los RRs y diferentes moléculas y son necesarios para que se produzca la respuesta celular correspondiente (Stock et al., 2000). La mayoría de los RRs están formados por dos dominios: un dominio regulador conservado en la región amino-terminal (REC) y un dominio efector variable en la

región carboxilo-terminal. Existen también RRs que presentan únicamente el dominio REC, el cual actúa tanto de dominio regulador como efector, como es el caso del RR CheY (Szurmant and Ordal, 2004). Otros RRs atípicos son Spo0F en *B. subtilis* que, con un único dominio REC, participa como intermediario en procesos de fosforilación durante la esporulación bacteriana (Appleby et al., 1996; Burbulys et al., 1991) y JadR1 en *Streptomyces venezuelae* que funciona de forma independiente a la fosforilación y está involucrado en la producción del antibiótico jadomicina (Wang et al., 2009).

Los dominios REC presentan muy baja similitud entre ellos (<25%), únicamente los residuos encargados de la fosforilación y la reorganización estructural de las moléculas se encuentran conservados. La fosforilación del residuo de ácido aspártico provoca una perturbación en la superficie de la molécula que afecta a residuos conservados de Thr/Ser o Phe /Tyr (switch residues) cuyo estado de rotación va a determinar el paso del estado de inactivación a activación del RR. Además, la fosforilación y consiguiente activación de los RRs favorece en muchos casos la formación de dímeros, oligodímeros e incluso heterodímeros con otras proteínas. Todos estos cambios moleculares necesarios para el paso de una forma inactiva a una forma activa del RR se producen a través de un mecanismo de transición continuo entre ambos estados de la proteína (Zschiedrich et al., 2016).

Por otro lado, la defosforilación de los RRs también juega un papel clave para la finalización de la transducción de la señal y la adaptación bacteriana. Los cambios estructurales que se producen durante la activación de los RRs también pueden influir en la velocidad a la que se produce la defosforilación, haciendo más visibles los residuos receptores del ataque nucleofílico para las fosfatasas específicas o las HKs con actividad fosfatasa (Zschiedrich et al., 2016).

Existen anotados más de 80000 proteínas RR. Esta super-familia se puede dividir en cinco clases de acuerdo con el tipo de dominio efector: unión a ADN, unión a ARN, actividad enzimática, unión a proteínas y RR de dominio único (Fig. 1).

Aproximadamente el 70% de los RRs presentan un dominio efector de unión a ADN y actúan por tanto como reguladores de la transcripción. Como consecuencia de la fosforilación, estos RRs suelen formar homodímeros u oligómeros, aumentando así la afinidad por los motivos de unión a ADN específicos. Estos RRs se pueden dividir en las siguientes cuatro sub-familias: OmpR y NarL con dominios tipo hélice-giro-hélice

(HTH) son las subfamilias más abundantes y su actividad sigue la mecánica prototipo descrita (Nguyen et al., 2015; Vashist et al., 2016); NtrC, se caracteriza por presentar una conformación de dímeros inactiva (no fosforilada) en solución. Como consecuencia de la fosforilación se activa la oligomerización y se produce la formación de complejos junto con la ARN polimerasa (Batchelor et al., 2009). Por último, la subfamilia LytTR con un inusual dominio formado por láminas- β , cuya unión al ADN provoca el giro del ADN modulando así la expresión de los promotores (Nikolskaya, 2002; Sidote et al., 2008).

Los RRs con dominio efector de unión a ARN suponen solo el 1% y forman parte de la sub-familia AmiR, con dominios efectores reguladores de la anti-terminación de la transcripción (ANTAR) (O'Hara et al., 1999; Shu and Zhulin, 2002).

Un 8% de los RRs pertenecen a la sub-familia de RRs con dominios efectores con actividad enzimática, como la metilesterasa CheB (Djordjevic et al., 1998; Simms et al., 1985) o los RRs con actividad enzimática implicada en la homeostasis de dinucleótidos cíclicos con dominios con actividad diguanilato ciclasa (GGDEF) o fosfodiesterasa (EAL o HD-GYP) (Römling et al., 2005). Existen también RRs que combinan los dominios REC con dominios fosfatasa de residuos de serina, treonina o ácido aspártico (Szurmant et al., 2004).

Por último, además de los RRs de dominio único nombrados anteriormente (CheY, spo0F) se pueden encontrar RRs con dominios de unión a proteínas. La principal sub-familia en este grupo es la formada por CheV, proteína que se caracteriza por su papel regulatorio en el proceso de esporulación de *B. subtilis* gracias a su unión a la proteína CheW (Karatan et al., 2001).

3.3. Evolución de los sistemas de dos componentes

Los TCSs son uno de los grupos de proteínas más prevalentes en los genomas de las bacterias. En la mayoría de los casos ambas proteínas se codifican a partir de la misma unidad transcripcional y han podido ser identificados a partir de análisis de homología de secuencias. El número de TCSs aumenta de forma proporcional al tamaño del genoma de la bacteria y a la complejidad y variabilidad de los ambientes y/o nichos en los que habita. De esta forma, bacterias cuyo nicho es muy constante o están presentes en un número reducido de ambientes presentan un número menor de TCSs (Capra and Laub, 2012). El caso extremo se puede encontrar en los patógenos intracelulares como bacterias del género *Mycoplasma*, que no contiene ningún TCS o

bacterias con un ciclo de vida complejo y capaces de vivir en diferentes condiciones ambientales que en los casos extremos pueden llegar a tener centenares de TCSs (Gumerov et al., 2019). Esto sugiere que las bacterias tienen la capacidad de expandir el número de TCSs para ampliar el número de condiciones ambientales en los que pueden desarrollarse (Fig. 2).

Figura 2. Número de sistemas de dos componentes en diferentes especies bacterianas.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html

El incremento en el número de TCSs presentes en el genoma de una bacteria se asume que se ha podido producir a través de dos mecanismos: duplicación de genes y transferencia lateral de genes. Con independencia del mecanismo, cuando un nuevo gen se incorpora al cromosoma en una bacteria, es necesario que proporcione una ventaja selectiva en un período breve de tiempo que evite la acumulación de mutaciones y su inactivación. Si el nuevo gen procede de la duplicación de un gen existente, el nuevo gen necesita acumular cambios que le diferencien funcionalmente del gen del que procede. Para ello, los cambios que pueden tener lugar en las proteínas son la sustitución de aminoácidos o la reorganización de dominios. En el caso de las HKs los cambios normalmente se producen en el dominio sensor que permiten a la nueva HK detectar señales diferentes. En cambio, los RRs acumulan cambios en el dominio efector, de modo que la respuesta y la cascada de señalización que se desencadena sean diferentes. El proceso evolutivo también debe afectar a los residuos necesarios para los procesos de dimerización, tanto en las HKs como en los RRs, donde la interacción inter-molecular es necesaria para su funcionalidad (Capra and Laub, 2012). Una dificultad adicional de este proceso de evolución es que los cambios entre cada pareja de HK y su correspondiente RR deben ocurrir de forma que la especificidad de la interacción se mantenga.

Durante el proceso evolutivo pueden surgir TCSs huérfanos, en los que uno de los componentes del sistema de señalización se pierde. Este fenómeno puede afectar tanto a la HK como al RR. En el caso de las HK huérfana, estas suelen modificar su dominio sensor pero mantienen su reconocimiento sobre el RR de la HK ancestral y, como consecuencia, diferentes señales son capaces de activar las mismas rutas en el interior de la bacteria. En el caso de los RRs huérfanos, estos suelen modificar su dominio efector, de forma que pueden dar una respuesta diferente frente a un mismo estímulo (Capra and Laub, 2012).

3.4. Especificidad de la señal y cross-talk

La generación de un nuevo TCS requiere por un lado mantener la especificidad entre las parejas de HK-RR y evitar procesos de interferencia cruzada (*cross-talk*) con los TCSs presentes en la bacteria. El concepto de *cross-talk* fue introducido por primera vez por Hellingwerf *et al*, al observar cómo la gran duplicidad y redundancia en los TCSs podría tener como consecuencia la aparición de interacciones cruzadas (Hellingwerf *et al*, 1995). Se entiende como *cross-talk* la comunicación entre dos vías de señalización que contienen dos rutas canónicas intactas y funcionalmente independientes (Laub and Goulian, 2007). Los principales mecanismos que utilizan las bacterias para mantener la especificidad y evitar el *cross-talk* son: (i) la co-evolución de determinantes moleculares. El proceso de transferencia del grupo fosfato está basado en la interacción de residuos conservados del dominio DHp de las HKs, que sirven como ancla, con residuos conservados del dominio REC de los RRs. La interacción específica entre cada pareja de HK-RR está regida por la presencia de residuos hiper-variables localizados alrededor de los residuos conservados. Estos determinantes deben coevolucionar conjuntamente para evitar posibles *cross-talk* (Bijlsma and Groisman, 2003; Capra *et al*, 2012b; Skerker *et al*, 2008).; (ii) un ratio elevado de RRs respecto a HKs. En presencia de un mayor número de moléculas de RRs, la probabilidad de encontrar RRs libres para recibir el grupo fosfato es mayor y la competencia con los RRs no canónicos también aumenta (Laub and Goulian, 2007); (iii) la restricción espacial. Aunque es más frecuente en células eucariotas, también puede ayudar a mantener la especificidad entre TCSs en procariotas. Como ejemplos podemos destacar la localización en diferentes regiones de la célula de algunos quimiorreceptores (Laub and Goulian, 2007; Sourjik and Armitage, 2010; Wadhams *et al*, 2003) y el caso de las HKs híbridas, donde la presencia del dominio tipo REC puede actuar como separadorespatial y también temporal en la transmisión de la señal

evitando así posibles *cross-talks* (Capra et al., 2012a); (iv) la actividad fosfatasa de las HKs. Un gran porcentaje de HKs tienen esta doble función y suponen uno de los principales métodos de regulación de la actividad de los TCSs. Además de autofosforilarse, son capaces de eliminar el grupo fosfato de su correspondiente RR. De esta forma, son capaces de restaurar el estado basal del sistema tras la activación de la señal y evitar el *cross-talk* de su RR impidiendo la fosforilación de la molécula por parte de otras HKs u otras moléculas donadoras de fosfato, especialmente en ausencia de la señal (Laub and Goulian, 2007); (v) modificación del RR. Los RRs pueden protegerse a sí mismos frente actividades inespecíficas en ausencia de señal, modificando la interfaz de sus dominios REC y efector impidiendo así la fosforilación por parte de otras moléculas distintas a su HK correspondiente (Barbieri et al., 2010; Boll and Hendrixson, 2011).

En general, la selección natural va en contra de la aparición del *cross-talk*. Diferentes modelos matemáticos sugieren que uno de los primeros cambios que deben darse durante la evolución de los TCSs es la mutación en residuos específicos que eviten la aparición de interferencias con otros sistemas. A continuación se deben dar los cambios necesarios para la adquisición de nuevas funciones, tanto en la HK como en el RR (Capra et al., 2012b; Rowland and Deeds, 2014). Sin embargo, existe un cierto grado de interacción entre distintas vías de señalización que permite la integración de la información y genera una respuesta más diversa (Agrawal et al., 2016). La comunicación cruzada entre sistemas de señalización se puede producir a través de diferentes mecanismos: (i) heterodimerización de HKs. Los dominios DHp de las HKs son muy similares, lo que puede facilitar la aparición de heterodímeros antes o durante la activación de la señal, afectando a la respuesta de ambas HKs o a una u otra HK (Agrawal et al., 2016); (ii) heterodimerización de RRs. Existen diferentes ejemplos que demuestran que la formación de heterodímeros de RRs no solo es posible sino que puede ayudar y favorecer la integración de señales y la co-regulación de genes (Al-Bassam et al., 2014; Gao et al., 2008; Pannen et al., 2016); (iii) transferencia de fosfato entre parejas no canónicas de TCSs. Este es el mecanismo más plausible de *cross-talk*. Existen numerosos ejemplos de este tipo de interacción tanto *in vitro* como *in vivo* (Al-Bassam et al., 2014; Gao et al., 2008; Pannen et al., 2016; Villanueva et al., 2018). Las implicaciones fisiológicas de algunas de estas relaciones cruzadas se han podido explicar, pero quedan muchas asociaciones por investigar; (iv) co-regulación del mismo grupo de genes. Aproximadamente un 70% de los RRs tienen

función de factores de transcripción, por lo que es posible que muchos de ellos presenten los mismos dominios de unión a ADN y reconozcan secuencias similares co-regulando así la expresión de los mismos genes diana. Ejemplos conocidos son los de NarL y NarP, capaces de reconocer algunos comunes pero con diferente afinidad (Darwin et al., 1997) o el caso de CusR y YedW, que se unen a la misma secuencia en función de las condiciones ambientales (Urano et al., 2015). Esta co-regulación también se puede dar entre RRs y otro tipo de factores de transcripción (Carpenter et al., 2015; Feng and Cronan, 2012); (v) Rregulación entre diferentes TCSs. La primera evidencia de regulación de un TCS a través de otro TCS se observó en *B. subtilis* (Birkey et al., 1998). Los TCSs pueden utilizar proteínas auxiliares para conectar los distintos TCSs de modo que, por ejemplo, la expresión de un TCS puede afectar la respuesta producida por otro TCS (Agrawal et al., 2016). Además, los TCSs pueden regular la adaptación de los sistemas a través de circuitos de auto-regulación (positiva o negativa) (Salazar and Laub, 2015).

En resumen, parece que es el equilibrio entre especificidad y *cross-talk* lo que genera una respuesta adaptativa más beneficiosa para la bacteria.

3.5. *Phosphorelay e integración de señales*

Las rutas de señalización en bacterias, aunque menos complejas que en eucariotas, también están gobernadas por procesos de regulación sofisticados que permiten integrar la información de forma eficiente. Existen dinámicas funcionales más complejas, como la fosfotransferencia con retardo (*phosphorelay*) o las redes de multi-quinasas (MKN). A diferencia de otras vías de señalización, los fenómenos de *phosphorelay* necesitan de elementos accesorios a la vía. La transferencia del grupo fosfato no se produce de manera directa entre la HK y el RR correspondiente. En este caso, el grupo fosfato se transfiere a residuos de histidina en dominios tipo Hpt o residuos de ácido aspártico en dominios tipo REC que pueden estar localizados en la propia HK (como en el caso de las HK híbridas) o en proteínas auxiliares con dominios de este tipo (Hpt y/o REC) encargadas de conectar la HK con su correspondiente RR (Stock et al., 2000) (Fig. 1). Esta transferencia del grupo fosfato con retardo permite establecer puntos de control en la cascada de señalización y genera un distanciamiento temporal y espacial en la transferencia de la señal. Además, en el caso de la HK híbrida la presión evolutiva es mucho menor, ya que la especificidad no está basada en reconocimiento molecular sino en la cercanía espacial, por lo que al

duplicarse la HK no necesita diversificar sus residuos tan rápidamente (Salazar and Laub, 2015).

Por otro lado, las vías de señalización pueden lograr un nivel superior de regulación e integración de señal mediante la formación de las denominadas redes de multi-quinasas (MKN). Estas redes se pueden construir siguiendo dos principios: (i) HKs que fosforilan las mismas dianas en la cascada de señalización (RRs o proteínas con dominios REC) y/o (ii) HKs que interaccionan entre ellas modulando la respuesta correspondiente. El número de redes MKN que se han descrito en los últimos años es cada vez mayor y pone de manifiesto que estas redes permiten la regulación de procesos complejos en la bacteria como la esporulación, la formación de biofilms, la división celular o la virulencia de la bacteria a través de estructuras complejas de fosfotransferencia que permiten la integración de la señal y la toma de decisiones (Francis and Porter, 2019).

3.6. Sistemas de dos componentes en *S. aureus*

El genoma de *S. aureus* contiene dieciséis TCSs. Este número es constante, salvo para algunas cepas MRSA que presentan una copia adicional, homóloga a la copia cromosómica del TCS KdpDE, en un elemento móvil del cromosoma tipo mec (SCCmec) (Hanssen and Ericson Sollid, 2006; Kuroda et al., 2001).

Los TCS de *S. aureus* se pueden clasificar siguiendo los criterios descritos anteriormente. De esta forma, en el caso de los RRs podemos agruparlos en función del tipo de dominio de unión a ADN que presentan. Algo característico de los TCSs de *S. aureus* es que todos ellos presentan algún tipo de dominio de unión a ADN y por tanto todos ellos se pueden comportar como factores transcripcionales. En concreto, nueve de ellos forman parte de la sub-familia OmpR, cuatro pertenecen a la familia NarL, los RRs de los sistemas AgrCA y LytSR son miembros de la familia LytTR y por último, el sistema HptSR está incluido en la familia YesN de dominios de unión a ADN. A su vez los TCSs de *S. aureus* se pueden dividir siguiendo como criterio el tipo de dominio DHp de las HKs. Entre ellos, siete forman parte de la familia HisKA, cuatro de la familia HisKA_3, dos de la familia His_kinase y tres no pueden ser clasificados. Además, cabe destacar que dos de las HKs no contienen dominios transmembrana (AirS y NreB), por lo que se consideran HK citoplasmáticas y que al menos otras dos HKs (GraS y BraS) son proteínas sensoras asociadas a membrana mientras que el resto presentan dominios sensores extracelulares (Fig. 3).

Todos los TCSs de *S. aureus* se organizan en forma de operones y no existen en el genoma de *S. aureus* HKs o RRs huérfanos. Información detallada sobre la organización de los operones, las señales activadoras de las HKs, la función de las proteínas accesorias y los genes que forman parte de los regulones descritos para cada TCSs se desarrollará a lo largo del capítulo de resultados de este trabajo.

Figura 3. Organización y topología de los dominios de los dieciséis sistemas de dos componentes de *S. aureus*. Los tipos de dominios y su clasificación están basados en los datos del NCBI (búsqueda de dominios conservados) y los dominios transmembrana se predijeron con el servidor TMHMM v. 2.0.

4. Sistemas de dos componentes: nuevas dianas terapéuticas

El descubrimiento de los antibióticos supuso una de las mayores revoluciones de la medicina moderna. En la era postantibiótica, el número de muertes debidas a infecciones se redujo de forma muy significativa y ha pasado de ser la principal causa de muerte en el hombre a ocupar la segunda posición detrás de los procesos cardiacos. Sin embargo, la utilización masiva de antibióticos ha facilitado la selección constante de mutantes resistentes a cualquier terapia basada en antibióticos (Ghosh et al., 2019; Worthington et al., 2013). La presencia y prevalencia de patógenos multi-resistentes (MDR) es cada vez mayor y según la Organización Mundial de la Salud supone una de las principales amenazas para la humanidad (Worthington et al., 2013). Existe por tanto la necesidad de identificar nuevas dianas alternativas que combinadas con los antibióticos nos permitan combatir a las bacterias multiresistentes a los antibióticos.

Los TCSs están presentes en Bacteria, Archaea y Eukarya, pero no están presentes en mamíferos, lo que los convierte en unas potenciales dianas terapéuticas. Los TCSs tienen un papel fundamental en la supervivencia de las bacterias en diferentes condiciones (situaciones de estrés, pH, concentración de oxígeno, daño en la membrana...) y en la regulación de la adaptación a nuevas condiciones ambientales como la presencia de antibióticos en el medio (VraSR, BraSR, GraRS), la producción de factores de virulencia (SaeSR, AgrCA), la síntesis de biofilm (ArlSR, LytRS, etc.) o para detectar la densidad de la población de bacterias (quorum, AgrCA). La mayoría de los TCSs no son esenciales, aunque hay excepciones como el caso del TCS WalRK. Por tanto, moléculas inhibitoras de los TCSs podrían convertirse en fármacos antibacterianos complementarios a los antibióticos y en el caso de inhibidores de TCSs esenciales podrían servir para el tratamiento de bacterias multi-resistentes como las cepas MRSA o el grupo de Enterococcus resistentes a vancomicina (VRE) (Gotoh et al., 2010b).

Existen distintos puntos de la vía de señalización de los TCSs donde las moléculas inhibitoras pueden actuar. A nivel de la HK, impidiendo la unión del ligando, la autofosforilación o el proceso de dimerización de la proteína. A nivel de los RRs, inhibiendo su capacidad para aceptar la transferencia del fosfato, para dimerizar o para unirse al ADN. En el caso de las HKs el dominio catalítico (CA) es el más conservado, por lo que hasta el momento es en el que se ha centrado la búsqueda de

inhibidores. En el caso de los RRs tanto el dominio REC como el dominio efector están bastante conservados. La inhibición del RR parece más prometedora porque es la molécula encargada de regular la expresión de genes y, en consecuencia, de modificar el comportamiento de la bacteria. Por otro lado, también se ha sugerido que la homología entre diferentes TCSs permitiría que moléculas pequeñas podrían funcionar para varios TCSs (Worthington et al., 2013).

Hasta el momento los inhibidores de TCSs han sido descubiertos mediante técnicas *in silico* como las de cribado de alta de resolución *in vitro* (HTS) o las basadas en experimentos de análisis de la estructura virtual (SBVS) además de los cribados de fragmentos (FBS) que permiten estudiar el espacio químico de forma muy eficiente e identificar moléculas de menor tamaño (Velikova et al., 2016). Se han descrito moléculas inhibitoras para TCSs involucrados en la resistencia a antibióticos como, *VraRS* en *S. aureus* (Bonde et al., 2011); para TCSs relacionados con la producción de biofilms o factores de virulencia como *QseBC* en *E. coli* enterohemorrágico (LED209) (Curtis et al., 2014), *Algr1/2* de *P. aeruginosa* (Worthington et al., 2013), *PhoQP* en *Salmonella* (Tang et al., 2012) o *AgrCA* en *S. aureus* (Geisinger et al., 2009; Peterson et al., 2008), entre otros. También se han podido identificar y ensayar moléculas inhibitoras del TCS esencial *WalRK* como la *walkamicina B y C* (Okada et al., 2010) y la *waldyomicina* (Igarashi et al., 2013) que inhiben la actividad de la HK o la *walricina B* que inhibe al RR (Gotoh et al., 2010a). Otros ejemplos de moléculas dirigidas a HKs son los derivados de la tiramina, el *clorantel* o inhibidores de *Hpt90* (Ser/Thr quinasa de mamíferos con un dominio de unión a ATP similar al de las HK de bacterias). En el caso de inhibidores dirigidos a RRs destacan el *2-aminoimidazol (2-AI)* y los derivados de esta familia que, se ha visto, reducen la resistencia a oxacilina en cepas MRSA (Worthington et al., 2013).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La adaptación de las bacterias a nuevas condiciones ambientales está controlada por los sistemas de dos componentes (TCS). Aunque en los últimos años hemos adquirido un conocimiento muy detallado del funcionamiento de cada uno de los TCSs y de la función que realizan, nuestro conocimiento sobre cuestiones globales de la red como el solapamiento que existe entre las vías de señalización de cada TCA o su especificidad sigue siendo limitado. En esta tesis, utilizando una herramienta genética única desarrollada previamente en el laboratorio, hemos abordado la reconstrucción completa del regulón de TCSs en una célula viva. Por otro lado, hemos estudiado como la presencia/ausencia de TCS condiciona la biología de la bacteria y el proceso de especiación del género *Staphylococcus*. Finalmente, hemos desarrollado y evaluado nuevas estrategias terapéuticas frente a los TCSs de *S. aureus*.

En concreto, los objetivos específicos de esta tesis han sido:

- 1.- Caracterización del regulón completo y específico de todos y cada uno de los TCSs de *S. aureus* mediante técnicas transcriptómicas y proteómicas.
- 2.- Análisis comparativo del significado biológico de las diferencias entre TCSs de *S. aureus* y *S. saprophyticus* como estrategia para entender el papel de los TCSs en la especiación del género *Staphylococcus*.
- 3.- Desarrollo y evaluación de la actividad antimicrobiana de anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos específicos frente a la región sensora de la histidina quinasa, Walk.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Oligonucleótidos, plásmidos, cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas, los plásmidos y oligonucleótidos (Stabvida; Sigma-Aldrich) usados en este estudio están recogidos en la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3 (ver al final de esta sección). Para el cultivo de cepas de *Escherichia coli* XL1Blue (Stratagen), BL21 (Novagen) DC10B e IM01B (Monk et al., 2015, 2012), se utilizó medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Conda-Pronidasa). Para las cepas de *S. aureus* se utilizó como medio de cultivo el caldo soja triptocaseína (TSB) suplementado con un 0.25% de glucosa (TSBg) en los experimentos donde era requerido. Además, en función de las necesidades, los medios de cultivo fueron suplementados con los antibióticos necesarios en las siguientes concentraciones: eritromicina (Eri) 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$, ampicilina (Amp) 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ y cloranfenicol (Cam) 20 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Sigma).

Manipulación de DNA y transformación de bacterias

Se utilizaron procedimientos estándar para llevar a cabo la manipulación del ADN. Los plásmidos se purificaron utilizando el kit de miniprep NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Tanto las enzimas de restricción FastDigest como el kit de ligación de fragmentos de ADN "Rapid DNA Ligation kit" utilizados durante la construcción de los diferentes plásmidos fueron suministrados por Thermo Scientific. Para la realización de todos los procedimientos se siguieron las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se transformaron en las cepas de *E. coli* XL1Blue, DC10B e IM01B y en *S. aureus* siguiendo los protocolos descritos anteriormente (Valle et al., 2003). La preparación de las bacterias para ser transformadas por electroporación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Schenk and Laddaga (Schenk and Laddaga, 1992).

Construcción de los plásmidos recombinantes

Plásmidos expresando los mutantes fosfomiméticos para cada uno de los RR.

La versión fosfomimética de cada uno de los reguladores de respuesta se generó a través de PCR solapante entre dos fragmentos de ADN para sustituir el aminoácido de ácido aspártico conservado por el codón codificante para el aminoácido de ácido

glutámico, que imita la forma fosforilada activa de cada RR (Tabla. 3). Para garantizar un nivel de expresión similar para cada RR, en la región N-terminal del fragmento se incluyó la región de unión del ribosoma (RBS) procedente de *fhD2*, en sustitución de la RBS específica de cada RR. Los fragmentos de ADN se obtuvieron siguiendo procedimientos estándares de PCR y se clonaron en el plásmido pRMC2 (Corrigan and Foster, 2009) digerido con las enzimas *KpnI* y *SacI* y que cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor inducible de anhidrotetraciclina ($P_{xyl/tet}$).

Plásmidos expresando los TCSs completos

Los plásmidos expresando el TCS completo (histidina quinasa y regulador de respuesta) se construyeron en el plásmido pCN51 el cual contiene un promotor inducible por cadmio (P_{cad}) (Charpentier et al., 2004). Es importante destacar que este plásmido presenta una expresión basal sin la inducción con cadmio. Todos los experimentos de esta tesis en los que se ha empleado este plásmido se han llevado a cabo sin la adición de cadmio.

Plásmidos expresando NreC marcada con 3xFLAG

Para la obtención de los plásmidos con las proteínas NreC marcadas con el epítipo 3xFLAG se realizaron PCR solapantes de dos fragmentos. Los fragmentos de ADN se amplificaron con los oligonucleótidos especificados en la Tabla. 3. El fragmento final de la PCR se clonó en el plásmido pJET1.2/blunt. Para la ligación de los fragmentos en el plásmido final correspondiente estos, fueron digeridos con las parejas de enzimas *SphI* y *BamHI* en el caso de la construcción del pCN51::NreCB-3xflag y *KpnI* y *EcoRI* para el plásmido pRCM2::NreC-3xflag.

Plásmidos expresando la fusiones transcripcionales de los genes diana seleccionados.

Para obtener las fusiones transcripcionales, las regiones promotoras de los genes diana seleccionados para cada TCS se amplificaron utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla. 3. Los fragmentos de ADN se clonaron en el plásmido pJET1.2/blunt. Para la obtención de los plásmidos finales con las regiones promotoras fusionadas a la proteína GFP en el plásmido de expresión pCN52 (Charpentier et al., 2004) los fragmentos de ADN y el vector se digirieron con las enzimas *Sall* y *KpnI* o *Sall* y *BamHI* para la generación del plásmido con la fusión transcripcional del gen *MW1206*. En el caso de la construcción que contiene el

promotor del gen *mgrA*, el proceso de clonaje se llevó a cabo siguiendo protocolos de recombinación utilizando el sistema In-Fusion HD cloning kit (Takara). Los plásmidos resultantes se resumen en la Tabla. 2. Los plásmidos se transformaron en las cepas *S. aureus* Δ XV que ya contenían los plásmidos pRMC2 con el correspondiente RR* para cada TCS. Además, los plásmidos pCN52 con las regiones promotoras de los genes *efb*, *mgrA* y *qox* se transformaron en las cepas *S. aureus* MW2 salvaje y Δ XV (expresando el plásmido pRMC2 o no) como cepas control, junto con la colección de cepas de *S. aureus* mutantes en cada uno de los TCSs no esenciales (Villanueva et al., 2018).

Plásmidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes

El plásmido para la expresión y purificación del dominio de unión a ligando de la proteína WalK, pET46LIC::*walk_LDB*, se construyó siguiendo los siguientes pasos. Los cebadores WalK_LBD_LIC_FW y WalK_LBD_LIC_RV se utilizaron para amplificar la región del dominio sensor de la proteína. Siguiendo el protocolo del fabricante se realizó un tratamiento con ADN polimerasa T4 para generar los extremos compatibles con el plásmido en el inserto. Se calculó la cantidad exacta de inserto ($\mu\text{g mol}^{-1}$) y se llevaron a cabo dos incubaciones, la primera de 30 min a 22°C y una segunda de 20 min a 75°C para inactivar la enzima. Para la ligación, 0.5 μl del vector se incubaron con 2 μl del inserto tratado 5 min a 22°C. A continuación, se añadió 1 μl de EDTA (20 mM) y la reacción de ligación se incubó otros 5 min a 22°C. Finalmente, células quimiocompetentes *E. coli* GigaCell se transformaron con un 1 μl de la ligación. Para la expresión de la proteína recombinante, el plásmido obtenido se introdujo en la cepa de *E. coli* BL21.

Para la expresión y purificación de los nanoanticuerpos que reconocen diferentes epítomos del LBD de WalK se utilizó el plásmido pHE6 (Conrath et al., 2001) expresado en la cepa de *E. coli* WK6 (Zell and Fritz, 1987). Los plásmidos, pHEN6::*nAB:walk.1*, pHEN6::*nAB:walk.2*, pHEN6::*nAB:walk.3*, pHEN6::*nAB:walk.4* se obtuvieron mediante la digestión de los fragmentos desde los plásmidos pNV con el nanoanticuerpo correspondiente mediante las enzimas *NotI* y *SphI*. Como control de los experimentos y molde para las construcciones se utilizó el plásmido pHEN6::*nAB:egfr*.

Plásmidos para la transducción de *S. saprophyticus*

En primer lugar, construimos la nueva versión del plásmido pCN38 (Cam), pCN38::P_{cad} que contienen el promotor inducible por cadmio (P_{cad}), la región polilinker y los terminadores de la transcripción del plásmido pCN51 (Charpentier et al., 2004). El plásmido se obtuvo mediante la digestión del fragmento desde el pCN51 con las enzimas *SphI* y *EheI* y la posterior ligación en el plásmido pCN38 (Charpentier et al., 2004).

Para el resto de construcciones se siguió un proceso similar, los genes de las parejas de HK-RR de los TCSs, SaeSR, NreCB y BraSR, se digirieron desde el plásmido pCN51 que contenía cada uno de ellos (Tabla. 2) con la pareja de enzimas *SalI* y *AscI* y se ligaron en el plásmido final. La construcción que contiene la versión de NreC marcada con el epítipo 3xFLAG en el plásmido de pCN38::P_{cad} para la transducción con el fago $\phi 11$ se llevo a cabo de igual forma que las anteriores. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa de *S. aureus* RN4220 siguiendo los protocolos establecidos.

Análisis de las condiciones de expresión de los mutante fosfomiméticos de los RRs

Para determinar las condiciones de crecimiento óptimas de los reguladores de respuesta se llevaron a cabo ensayos con el plásmido pRMC2 con un gen reportero. Las bacterias se cultivaron hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento (OD₆₀₀ ~ 0.6-0.8) a una temperatura de 37°C y en agitación de 250 rpm. La expresión del gen reportero se indujo añadiendo concentraciones definidas de anhidrotetraciclina (aTC). Muestras de 1 ml se fueron retirando del cultivo a diferentes tiempos (15, 30, 45, 60 y 120 minutos) y se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 20mM, 30% rafinosa) al que se añadió 1 μ l de lisostafina a una concentración de 12.5 ng ml⁻¹ y se incubaron a 37°C durante una hora. Para la inmunodetección por Western-blot se añadió el mismo volumen de una solución de Laemmli (Bio-Rad, 2-mercaptoetanol) a las muestras y se calentaron a 95°C durante 10 min. Para su análisis por electroforesis las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Thermo-Scientific, 0.2 μ M) siguiendo los métodos establecidos. La proteína se detectó

utilizando un anticuerpo anti-Flag diluido 1:10000 en PBS-Tween al 0.1% con 5% de leche en polvo (anti-FLAG M2-Peroxidase (HRP), Sigma).

Análisis de la expresión de las proteínas NreC marcada con 3xFLAG

Los niveles de expresión de la proteína NreC-3xFLAG bajo el control de los promotores, P_{cad} and $P_{xyl/tet}$, presentes en los plásmidos utilizados en este estudio se detectaron mediante Western-blot. Para ello, las cepas bacterianas con los plásmidos pCN51::NreCB-3XFLAG y pRMC2::NreC-3XFLAG se preincubaron a 37°C 16 h en TSB en agitación (220 rpm). Por la mañana el cultivo fue diluido 1:100 y se incubó a 37°C en agitación para llegar a una DO_{600nm} aproximada de 0.8. La expresión del promotor $P_{xyl/tet}$ se indujo con aTC (100 ng ml⁻¹) que se añadía cuando los cultivos alcanzaban una $DO_{600nm} = 0.3$. Las muestras se recogieron por centrifugación (10 min, 4000 rpm, 4°C) y se lavaron con 1ml de PBS. A continuación, se resuspendieron en 500 µl de PBS y se lisaron utilizando el método de FastPrep (1 ciclo, 40 s, 6m s⁻¹). Tras centrifugar 10 minutos, los extractos de proteínas totales se recogieron para su análisis. Para la cuantificación de las proteínas se prepararon diluciones de la proteína estándar (Bovine Serum Albumin, BSA) de 0 a 25 µg que sirvieron para establecer una recta de calibrado. Las muestras a analizar se diluyeron en agua, se les añadió el reactivo de color Bicinchoninic Acid kit (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La lectura se llevó a cabo en el lector de placas (Epoch; BioTek) a una longitud de onda de 570nm. Para su separación por electroforesis las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE 12% (Stain-Free™ Gels, Bio-Rad) para después ser transferidas a membranas de nitrocelulosa (0.45 µm, GE Healthcare). Las membranas se bloquearon 12 h a 4°C en una solución de PBS-Tween 0.1% con un 5% de leche en polvo. La proteína fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 conjugado con peroxidasa (1:10000; Sigma) y revelado con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Caracterización fenotípica

Para estudiar la capacidad de las bacterias para restaurar las características fenotípicas asociadas a TCSs específicos, se realizaron los diferentes ensayos que se detallan a continuación. Se usaron las cepas de *S. aureus* ΔXV complementadas con los

plásmidos pCN51 y pRMC2 expresando las versiones de los TCSs completos o de los RR fosfomiméticos correspondientes para cada fenotipo. Como cepas control de los ensayos se utilizaron cepas de *S. aureus* Δ XV transformadas con los plásmidos vacíos (pCN51 o pRMC2).

A. Crecimiento a pH ácido: Para comprobar la cinética de crecimiento de las bacterias y su capacidad para multiplicarse en condiciones de pH ácido (pH = 4.5) cultivos crecidos durante 16 h a 37°C en TSB se diluyeron en medio hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.1$. A continuación, los cultivos se diluyeron 1:40 en el mismo medio o en medio con pH= 4.5 y 200 μ l de la dilución fueron incubados, por triplicado, durante 20 h a 37°C en placas microtiter estériles de 96 pocillos (Thermo- Scientific). La cinética de crecimiento se analizó midiendo la DO_{595nm} cada 30 minutos utilizando el espectrofotómetro SynergyH1 (BioteK).

B. Adhesión a fibronectina: Para el análisis de la adhesión bacteriana a la fibronectina humana se siguió el protocolo previamente descrito con algunas modificaciones (Cucarella et al., 2002). Los cultivos de las cepas bacterianas a estudiar se crecieron durante 16 h a 37°C en agitación. Después se diluyeron (1:100) en 20 ml de TSBg y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1$. En los cultivos que era necesario se añadió aTC (100 ng ml⁻¹). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con buffer fosfato (PBS). Para finalizar, las células se resuspendieron en 20 ml de PBS. Por otro lado, la fibronectina humana (Sigma) se diluyó en buffer de carbonato de sodio (40 mM pH = 9.2) y se fijó en placas multipocillo de ELISA (Nunc Maxisorp; ThermoFisher) a una concentración de 10 μ g ml⁻¹ a 4°C durante toda la noche. Los pocillos se bloquearon con una solución de BSA al 2% en PBS y 100 μ l de las muestras fueron incubadas por triplicado en presencia de la fibronectina durante 2 h a 37°C. Las medidas de cristal violeta se llevaron a cabo en el lector de placas Epoch (BioteK) después de resuspender los pocillos teñidos con 100 μ l de una solución de etanol al 80% y acetona al 20% a una longitud de onda de 570nm. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se representaron con ayuda del programa Prism 5.0, para el análisis estadístico se realizó un test de ANOVA de un factor seguido por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. El nivel de confianza estadístico se estableció en 0.05.

C. Producción de proteína A: Para estudiar la producción diferencial de proteína A entre las diferentes cepas bacterianas, cultivos incubados durante 16 h a 37°C en agitación se igualaron a una $DO_{600nm} = 0.1$ en medio de cultivo y se diluyeron (1:40) en 2 ml de medio sintético de composición definida (DCM). Las muestras se incubaron en placas de 24 pocillos (Sarstedt) a 37°C durante 24 h para favorecer la formación de biofilm. A continuación, 12 ml de cada muestra se recogieron por centrifugación (4000 rpm, 10 min) y se lavaron con PBS. Las muestras se resuspendieron en un volumen de 120 μ l de PBS y se añadió 1 μ l de lisostafina (10 mg ml^{-1}) y 1 μ l de TurboDNasa (2 Units ml^{-1} ; Ambion) como tratamiento para lisar las células y eliminar el ADN bacteriano. Las muestras se incubaron durante 5 h a 37°C. Después de la lisis, las muestras se centrifugaron y el extracto de proteínas total se recogió para su posterior análisis. La producción de proteína A se detectó siguiendo técnicas de inmunodetección. Entre 3 y 5 μ g de proteínas se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12% de acrilamida (Stain-Free™ Gels, Bio Rad) para su separación por electroforesis. La proteína fue detectada utilizando anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa diluido 1:2500 en PBS-Tween al 0.1% con leche en polvo al 5%. Para la inducción de la expresión de las proteínas en el plásmido pRMC2 se añadió aTC a una concentración de 100 ng ml^{-1} .

D. Crecimiento a 28°C: Para analizar las diferencias de multiplicación a 28°C, cultivos incubados durante 16 h a 37°C se diluyeron hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.4 en TSB y se realizaron diluciones seriadas en el mismo medio. Se colocaron 5 μ l de cada una de las diluciones en placas de TSA. En los casos en los que era necesario las placas se suplementaron con aTC a una concentración de 10 ng ml^{-1} . Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h. Por último, se tomaron fotografías representativas de los resultados.

E. Resistencia a Tritón: La resistencia de las diferentes cepas al TritónX-100 se realizó en placas con un gradiente 0-0.5% del detergente. Para ello, placas OmniTray sin pocillos (Nunc ThermoFisher) se rellenaron con medio TSA que contenía TritónX-100 (Sigma) al 0.5% y la pendiente se creó con el medio en estado líquido. El gradiente se completó rellenando la placa con TSA. Los cultivos crecidos durante la noche se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0.4$ en medio de cultivo. Las muestras se aplicaron con un hisopo estéril impregnado con la suspensión de células a lo largo de toda la placa. La sensibilidad al tritón

se observó como una deficiencia del crecimiento, especialmente en la zona de la placa con mayor concentración del detergente.

F. Reducción de nitratos: El estudio de la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos en nitritos se realizó siguiendo las siguientes especificaciones. Los cultivos se incubaron 16 h a 37°C en agitación, se ajustaron a una $DO_{600nm} = 0.1$ para posteriormente diluirlos (1:50) en TSBg suplementado con KNO_3 (20 mM). Para conseguir unas condiciones de cultivo óptimas, con bajas tensiones de oxígeno, los cultivos se añadieron a tubos de 15 ml hasta llenarlos completamente. Estos, se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación en posición horizontal. En este caso, la inducción de la proteínas expresadas desde el plásmido pRMC2 se consiguió añadiendo aTC a una concentración de 10 ng ml⁻¹. La presencia de nitritos en el medio se detectó colorimétricamente utilizando reactivos Nit1 y Nit2 (ApiStaph kit, BioMerieux). Fotos representativas de los resultados se tomaron añadiendo 50 µl de las muestras a una placa multipocillo.

G. Resistencia a bacitracina: Para analizar la resistencia a la bacitracina, cultivos crecidos durante 16h a 37°C en agitación se ajustaron a una DO_{600nm} de 0.4. Se prepararon diluciones seriadas de los diferentes cultivos en TSBg. 5 µl de cada dilución se colocaron en placas de TSA suplementadas con bacitracina a una concentración de 5 µg ml⁻¹. Para las muestras con el plásmido pRMC2, se añadieron 400 ng ml⁻¹ en los cultivos y 100 ng ml⁻¹ en placas de TSA de aTC. También se prepararon placas sin antibiótico y sin aTC, como controles del crecimiento. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se tomaron fotografías representativas.

Preparación de las muestras de ARN para el análisis por RNA-Seq

La purificación de ARN para los estudios transcriptómicos de las cepas de *S. aureus* ΔXV que contienen los plásmidos pRMC2 y pCN51 vacíos o expresando los reguladores de respuesta fosfomiméticos o los TCSs completos se realizó de la siguiente manera. Cultivos crecidos a 37°C de cada una de las diferentes cepas se inocularon en 50 ml de TSB para partir de una DO_{600nm} inicial de 0.05. Las bacterias se incubaron a 37°C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento ($DO_{600nm}=0.7$). La expresión de los plásmidos se indujo añadiendo aTC a una concentración de 100 ng ml⁻¹ cuando los cultivos habían

alcanzado una DO_{600nm} de 0.3. Se tomaron 5 ml del cultivo y se estabilizaron utilizando RNAprotect Bacteria Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Posteriormente, estos cultivos se recogieron por centrifugación (10 min, 5100x g 4°C). Las bacterias se resuspendieron en 1ml de Trizol (Ambion) y se lisaron utilizando el aparato de FastPrep (3 ciclos, 60 s, 6.5m s⁻¹, MP Biomedicals). El ARN bacteriano total se extrajo utilizando el kit PureLink (Ambion), añadiendo un paso extra de tratamiento con DNasa utilizando el kit RNasa-free DNase (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Un segundo tratamiento con RQ1 DNase (Promega) se llevó a cabo para eliminar posibles residuos de ADN bacteriano. La calidad del ARN fue evaluada por electroforesis. Los ARN ribosomales se eliminaron utilizando el kit de enriquecimiento de mRNA MicrobeExpress (Ambion). Para comprobar que el ARN ribosomal había sido eliminado se utilizó el sistema Perkin Elmer LabChipGXTouch 24 y las muestras se cuantificaron en el Nanodrop. Las librerías de ARN se prepararon utilizando el kit TruSeq stranded mRNA de Illumina, eliminando el paso de selección de la cola polyA del protocolo. La secuenciación se llevó a cabo con el sistema Illumina NextSeq 500 con lecturas de extremos simples de 75 pares de bases y unos 10 millones de lecturas por muestra.

La purificación de ARN para los estudios transcriptómicos de las cepas de *S. saprophyticus* ATCC15305 que contienen los plásmidos pCN38::P_{cad} vacío o expresando los TCSs completos (SaeSR, NreBC y BraSR) se realizaron de forma similar.

Análisis de los resultados de RNAseq

Los datos obtenidos de los ensayos de RNASeq se analizaron con el software CLC Genomics Workbench (versión 7.5) y las lecturas se alinearon con el genoma de la cepa de *S. aureus* MW2 (número de acceso NC_003923). Los datos se expresaron en escala logarítmica y se normalizaron antes de llevar a cabo el análisis de las diferencias de los niveles de expresión entre los diferentes RR fosfomiméticos o los TCS con las correspondientes cepas control que contenían los plásmidos vacíos, pRMC2 y pCN51 respectivamente. Para identificar genes como diferencialmente expresados con respecto al control, se establecieron dos criterios: que la magnitud de cambio fuese mayor a 2 y un nivel de confianza estadística de 0.05.

Preparación de las muestras para el análisis proteómico

Las muestras para los ensayos de proteómica se recogieron del mismo cultivo que las muestras para los ensayos de RNASeq. Se tomó 1 ml de cultivo bacteriano y se le añadieron 250 µl del buffer de lisis específico (10% SDS, 50mM DTT y 5x EDTA coctel con inhibidores de Proteasas, Roche). Las muestras se lisaron utilizando el aparato de FastPrep (3 ciclos, 60 s, 6.5 m s⁻¹, MPBiomedicals). A continuación, se incubaron 15 min a 95°C. Para evitar la formación de puentes di-sulfuro entre los residuos de cisteína, se realizó un tratamiento con iodoacetamida 20 mM durante 20 minutos a 25°C en oscuridad, seguido de la adición de DTT (20 mM) como agente reductor y finalizador de la reacción.

Ensayos de Proteómica.

Para llevar a cabo la precipitación de las muestras se tomaron 100 µg de proteína total de cada una ellas y se añadió ácido tricloroacético y desoxicolato de sodio a una concentración final de 10 y 0.04% respectivamente. Las muestras se incubaron a 4°C durante 16 horas y se recogieron por centrifugación (10 min, 21000x g, 4°C). A continuación, se llevaron a cabo tres lavados con etanol al 70%. Las muestras se digirieron con 2 µg de tripsina disuelta en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM a 37°C durante toda la noche. Después de la digestión se utilizó el sistema Oasis columns (Waters) siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar las sales presentes en la muestra para a continuación, secarlas utilizando el sistema de vacío Eppendorf Speedvac. Finalmente, las muestras se resuspendieron en ácido fórmico (0.1% v/v) a una concentración final de 0.2 µg µl⁻¹. 5 µg de cada muestra se analizaron mediante LC-MS. El análisis de espectroscopia de masas se llevó a cabo en el espectroscopio de masas Orbitrap-VelosPro (Thermo-Scientific) acoplado a U300 RSLC HPLC (Thermo-Scientific). Los péptidos se atraparon en una columna nanoViper Trap de 2cm x 100µm C18 5µm 100 Å (Thermo-Scientific, 154564) y se separaron en una columna EasySpray de 50cm (ES803) equilibrada con el Buffer B al 3% a una velocidad de flujo de 300 nl min⁻¹ (Buffer A: acetonitrilo 2%, ácido fórmico 1%; Buffer B: acetonitrilo 80%, ácido fórmico 0.1%). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de Buffer B (3-99%, 112 minutos).

Los datos se obtuvieron siguiendo el método “Top-20”, seleccionando de forma dinámica los iones más abundantes y con el criterio de “lock mass” para mejorar la precisión de la masa de los iones (Lock Mass = 445.120024). La exploración de todo el espectro (m/z 400-1600) se obtuvo en la Orbitrap con resolución $R = 60000$ a $400 m/z$ (después de la acumulación de FTMS Full AGC Target; 1×10^6). Los veinte iones con mayor intensidad, por encima del umbral mínimo especificado (2000) se fragmentaron utilizando una energía de colisión normalizada de 35, un tiempo de activación de 10 ms y se recogieron en la trampa iónica.

La cuantificación Label-free (Label-free quantitation, LFQ) se llevó a cabo utilizando MaxQuant 1.5.8.3. (Cox and Mann, 2008). Se utilizó Tripsina/P y se estableció como fija la modificación de aminoácidos de cisteína carbamidometilados y como modificaciones variables la oxidación de metioninas y la deaminación de glutamina y asparagina. La tasa de error en la asignación de péptidos y proteínas se fijó en 0.01, la longitud mínima de los péptidos era de siete aminoácidos y al menos dos péptidos únicos fueron necesarios para la cuantificación. Se utilizaron tres replicas biológicas que se alinearon frente a la base de datos de secuencias de proteínas traducidas de la cepa MW2 (NC_003923). Los datos se procesaron utilizando el software Perseus (versión 1.5.3.1). Se realizó un test t de Student (de dos colas, con muestras que tienen la misma varianza) con las intensidades LFQ. Las proteínas con valores de magnitud de cambio mayor a 2 y valores de significancia estadística de p menores de 0.05 se consideraron como proteínas cuya abundancia se había alterado de forma significativa.

Análisis de expresión de proteínas mediante western-blot

Para analizar el nivel de expresión de las diferentes fusiones transcripcionales se prepararon extractos proteicos en las mismas condiciones que en las que se recogieron las muestras para los análisis de RNA-Seq y proteómica. Los extractos de proteínas totales se analizaron utilizando técnicas de Western-blot. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE 12% Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-Rad). La proteína GFP se detectó con anticuerpos anti-GFP [Living Color® A.v. Monoclonal Antibody (JL-8), Clontech] diluido (1:2500) en PBS-Tween al 0.1% con leche en polvo al 5%. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo marcado con peroxidasa anti-IgG de ratón y generado en cabra

(Invitrogen) en una dilución de 1:5000. La membrana se reveló utilizando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes se obtuvieron y analizaron con el programa ImageLab (Bio-Rad).

Análisis de enriquecimiento Gene Ontology

Para llevar a cabo el análisis de Gene Ontology de los genes regulados por *S. aureus* MW2 Δ XV que contienen los plásmidos pRMC2 expresando cada uno de los RR*, primero se anotaron todas las proteínas con sus respectivos homólogos en la cepa de *S. aureus* NCTC8325. Los genes se filtraron en función de su presencia en ambas cepas (MW2 y NCTC8325). Las listas de genes regulados por cada uno de los RR* se analizaron utilizando el software PantherDB (Mi et al., 2019) para identificar las proteínas y vías del metabolismo sobre-representadas en cada una de las listas analizadas. Para determinar que rutas metabólicas estaban especialmente afectadas por cada TCS se utilizó la prueba exacta de Fisher y se seleccionaron aquellas categorías de GO que mostraban un enriquecimiento estadísticamente significativo y con un valor de p corregido menor a 0.05.

Inducción y transducción con fagos de *S. saprophyticus*

La cepa de *S. saprophyticus* ATCC15305 que contiene el fago ϕ 11 de *S. aureus* lisogénico marcado con el gen de resistencia a eritromicina y que es capaz de infectar la especie *S. saprophyticus* se creció a 37°C 16 h en agitación. Posteriormente, el cultivo se diluyó (1:50) en 20 ml de TSB. Las bacterias se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.3$. Para la inducción de la actividad del fago se añadió mitomicina-C (Sigma) en una concentración de 2 μ g ml⁻¹ y el cultivo se incubó a 30°C en agitación suave (80 rpm) durante 3-4 h. Una vez que el cultivo se hubo aclarado se filtró (0.2 μ m) y se añadió cloroformo para evitar el crecimiento de posibles bacterias contaminantes. Los lisados se conservan a 4°C. En el caso de los lisados obtenidos para este fago se comprobó que su eficacia infectiva disminuía con el tiempo por lo que se preparaba un lote nuevo para cada transducción.

Para los experimentos de transducción, se prepararon los lisados de las cepas de *S. aureus* RN4220 portadoras de los plásmidos. Cultivos de las cepas *S. aureus* RN4220

con los plásmidos correspondientes se crecieron en medio de cultivo TSB a 37°C durante 16h en agitación. Al día siguiente los cultivos se diluyeron (1:20) en 5 ml de medio LB complementado con CaCl₂ (10 mM). Los tubos se incubaron a 28°C durante 4 h en agitación. Pasado este tiempo, se añadieron 500 µl de diferentes diluciones seriadas del lisado del fago φ11. Para cada construcción se probaron cuatro diluciones del lisado del fago. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta el día siguiente. Los tubos donde el cultivo perdió mayor turbidez fueron seleccionados, filtrados y se les añadió cloroformo para su conservación a 4°C.

Para llevar a cabo la transducción de la cepa receptora *S. saprophyticus* ATCC15305 se prepararon cultivos de 20 ml de TSB a los que se añadió 200 µl de un preinóculo de las bacterias crecidas durante unas 4-6h. Los cultivos se incubaron a 37°C 16 h en agitación. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron (4000 rpm 10 min) y resuspendieron en 1 ml de TSB. A continuación, se preparó una mezcla con 500 µl de las células de *S. saprophyticus*, 500 µl del lisado de fago obtenido de las cepas de *S. aureus* RN4220 con cada una de las construcciones que vamos a introducir en la bacteria receptora y 1 ml de medio LB suplementado con CaCl₂ (10 mM). Posteriormente se llevaron a cabo dos incubaciones, la primera a 37°C durante 25 min en el baño de agua y la segunda a 37°C durante 15 min en el incubador en agitación. Una vez finalizado este proceso, las muestras se guardaron en hielo y se les añadió 1 ml de citrato de sodio (0.02 M) frío. A continuación se centrifugaron (4000 rpm, 10 min 4°C) y se resuspendieron en 1 ml de citrato de sodio. Las muestras se incubaron en hielo durante 2 h. Por último, alícuotas de 100 µl de cada muestra se sembraron en placas de TSA suplementado con citrato de sodio al 10% y los antibióticos cloranfenicol y eritromicina. Las bacterias obtenidas eran resistentes a ambos antibióticos ya que, contienen el fago φ11 (Eri) y el plásmido (Cam) introducido por este.

Purificación del dominio de unión a ligando de Walk y nanoanticuerpos frente a Walk

La purificación de la proteína recombinante Walk_LBD se realizó mediante columna HisTrapFF de 5 ml (GE Healthcare) utilizando el sistema AKTA-Prime plus (GE, Healthcare). Cultivos de la cepa *E.coli* BL21 expresando el plásmido pET46::*walk_LBD* se crecieron en LB suplementado con glucosa al 1% 16 h a 37°C en

agitación. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron (1:1000) en 1 L de medio de cultivo (LB con 1% de glucosa) y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.5$. En ese momento, se añadió IPTG al cultivo (0.4 mM, Fisher BioReagents) para inducir la expresión del plásmido y la producción de la proteína recombinante y se incubaron 16 h a 30°C en agitación suave (150 rpm). Las bacterias se recogieron por centrifugación (10800x g 15min 4°C). Se tomaron muestras de los cultivos antes y después de la inducción con IPTG para realizar controles de la producción de la proteína mediante Western-blot antes de llevar a cabo la purificación. Para realizar la lisis, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 35 ml de Buffer de lisis ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ 10 M, $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 10 M NaCl 500 M, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, lisozima 1 mg ml⁻¹, 125 unidades de benzonasa (Merk)) e incubaron 30 min a 4°C en agitación suave. La lisis de las bacterias se completó mediante sonicación (5 ciclos 45 s amplitud 50%, VibraCell (Bioblock Scientific)). Finalmente, el lisado se centrifugó (23000x g 1 h 4°C) y se filtró el sobrenadante (2 µm). Para la purificación de la proteína, se utilizaron columnas HisTrapFF equilibradas con 5 volúmenes de la columna con Buffer A ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ 10 M, $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 10 M NaCl 500 M, imidazol 20 mM, pH = 7.4). El lisado se hizo pasar por la columna a muy baja velocidad de flujo (0.5 ml s⁻¹) para favorecer la unión de la proteína al lecho de la columna. Después se lavó con otros 5 volúmenes de la columna con Buffer A. Para la elución de la proteína se utilizó un gradiente de concentración creciente de Buffer B ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ 10 M, $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 10 M NaCl 500 M imidazol) de 50 ml de volumen. Se fueron recogiendo fracciones de 1 ml y las fracciones correspondientes al pico de absorbancia de la proteína se analizaron posteriormente mediante Western-blot y se cuantificaron.

Con el objeto de eliminar impurezas y mejorar la purificación de WalK_LBD, se llevó a cabo un segundo proceso de purificación mediante columna HiLoad 16/600 Superdex 200pg de filtración en gel (GE Healthcare). Para finalizar, las fracciones recogidas que contenían la proteína recombinante se dializaron frente a un buffer de composición óptima (100 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10% glicerol pH = 7.5) para el uso de la proteína en la inmunización de animales para la obtención de los anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos (Slide-A-Lyzer Dialysis 20000 MWCO, Thermo Scientific).

Para la purificación de los nanoanticuerpos frente a WalK_LBD se usó el sistema AKTA-Prime plus con columnas tipo TALON (GE Healthcare, 1ml). Cultivos de las

cepas de *E. coli* WK6 expresando los plásmidos para la producción de los diferentes nanoanticuerpos se crecieron en 50ml de LB suplementado con glucosa al 2% 16 h a 30°C en agitación suave (140 rpm). 1 L de LB con un 2% de glucosa se inoculó con los estos cultivos crecidos durante la noche para partir de una DO_{600nm} de 0.05. Las bacterias se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5. En ese momento, los cultivos se recogieron por centrifugación (6000 rpm 10 min 20°C) para eliminar el medio con glucosa. Las bacterias se resuspendieron en 1 L de LB y la expresión de las proteínas se indujo añadiendo IPTG a una concentración de 1 mM. Los cultivos se incubaron a 16 h a 30°C en agitación (140 rpm). Las bacterias se resuspendieron en 20 ml del buffer de lisis (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA (Roche), DNasa 0.1 mg ml⁻¹ y lisozima 1 mg ml⁻¹). Tras 30 min a 4°C en agitación suave, el cultivo se lisó mediante sonicación (3 s con pausa de 9 s en hielo durante 3 min, amplitud 37%) (Marca del Sonicador). El lisado se obtuvo tras dos centrifugaciones consecutivas, la primera de 15 min a 12000 rpm seguida de 1 h a 12000 rpm ambas a 4°C. Una vez filtrado, el lisado estaba listo para la purificación de la proteína. La columna TALON se equilibró con 5 volúmenes de la columna de Buffer A (20 mM HEPES, 200 mM NaCl pH = 7.4) y un 5% de Buffer B (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 150 mM imidazol pH = 7.4). Al igual que en otras ocasiones, el lisado se hizo pasar por la columna a baja velocidad de flujo (0.5 ml s⁻¹). En este caso, el lavado de la columna se realizó en dos fases, un primer lavado con el equivalente a 3-4 volúmenes de la columna con Buffer A y 5% de Buffer B y un segundo lavado de 6 volúmenes de la columna con Buffer A y Buffer B al 12%. La elución de la proteína se llevó a cabo en un único paso, con 8 volúmenes de la columna de Buffer B al 100%. Se recogieron todas las fracciones para su posterior análisis y cuantificación.

Análisis de la respuesta inmunogénica frente a Walk

Para analizar la respuesta inmunogénica de pacientes con infección de *S. aureus* frente al LBD de Walk se utilizaron técnicas de inmunodetección. Aproximadamente 15 µg de la proteína recombinante purificada (Walk_LBD) en un volumen de 100 µl se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15% de acrilamida y un único pocillo. Una vez transferida la proteína a la membrana de nitrocelulosa, esta se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con una solución de PBS-Tween 0.1% con 5% de leche

en polvo. A continuación, la membrana se dividió en tiras de tamaño similar que fueron incubadas con diluciones (1:1000) de los sueros de los pacientes en PBS-Tween 0.1% y 5% de leche en polvo durante 16 h a 4°C. Los sueros seleccionados procedían de pacientes donde *S. aureus* había sido identificado como la causa de la infección. Como control negativo una tira de la membrana se incubó con suero de un individuo sin infección bacteriana. Como control positivo una fracción de la membrana se reveló con el anticuerpo (1:1000, HRP-conjugated anti-his tag, Sigma) frente a la cola de aminoácidos de histidinas con el que está marcada la proteína recombinante Walk_LBD. La presencia de inmunoglobulinas frente a Walk_LBD en las muestras de los sueros de los pacientes se reveló con el anticuerpo anti-IgG humana (1:5000, KPL- peroxidase labeled anti human IgG).

Reconocimiento de Walk LBD por el anticuerpo monoclonal y los nanoanticuerpos

El procedimiento seguido para estudiar el reconocimiento de la proteína recombinante (Walk_LBD) por parte del anticuerpo monoclonal y los nanoanticuerpos generados frente a este antígeno fue similar al descrito en el apartado anterior. En el caso del anticuerpo monoclonal, los fragmentos de la membrana de nitrocelulosa se incubaron con dos diluciones diferentes del mismo (1:500 y 1:1000). Para la detección del anticuerpo monoclonal se utilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón (HRP-antiMouse IgG, Pierce) como anticuerpo secundario de la reacción (1:5000). El anticuerpo monoclonal generado frente a un antígeno diferente y sin relación con *S. aureus* se utilizó como control negativo del experimento. Los nanoanticuerpos se incubaron en una dilución de 1:250 en 2 ml de PBS-Tween 0.1% con 5% de leche en polvo y se detectaron con el anticuerpo anti-c-myc (1:5000, Sigma) para diferenciarlos de la proteína recombinante que se detecta con el anticuerpo anti-histidinas (1:1000, HRP-conjugated anti-his tag, Sigma). Como control se utilizó el nAB::*egfr* el cual no reconoce nuestra proteína.

Inmunodetección de nanoanticuerpos unidos a Walk en la superficie de *S. aureus*

Para estudiar la interacción entre los nanoanticuerpos y la proteína Walk en condiciones nativas, alícuotas de un 1 ml de cultivo de la cepa *S. aureus* MW2 crecida a 37°C durante 16 h en agitación ($DO_{600nm} = 5$), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. Se añadieron nanoanticuerpos a una concentración final de 0.05 μ g μ l⁻¹ y se incubaron 2 h en agitación suave a 4°C. Tras una serie de lavados (hasta siete) con PBS, las muestras se resuspendieron en un volumen de 15 μ l a las que se añadió una cantidad similar de la solución de Laemmli (Bio-Rad, 2-mercaptoetanol) para su separación por electroforesis. Los inmuno-complejos formados entre los nanoanticuerpos y las bacterias se detectaron con el anticuerpo (1:1000, HRP-conjugated anti-his tag, Sigma) frente a la cola de aminoácidos de histidinas con los que están marcados.

Análisis del crecimiento bacteriano en presencia de los anticuerpos

Para comprobar la cinética de crecimiento de las bacterias y su capacidad para multiplicarse en presencia de los nanoanticuerpos, cultivos de la cepa *S. aureus* MW2 crecidos durante 16 h a 37°C en TSB se diluyeron en medio de cultivo hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.1$. A continuación, los cultivos se diluyeron 1:40 en el mismo medio y 200 μ l de la dilución fueron incubados, por triplicado, durante 20 h a 37°C en placas microtiter estériles de 96 pocillos (Thermo-Scientific). La cinética de crecimiento se analizó midiendo la DO_{595nm} cada 30 minutos utilizando el espectrofotómetro SynergyH1 (Biotek). Los nanoanticuerpos se añadieron al principio del experimento diluidos 1:4 en los 200 μ l de cada pocillo. El anticuerpo monoclonal (mAB::Walk) se añadió en una concentración de 10 μ g ml⁻¹.

Análisis de la actividad de Walk: autólisis

La alteración de la actividad de Walk en presencia de los nanoanticuerpos se estudió mediante el análisis de la actividad de las autolisinas activadas por el TCS. Cultivos de la cepa de *S. aureus* MW2 crecidos 16 h a 37°C en agitación se diluyeron (1:100) en 20 ml de TSB y se crecieron a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 1 aproximadamente. Los nanoanticuerpos se añadieron al principio del

experimento (500 μ l). Una vez alcanzada la DO_{600nm} determinada las muestras se recogieron por centrifugación (4500 rpm 10 min 4°C) y se lavaron con PBS a 4°C. Para analizar el proceso de autólisis de las bacterias, estas se resuspendieron en un buffer de Tris-HCl (0.05 M, pH= 7.2) y se incubaron a 30°C en agitación (150 rpm). Para inducir la autólisis una de las muestras se resuspendió en 20 ml del buffer Tris-HCl (0.05 M, pH= 7.2) pero con un 0.1% de Triton X-100. Las muestras se resuspendieron en un volumen similar al de partida (20ml) para mantener la DO_{600nm} en la que habíamos recogido los cultivos. La autólisis se observó fotométricamente midiendo la DO_{600nm} cada 30 min durante 4 h. Los datos se representaron normalizando la DO_{600nm} de cada tiempo con respecto a la DO_{600nm} inicial y en forma de porcentaje de autólisis producido en cada muestra. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Cepas usadas en este estudio.

Strain name	Relevant characteristic(s)	MIC [†]	Source or reference
MW2	Community-acquired strain of MRSA, which was isolated in 1998 in North Dakota, USA	3566	(Baba et al., 2002)
ΔXV	MW2 ΔXIV Δ <i>srrBA</i>	2961	(Villanueva et al., 2018)
MW2 pCN51	MW2 carrying pCN51 empty plasmid	4810	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV pCN51	MW2 ΔXV carrying pCN51 empty plasmid	4671	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV <i>psaeRS</i>	MW2 ΔXV carrying pCN51:: <i>saeRS</i> plasmid	5233	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV <i>pnreCB</i>	MW2 ΔXV carrying pCN51:: <i>nreCB</i> plasmid	4536	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV <i>pbraRS</i>	MW2 ΔXV carrying pCN51:: <i>braRS</i> plasmid	5238	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV <i>pnreCB</i> -3xFLAG	MW2 ΔXV carrying pCN51:: <i>nreCB</i> -3xFLAG plasmid	5900	This study
MW2 pRMC2	MW2 carrying pRMC2 empty plasmid	6870	This study
ΔXV pRMC2	MW2 ΔXV carrying pRMC2 empty plasmid	6871	This study
ΔXV <i>pwalk</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>walk</i> plasmid (pAH135)	6872	This study
ΔXV <i>phptR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hptR</i> plasmid (pAH135)	6873	This study
ΔXV <i>plytR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>lytR</i> plasmid (pAH137)	6874	This study
ΔXV <i>pgraR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>graR</i> plasmid (pAH138)	6875	This study
ΔXV <i>psaeR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>saeR</i> plasmid (pAH139)	6876	This study
ΔXV <i>ptcs7R</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>tcs7R</i> plasmid (pAH140)	6877	This study
ΔXV <i>parIR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>arlR</i> plasmid (pAH141)	6878	This study
ΔXV <i>psrrA</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>srrA</i> plasmid (pAH142)	6879	This study
ΔXV <i>pphoR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>phoR</i> plasmid (pAH143)	6880	This study
ΔXV <i>pairR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>airR</i> plasmid (pAH144)	6881	This study
ΔXV <i>pvrA</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>vraR</i> plasmid (pAH145)	6882	This study
ΔXV <i>pagrA</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>agrA</i> plasmid (pAH146)	6883	This study
ΔXV <i>pkdpE</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>kdpE</i> plasmid (pAH147)	6884	This study
ΔXV <i>phssR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hssR</i> plasmid (pAH148)	6885	This study
ΔXV <i>pnreC</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> plasmid (pAH149)	6886	This study
ΔXV <i>pbraR</i> *	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>braR</i> plasmid (pAH150)	6887	This study
ΔXV <i>pnreC</i> -3xFLAG	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> -3xFLAG plasmid	7678	This study
MW2 pRMC2 + pCN52	MW2 carrying pRMC2 and pCN52 empty plasmids	7354	This study
ΔXV pRMC2 + pCN52	MW2 ΔXV carrying pRMC2 and pCN52 empty plasmids	7355	This study
MW2 Δ <i>hpt</i>	MW2 Δ <i>hptSR</i>	4032	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>lyt</i>	MW2 Δ <i>lytSR</i>	2964	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>gra</i>	MW2 Δ <i>graRS</i>	11	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>sae</i>	MW2 Δ <i>saeSR</i>	2965	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>tcs7</i>	MW2 Δ <i>tcs7SR</i>	4033	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>arl</i>	MW2 Δ <i>arlSR</i>	4043	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>srr</i>	MW2 Δ <i>srrBA</i>	2966	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>pho</i>	MW2 Δ <i>phoRP</i>	4035	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>air</i>	MW2 Δ <i>airRS</i>	3670	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>vra</i>	MW2 Δ <i>vraRS</i>	4036	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>agr</i>	ΔXV Δ <i>agrCA</i>	4037	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>kdp</i>	MW2 Δ <i>kdpDE</i>	4038	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>hss</i>	MW2 Δ <i>hssRS</i>	2979	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>nre</i>	MW2 Δ <i>nreCB</i>	2967	(Villanueva et al., 2018)
MW2 Δ <i>bra</i>	MW2 Δ <i>braSR</i>	4039	(Villanueva et al., 2018)
ΔXV <i>pwalR</i> * + pPatl::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>walR</i> and pCN52:: <i>Patl</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7762	This study
ΔXV <i>phptR</i> * + pPuhpT::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hptR</i> and pCN52:: <i>PuhpT</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7389	This study
ΔXV <i>plytR</i> * + pPlrgA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>lytR</i> and pCN52:: <i>PlrgA</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7391	This study
ΔXV <i>pgraR</i> * + pPmprF::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>graR</i> and pCN52:: <i>PmprF</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7393	This study
ΔXV <i>psaeR</i> * + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>saeR</i> and pCN52:: <i>Pefb</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7357	This study
ΔXV <i>ptcs7R</i> * + pPMW1206::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>tcs7R</i> and pCN52:: <i>PMW1206</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7833	This study
ΔXV <i>parIR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>arlR</i> and pCN52:: <i>PmgrA</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7359	This study
ΔXV <i>psrrA</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>srrA</i> and pCN52:: <i>Pqox</i> :: <i>gfp</i> plasmids	7362	This study

Material y Métodos

Strain name	Relevant characteristic(s)	MIC [†]	Source or reference
ΔXV <i>pphoR*</i> + pPpstS::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>phoR</i> and pCN52:: <i>PpstS::gfp</i> plasmids	7486	This study
ΔXV <i>pairR*</i> + pPMW2540::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>airR</i> and pCN52:: <i>PMW2540::gfp</i> plasmids	7536	This study
ΔXV <i>pagrA*</i> + pPMW1056::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>agrA</i> and pCN52:: <i>PMW1056::gfp</i> plasmids	7545	This study
ΔXV <i>pkdpE*</i> + pPcap8A::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>kdpE</i> and pCN52:: <i>Pcap8A::gfp</i> plasmids	7487	This study
ΔXV <i>phssR*</i> + pPhrtA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hssR</i> and pCN52:: <i>PhrtA::gfp</i> plasmids	7661	This study
ΔXV <i>pnreC*</i> + pPnarG::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> and pCN52:: <i>PnarG::gfp</i> plasmids	7539	This study
ΔXV <i>pbraR*</i> + pPctsR::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>braR</i> and pCN52:: <i>PctsR::gfp</i> plasmids	7488	This study
MW2 pRMC2 + pPefb::GFP	MW2 carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	7801	This study
ΔXV pRMC2 + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	7381	This study
ΔXV <i>pwaiR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>waiR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7802	This study
ΔXV <i>phptR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hptR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7803	This study
ΔXV <i>plytR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>lytR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7804	This study
ΔXV <i>pgraR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>graR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7805	This study
ΔXV <i>ptcs7R*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>tcs7R</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7806	This study
ΔXV <i>parIR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>arlR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7807	This study
ΔXV <i>psrrA*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>srrA</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7808	This study
ΔXV <i>pphoR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>phoR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7809	This study
ΔXV <i>pairR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>airR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7810	This study
ΔXV <i>pvraR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>vraR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7811	This study
ΔXV <i>pagrA*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>agrA</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7812	This study
ΔXV <i>pkdpE*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>kdpE</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7813	This study
ΔXV <i>phssR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hssR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7814	This study
ΔXV <i>pnreC*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7815	This study
ΔXV <i>pbraR*</i> + pPefb::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>braR</i> and pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmids	7816	This study
MW2 + pPefb::GFP	MW2 carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6131	This study
ΔXV + pPefb::GFP	ΔXV carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6132	This study
MW2 Δ <i>hpt</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>hptSR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6149	This study
MW2 Δ <i>lyt</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>lytSR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6150	This study
MW2 Δ <i>gra</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>graRS</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6151	This study
MW2 Δ <i>sae</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>saeSR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6133	This study
MW2 Δ <i>tcs7</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>tcs7SR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6152	This study
MW2 Δ <i>arl</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>arlSR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6153	This study
MW2 Δ <i>srr</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>srrBA</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6154	This study
MW2 Δ <i>pho</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>phoRP</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6155	This study
MW2 Δ <i>air</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>airRS</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6156	This study
MW2 Δ <i>vra</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>vraRS</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6157	This study
MW2 Δ <i>agr</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>agrCA</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6158	This study
MW2 Δ <i>kdp</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>kdpDE</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6159	This study
MW2 Δ <i>hss</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>hssRS</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6160	This study
MW2 Δ <i>nre</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>nreCB</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6161	This study
MW2 Δ <i>bra</i> + pPefb::GFP	MW2 Δ <i>braSR</i> carrying pCN52:: <i>Pefb::gfp</i> plasmid	6162	This study
MW2 pRMC2 + pPmgrA::GFP	MW2 carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	7531	This study
ΔXV pRMC2 + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	7360	This study
ΔXV <i>pwaiR*</i> + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>waiR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7530	This study
ΔXV <i>phptR*</i> + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hptR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7490	This study

Strain name	Relevant characteristic(s)	MIC [†]	Source or reference
ΔXV <i>plytR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>lytR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7491	This study
ΔXV <i>pgraR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>graR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7492	This study
ΔXV <i>psaeR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>saeR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7493	This study
ΔXV <i>ptcs7R</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>tcs7R</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7494	This study
ΔXV <i>psrrA</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>srrA</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7495	This study
ΔXV <i>pphoR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>phoR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7496	This study
ΔXV <i>pairR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>airR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7497	This study
ΔXV <i>pvrA</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>vraR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7498	This study
ΔXV <i>pagrA</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>agrA</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7499	This study
ΔXV <i>pkdpE</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>kdpE</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7500	This study
ΔXV <i>phssR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hssR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7501	This study
ΔXV <i>pnreC</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7502	This study
ΔXV <i>pbraR</i> * + pPmgrA::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>braR</i> and pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmids	7503	This study
MW2 + pPmgrA::GFP	MW2 carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	5990	(Burgui et al., 2018)
ΔXV + pPmgrA::GFP	ΔXV carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6049	This study
MW2 Δ <i>hpt</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>hptSR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6066	This study
MW2 Δ <i>lyt</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>lytSR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6067	This study
MW2 Δ <i>gra</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>graRS</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6068	This study
MW2 Δ <i>sae</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>saeSR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6069	This study
MW2 Δ <i>tcs7</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>tcs7SR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6070	This study
MW2 Δ <i>arl</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>arlSR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	5991	(Burgui et al., 2018)
MW2 Δ <i>srr</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>srrBA</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6071	This study
MW2 Δ <i>pho</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>phoRP</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6072	This study
MW2 Δ <i>air</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>airRS</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6073	This study
MW2 Δ <i>vra</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>vraRS</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6074	This study
MW2 Δ <i>agr</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>agrCA</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6075	This study
MW2 Δ <i>kdp</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>kdpDE</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6076	This study
MW2 Δ <i>hss</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>hssRS</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6077	This study
MW2 Δ <i>nre</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>nreCB</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6078	This study
MW2 Δ <i>bra</i> + pPmgrA::GFP	MW2 Δ <i>braSR</i> carrying pCN52:: <i>PmgrA::gfp</i> plasmid	6079	This study
MW2 pRMC2 + pPqox::GFP	MW2 carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmid	7817	This study
ΔXV pRMC2+ pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2 empty plasmid and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmid	7382	This study
ΔXV <i>pwalR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>walR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7818	This study
ΔXV <i>phptR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hptR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7819	This study
ΔXV <i>plytR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>lytR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7820	This study
ΔXV <i>pgraR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>graR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7821	This study
ΔXV <i>psaeR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>saeR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7822	This study
ΔXV <i>ptcs7R</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>tcs7R</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7823	This study
ΔXV <i>parIR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>arlR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7824	This study
ΔXV <i>pphoR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>phoR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7825	This study
ΔXV <i>pairR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>airR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7826	This study
ΔXV <i>pvrA</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>vraR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7827	This study
ΔXV <i>pagrA</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>agrA</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7828	This study
ΔXV <i>pkdpE</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>kdpE</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7829	This study
ΔXV <i>phssR</i> * + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>hssR</i> and pCN52:: <i>Pqox::gfp</i> plasmids	7830	This study

Material y Métodos

Strain name	Relevant characteristic(s)	MIC [†]	Source or reference
ΔXV <i>pnreC*</i> + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>nreC</i> and pCN52::Pqox::gfp plasmids	7831	This study
ΔXV <i>pbraR*</i> + pPqox::GFP	MW2 ΔXV carrying pRMC2:: <i>braR</i> and pCN52::Pqox::gfp plasmids	7832	This study
MW2 + pPqox::GFP	MW2 carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6178	This study
ΔXV + pPqox::GFP	ΔXV carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6179	This study
MW2 Δhpt + pPqox::GFP	MW2 $\Delta hptSR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6180	This study
MW2 Δlyt + pPqox::GFP	MW2 $\Delta lytSR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6181	This study
MW2 Δgra + pPqox::GFP	MW2 $\Delta graRS$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6182	This study
MW2 Δsae + pPqox::GFP	MW2 $\Delta saeSR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6183	This study
MW2 $\Delta tcs7$ + pPqox::GFP	MW2 $\Delta tcs7SR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6184	This study
MW2 Δarl + pPqox::GFP	MW2 $\Delta arlSR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6185	This study
MW2 Δsrr + pPqox::GFP	MW2 $\Delta srrBA$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6186	This study
MW2 Δpho + pPqox::GFP	MW2 $\Delta phoRP$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6187	This study
MW2 Δair + pPqox::GFP	MW2 $\Delta airRS$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6188	This study
MW2 Δvra + pPqox::GFP	MW2 $\Delta vraRS$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6189	This study
MW2 Δagr + pPqox::GFP	MW2 $\Delta agrCA$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6190	This study
MW2 Δkdp + pPqox::GFP	MW2 $\Delta kdpDE$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6191	This study
MW2 Δhss + pPqox::GFP	MW2 $\Delta hssRS$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6192	This study
MW2 Δnre + pPqox::GFP	MW2 $\Delta nreCB$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6193	This study
MW2 Δbra + pPqox::GFP	MW2 $\Delta braSR$ carrying pCN52::Pqox::gfp plasmid	6194	This study
RN4220	Restriction defective derivate of RN450	49	(Kreiwirth et al., 1983)
<i>S. saprophyticus</i> CECT235	<i>S. saprophyticus</i> ATCC15305 lysogenic for phi11 phage from <i>S. aureus</i> (ermC)	6743	J. Penadés laboratory
ATCC15305	<i>S. saprophyticus</i> ATCC15305	6751	ATCC
Δnre + <i>pnreCB</i> -3xFLAG	MW2 Δnre carrying pCN51:: <i>nreCB</i> -3xFLAG plasmid	5901	This study
Δnre + pCN38 <i>nreCB</i> -3xFLAG	MW2 Δnre carrying pCN38::Pcad:: <i>nreCB</i> -3xFLAG plasmid	7215	This study
RN4220 + pCN38	RN4220 carrying pCN38::Pcad plasmid	7216	This study
ATCC15305 + pCN38	ATCC15305 carrying pCN38::Pcad plasmid	7218	This study
ATCC15305 + pCN38 <i>nreCB</i> -3xFLAG	ATCC15305 carrying pCN38::Pcad:: <i>nreCB</i> -3xFLAG plasmid	7117	This study
RN4220+ pCN38 <i>saeRS</i>	RN4220 carrying pCN38::Pcad:: <i>saeRS</i> plasmid	7191	This study
RN4220 + pCN38 <i>nreCB</i>	RN4220 carrying pCN38::Pcad:: <i>nreCB</i> plasmid	6914	This study
RN4220 + pCN38 <i>braRS</i>	RN4220 carrying pCN38::Pcad:: <i>braRS</i> plasmid	7198	This study
ATCC15305 + pCN38 <i>saeRS</i>	ATCC15305 carrying pCN38::Pcad:: <i>saeRS</i> plasmid	7195	This study
ATCC15305 + pCN38 <i>nreCB</i>	ATCC15305 carrying pCN38::Pcad:: <i>nreCB</i> plasmid	7096	This study
ATCC15305 + pCN38 <i>braRS</i>	ATCC15305 carrying pCN38::Pcad:: <i>braRS</i> plasmid	7209	This study
BL21 + pET46::walk_LDB	<i>E. coli</i> BL21 carrying pET46::walk_LDB plasmid	6106	This study
WK6	<i>E. coli</i> WK6 $\Delta(lac-proAB)$, <i>galE</i> , <i>strA</i> , <i>nal</i> , F'[lacI q ZAM15, <i>proAB</i>]	7792	(Zell and Fritz, 1987)
WK6 + pHEN6::nAB::egfr	WK6 carrying pHEN6::nAB::egfr plasmid	7793	This study
WK6 + pHEN6::nAB::walk.1	WK6 carrying pHEN6::nAB::walk.1 plasmid	7761	This study
WK6 + pHEN6::nAB::walk.2	WK6 carrying pHEN6::nAB::walk.2 plasmid	7762	This study
WK6 + pHEN6::nAB::walk.3	WK6 carrying pHEN6::nAB::walk.3 plasmid	7767	This study
WK6 + pHEN6::nAB::walk.4	WK6 carrying pHEN6::nAB::walk.4 plasmid	7768	This study

[†] Microbial Pathogenesis Laboratory collection number

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio.

Plasmid name	Description	Source or reference
pJET1.2/blunt	Cloning vector	Thermo Scientific
pCN51	<i>E. coli</i> – <i>S. aureus</i> shuttle vector to express genes under the control of Pcad cadmium inducible promoter. EmR	(Charpentier et al., 2004)
pCN51::saeRS	pCN51 plasmid expressing <i>saeRS</i> genes	(Villanueva et al., 2018)
pCN51::nreCB	pCN51 plasmid expressing <i>nreCB</i> genes	(Villanueva et al., 2018)
pCN51::braRS	pCN51 plasmid expressing <i>braRS</i> genes	(Villanueva et al., 2018)
pCN51::nreCB-3xFLAG	pCN51 plasmid expressing <i>nreCB</i> genes with <i>nreC</i> expressing the 3xflag epitope at the C-terminus.	This study
pRMC2	anhydrotetracycline-inducible expression plasmid	(Corrigan and Foster, 2009)
pRMC2::nreC-3xFLAG	pRMC2 plasmid expressing <i>nreC*</i> gene with <i>nreC*</i> expressing the 3xflag epitope at the C-terminus	This study
pAH0135	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>walR</i>	This study
pAH0136	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>hptR</i>	This study
pAH0137	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>lytR</i>	This study
pAH0138	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>graR</i>	This study
pAH0139	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>saeR</i>	This study
pAH0140	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>tcs7R</i>	This study
pAH0141	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>arlR</i>	This study
pAH0142	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>srrA</i>	This study
pAH0143	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>phoR</i>	This study
pAH0144	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>airR</i>	This study
pAH0145	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>vraR</i>	This study
pAH0146	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>agrA</i>	This study
pAH0147	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>kdpE</i>	This study
pAH0148	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>hssR</i>	This study
pAH0149	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>nreC</i>	This study
pAH0150	pRMC2 plasmid expressing the phosphomimetic form of <i>braR</i>	This study
pCN52	<i>E. coli</i> – <i>S. aureus</i> shuttle vector with promoterless <i>gfpmut2</i> fusion vector. EmR	(Charpentier et al., 2004)
pCN52::Patl::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>atl</i> promoter	This study
pCN52::PuhpT::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>uhpT</i> promoter	This study
pCN52::PlrgA::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>lrgA</i> promoter	This study
pCN52::PmprF::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>mprF</i> promoter	This study
pCN52::Peftb::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>efb</i> promoter	This study
pCN52::PMW1206::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>MW1206</i> promoter	This study
pCN52::PmgrA::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>mgrA</i> promoter	(Burgui et al., 2018)
pCN52::Pqox::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>qox</i> promoter	This study
pCN52::PpstS::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>pstS</i> promoter	This study
pCN52::PMW2540::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>MW2540</i> promoter	This study
pCN52::PMW1056::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>MW1056</i> promoter	This study
pCN52::Pcap8A::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>cap8A</i> promoter	This study
pCN52::PhrtA::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>hrtA</i> promoter	This study
pCN52::PnarG::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>narG</i> promoter	This study
pCN52::PctsR::gfp	pCN52 plasmid expressing <i>gfpmut2</i> under the <i>ctsR</i> promoter	This study
pCN38	<i>E. coli</i> – <i>S. aureus</i> shuttle vector promoterless. CatR	(Charpentier et al., 2004)
pCN38::Pcad	pCN38 plasmid carrying the cadmium inducible promoter (Pcad), the polilynker region and the transcription terminators from pCN51 plasmid.	This study
pCN38::Pcad::nreCB-3xFLAG	pCN38::Pcad plasmid expressing <i>nreCB</i> genes with <i>nreC</i> expressing the 3xflag epitope at the C-terminus.	This study
pCN38::Pcad::saeRS	pCN38::Pcad plasmid expressing <i>saeRS</i> genes	This study
pCN38::Pcad::nreCB	pCN38::Pcad plasmid expressing <i>nreCB</i> genes	This study
pCN38::Pcad::braRS	pCN38::Pcad plasmid expressing <i>braRS</i> genes	This study
pET46-ek/LIC	Expression vector	Novagen
pET46::walk_LBD	pET46-ek/LIC expressing the ligand binding domain of Walk	This study
pHEN6	(ApR), pUC- and M13-ori, PelB, pIII; Periplasmic expression of nanobodies with 6xHis-myc-tags	(Conrath et al., 2001)
pHEN6::nAB::egfr	pHEN6 plasmid derivative for periplasmic expression of nanoboy VEGFR with 6xHis-myc-tags	(Salema et al., 2016)
pHEN6::nAB::walk.1	pHEN6 plasmid derivative for periplasmic expression of nanoboy VWalk.1 with 6xHis-myc-tags	This study
pHEN6::nAB:: walk.2	pHEN6 plasmid derivative for periplasmic expression of nanoboy VWalk.2 with 6xHis-myc-tags	This study
pHEN6::nAB:: walk.3	pHEN6 plasmid derivative for periplasmic expression of nanoboy VWalk.3 with 6xHis-myc-tags	This study
pHEN6::nAB:: walk.4	pHEN6 plasmid derivative for periplasmic expression of nanoboy VWalk.4 with 6xHis-myc-tags	This study

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio

Primer name	Sequence 5'-3'	Plasmid name	Source or Reference
TCS phosphomimetic mutants			
MW2_walR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGGCTAGAAAAGTTGTTGATGTTG	pAH0135	This study
MW2_walR_3_D52E_R*	CAGGTAACATGATCTCTAGTAATACGATGCTGGTTCTTC		
MW2_walR_3_D52E_F*	GACATCGTATTACTAGAGATCATGTTACCTGGTCGTGATG		
MW2_walR_2_ScR	GAATTCGAGCTCCACTTCATTCGTTTCGACCTC		
MW2_TCS3RR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGTTTAAGGTAGTTATTTGTGATGATGAC	pAH0136	This study
MW2_TCS3RR_3_D55E_R*	GCATACGAATCTCAGTAATTACTAATTCTGGCTGATGTTG		
MW2_TCS3RR_3_D55E_F*	AATTAGTAATTACTGAGATTCGATGCCACGTAAAAATGG		
MW2_TCS3RR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGTAGCGCCATAATCATTAGTTATGTG		
MW2_lytR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGAAAGCATTAAATCATAGATGATGAG	pAH0137	This study
MW2_lytR_3_D53E_R*	AATTGACCTCTAAAAATATAATGTCATATTGATTGATCAG		
MW2_lytR_3_D53E_F*	TATATTTTGAAGGTCAATTAAATGGATGAAAAATGGGATC		
MW2_lytR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGGATTACTGTTAAAGTAACCTATCGAC		
MW2_graR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGCAAATACTACTAGTAGAAGATGACAA	pAH0138	This study
MW2_graR_3_D51E_R*	GGTAATTGAACCTCCAATATAACAAATTCAGGATTAAC		
MW2_graR_3_D51E_F*	AATTGTTATATTGGAGGTTCAATTACCTAAATATGATGGG		
MW2_graR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGCTACCCATTTCAAATTATTCATGAG		
MW2_saeR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGACCCACTTACTGATCGTG	pAH0139	This study
MW2_saeR_3_D51E_R*	TCATGATCTCAAGTACCATGATATCAATATCATTTGATAG		
MW2_saeR_3_D51E_F*	ATATCATGTACTTGGAGATCATGATGCCAGAAGTTAATGG		
MW2_saeR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGACTTCTAATTGATAACACCATTATCG		
MW2_TCS7RR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGACATCTTTAATTATTGCAGAAGATCA	pAH0140	This study
MW2_TCS7RR_3_D54E_R*	GCATTTCTATCTCTAAAATAACAACGTTAGGATTATATTC		
MW2_TCS7RR_3_D54E_F*	CTAACGTTGTTATTTTGAAGATAGAAAATGCCAGGCATGAC		
MW2_TCS7RR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGTTGTATTATTTAGATCCAGCCTTTTTC		
MW2_arlR_1_KF	TTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGACGCAAATTTAATAGTAGAAGATG	pAH0141	This study
MW2_arlR_3_D52E_R*	GGCAACATTAATTCTTAATATGATTAAATCATAGTAATG		
MW2_arlR_3_D52E_F*	GATTTAATCATATTAGAAATTAATGTTGCCGTC		
MW2_arlR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGCAATTTACGTTTTGTCATCG		
MW2_srrA_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGTCGAACGAAATACCTTATCGTAGATG	pAH0142	This study
MW2_srrA_3_D53E_R*	GCAACATTAATTCTAGTAGTATGCAAGCATAATTATTC		
MW2_srrA_3_D53E_F*	CATACTACTAGAAATTAATGTTGCCTGAAATG		
MW2_srrA_2_ScR	GAATTCGAGCTCCACAGTTTAATTACGACACTATTTAGC		
MW2_phoP_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGTCGCAAAAAGTTGGTAG	pAH0143	This study
MW2_phoP_3_D53E_R*	GTAGCATAACTTCTAAAATAATTAATCTGGCTG		
MW2_phoP_3_D53E_F*	ATTTAATTATTTTGAAGTTATGCTACCTAAAAAAGATG		
MW2_phoP_2_ScR	GAATTCGAGCTCGGTGAACTTCATCATTTGTTCTTTAGG		
MW2_airR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGAACAAAGTAATATTAGTAGATGACC	pAH0144	This study
MW2_airR_3_D55E_R*	GGCATCACTAAATCTAATAGCACAATATCAGGGTG		
MW2_airR_3_D55E_F*	GATATTGTGCTATTAGAAATTAAGTGATGCCTGGC		

Primer name	Sequence 5'-3'	Plasmid name	Source or Reference
MW2_airR_2_ScR	GAATTCGAGCTCATTCTAAATCAACTTATTTTCCATTG		
MW2_vraR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGACGATTAAAGTATTGTTGTGGATG	pAH0145	This study
MW2_vraR_3_D55E_R*	CATAAGTAATTTCATTAAAAATTAATCTGGCTTCAAC	pAH014	This study
MW2_vraR_3_D55E_F*	ATTTAATTTTAATGGAATTACTTATGGAAGACATGG		
MW2_vraR_2_ScR	GAATTCGAGCTCAATACGAACATTGAATTAATTTATGTTGG		
MW2_agrA_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGAAAATTTTCATTTGCGAAGAC	pAH0146	This study
MW2_agrA_3_D59E_R*	GTTGAAAGTTGAATTTCTAAAAAGTAACAGC		
MW2_agrA_3_D59E_F*	TTACTTTTTAGAAATTCAACTTTCAACTGATATTAATG		
MW2_agrA_2_ScR	GAATTCGAGCTCGAATACGCCGTTAACTGACTTTATTATC		
MW2_kdpE_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGCAATCTAAAATATTGATAATTGAAGATG	pAH0147	This study
MW2_kdpE_3_D53E_R*	GGTAAACCTAATTCTAATAAAATGACATCTGG		
MW2_kdpE_3_D53E_F*	GATGTCATTTTATTAGAAATTAGGTTTACCAGATAAAG		
MW2_kdpE_2_ScR	GAATTCGAGCTCTGCCAATCATTCGTTTAAATGG		
MW2_hssR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGGTGCAATGTCTTGTTGTGCG	pAH0148	This study
MW2_hssR_3_D52E_R*	CATCCATCATAATTTCTACCCTGCAATATCG		
MW2_hssR_3_D52E_F*	GCAGTGGTAGAAATTATGATGGATGGTATGGAC		
MW2_hssR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGCAATTCTAGCATAGAGTGTTTTAAAC		
MW2_nreC_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGAAAATAGTCATTGCCGATGATCAC	pAH0149	This study
MW2_nreC_3_D53E_R*	CATACTTAATTTCATTAGTAACACATCAGGTTTATATTC		
MW2_nreC_3_D53E_F*	GTGTTACTAATGGAAATTAAGTATGCCACC		
MW2_nreC_2_ScR	GAATTCGAGCTCTCGCGCTTTTATACTGAATTATATTAATTC		
MW2_braR_1_KF	CTTGATGGTACCAGGAGGAAATTATGAAAATATTAATTGTTGAAGATGATTTGTGTATAG	pAH0150	This study
MW2_braR_3_D51E_R*	CAAAATTAATTCTAGCAATACAAGCTGAGGTTGAT		
MW2_braR_3_D51E_F*	CAGCTTGATTGCTAGAAATTAATTTGCCAACG		
MW2_braR_2_ScR	GAATTCGAGCTCGAAAGGTCATTGCATTACCCCTATAC		
Sequencing primers			
pRMC2_US_F	CTCCTTTTGTGACATTATATCATTTG		This study
pKX-DS-R	CGAAAGGGGGATGTGCTGC		(H aag et al., 2011)
Nre 3xflag epitope insertion			
PCad.infusion.2	AGCTGGCGGCCGCTGCATGCGCACTTATTCAAGTGATTT	p CN51::nreC B-3XFLAG	This study
Nre_infusion_rv1	TGTAGTCAAACCTCAATAATTTCTTT		
Nre_infusion_fw2	AGAGTTTGACTACAAAGACCATGACGG		
Nre_infusion_rv2	TAATTCATCTGGATCCAATTCAAACCTCTATTATCGTCGTCATCTTTGTAG		
Nre_pAH149_fw1	GGGGTACCAGGAGGAAATTATGAAAATAG	pRMC2::nr eC-3XFLAG	This study
Nre_pAH149_rv2	GGGAATTCCTATTATCGTCGTCATCTTTGTAG		
Transcriptional expression of target genes promoters			
P_atl_MW937_fw	ggGTCGACAATCTGAATCTATTCACCTCATTGG	pCN52::Pat l::gfp	Mod. from (Monk et al., 2019)
P_atl_rv	ggGGTACCTCTATTTATTACTCCTAACATTTATTAATTATTACTAAC		This study

Material y Métodos

Primer name	Sequence 5'-3'	Plasmid name	Source or Reference
P_UhpT_fw	gg GTCGAC AGTACATAAAATATGTTTCTAAGTATGTG	pCN52::Pu hpT::gfp	Mod. from (Yang et al., 2015)
P_uhpT_rv	gg GGTAC CTCTGTGCACCTCAATCATTTTC	pCN52::Pu hpT::gfp	This study
P_lrgA_fw	gg GTCGAC CGATAAAATTCACATGTTAAGC	pCN52::Plr gA::gfp	Mod. from (Moormeier et al., 2013)
P_lrgA_rv	gg GGTAC CCGTTTGATTAACTAAAGTATAGATGG		
P_mprF_fw	gtc GTCGAC GTATAGATAACCATATTGTTC	pCN52::Pm prF::gfp	Mod. from (Falord et al., 2011)
P_mprF_rv	ggt GGTAC CTGATTTCATTTTTTCACATCA		
P_efb_fw	GTCGACA AGGATTTCTAAAGTCATAAATTATATC	pCN52::Pef b::gfp	This study
P_efb_rv	GGTACCA ATTAATAACACCTATCCTCAAAT		
P_MW1206_fw	ctgcag GTCGAC TTTATTTGTAAGGAGTCTCGATTATAGAGG	pCN52::PM W1206::gfp	This study
P_MW1206_rv	cctcct GGATCC TTTAATCACCTCTATTTTTTCCTTAATTTAATATTAGTAAATTATTAG		
P_mgrA_fw	ATGCCTGCAGGTCGACGTCCCTTTTAAAGCAATGGC	pCN52::Pm grA::gfp	Mod. from (Crosby et al., 2016)
P_mgrA_rv	ACGAATTCGAGCTCGAATAAGAATATCCATAATTAACGGATTTTGGGTAGT		
P_qox_fw	GTCGAC GCTATTCTCAACTTTCCTTTTA	pCN52::Pq ox::gfp	This study
P_qox_rv	GGTAC CTTTTGGACCTCCTAATACTACA		
P_pstS_fw	gg GTCGAC TACATGTTAATACGTAGTATTAATGGCGAGAC	pCN52::Pp stS::gfp	Mod. from (Kelliher et al., 2017)
P_pstS_rv	gg GGTAC CTGAAATATCCTCCCTGTATGAACAACAA		
P_MW2540_fw	gg GTCGAC ATTTAAAATTGAGCGCTTAGTATGC	pCN52::PM W2540::gfp	This study
P_MW2540_rv	gg GGTAC CATGTTTTACCTCAATAAACTTGAAATAG		
P_MW1056_fw	gg GTCGAC GGCTTAGAAGGCCATTGCTC	pCN52::PM W1056::gfp	Mod. from (Periasamy et al., 2012)
P_MW1056_rv	gg GGTAC CCGTATCTTTAATTGCGTTAAATAAAC		
P_cap8A_fw	gg GTCGAC GCATTTGAAGATCAATGTACAAC	pCN52::Pc ap8::gfp	Mod. from (Cocchiari et al., 2006)
P_cap8A_rv	gg GGTAC CGTATTTACAAGTTGAATATTACTTTG		
P_hrtA_fw	gg GTCGAC GCACCATAGCTATAAACTCC	pCN52::Ph rtA::gfp	Mod. from (Stauff et al., 2007)
P_hrtA_rv	gg GGTAC CTTCATATCGATTCACTTCTCC		
P_narG_nasF_fw	gg GTCGAC CAACTTCTAATCCGACTCAGC	pCN52::Pn arg::gfp	Mod. from (Yan et al., 2011)
P_narG_nasF_rv	gg GGTAC CATTTATATCCTCCTACGTATAAAAATACGATG		
P_ctsR_fw	gg GTCGACA AAGATGGTGGTTGCTTAGGATCG	pCN52::Pct sR::gfp	Mod. from (Wozniak et al., 2012)
P_ctsR_rv	gg GGTAC CTATATCACCCCTTTTGACCTTC		
Walk ligand biding domain expression			
Walk_LBD_LIC_Fw	GACGACGACAAGATGACAAATAATCTTGAAAAAGAGCTG	pET46::Wa IK_LBD	This study
Walk_LBD_LIC_RV	GAGGAGAAGCCCGGTTATTGATTATATTATTTAATTGGTTATAAACG		

Los sitios de restricción están resaltados en negrita y cursiva, los sitios de unión del ribosoma insertados aguas arriba en los RR*s están resaltados en negrita y subrayados, los codones de sustitución aparecen sombreados.

CAPÍTULO I

*Caracterización de la red sensorial de sistemas de dos
componentes de Staphylococcus aureus*

Estrategias de activación de los TCSs

Un análisis sistemático del conjunto de genes regulados por cada TCS en una misma condición ambiental exigiría que todos los sistemas estuviesen activos en la condición ambiental elegida. Las señales activadoras de las histidinas quinasas no se conocen para la mayoría de los casos y por tanto es imposible predecir qué sistemas están activos y qué sistemas se encuentran apagados en esa condición. Para solventar esta limitación, iniciamos el trabajo evaluando dos estrategias que permitiesen activar la cascada de transducción de señal de los TCSs en ausencia de la señal activadora. La primera estrategia consistía en la sobreexpresión de la pareja de histidina quinasa y regulador de respuesta desde un plásmido (pCN51) bajo el control de un promotor inducible por cadmio (P_{cad}). Esta estrategia se apoya en numerosos ejemplos en los que se ha observado que la sobreexpresión de un TCS produce una activación de la cascada de señalización similar a la forma activa del sistema (Villanueva et al., 2018). La segunda estrategia estaba basada en la sobreexpresión de una forma modificada del RR que consiste en el intercambio del residuo conservado de ácido aspártico por un residuo de ácido glutámico. Esta simple modificación provoca que el regulador de respuesta (RR^*) adquiera una conformación que imita la forma fosforilada de la proteína salvaje (Delauné et al., 2012; Ogura et al., 2001; Smith et al., 2004). En esta segunda estrategia, la expresión del RR^* estaba bajo el control de un promotor ($P_{xyl/tet}$) inducible por anhidrotetraciclina (aTC) del plásmido pRMC2. Para ajustar los niveles de expresión del TCS completo o del RR^* desde sus respectivos plásmidos y garantizar que produciáramos cantidades similares en ambas estrategias, la proteína NreC del TCS NreCB y la versión mutada NreC* se marcaron con el epítipo 3xFLAG, lo que nos permitía detectar los niveles de las proteínas mediante western-blot. Los resultados del western-blot mostraron que los niveles de expresión de la proteína NreC producidos desde el P_{cad} sin inducción eran similares a los niveles de expresión de NreC* producidos bajo el control del promotor de $P_{xyl/tet}$ en presencia de 100 ng ml^{-1} de aTC (Fig. 1).

Figura 1. Comparación de los niveles de expresión de los plásmidos. A. Representación esquemática de los plásmidos con las versiones de la proteína NreC marcada con el epítipo 3xFLAG. El epítipo se añadió en extremo carboxilo de la proteína. B. Imagen representativa de western-blot de los niveles de expresión de la proteína NreC en la cepa *S. aureus* ΔXV . Las bacterias crecieron a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.8$. Las proteínas marcadas con 3xFLAG se detectaron con el anticuerpo comercial anti-3xFLAG. En las cepas que fue necesario se añadieron 100 ng ml⁻¹ de aTC. Como control de carga se muestra una porción del gel (stain free).

La capacidad de ambas estrategias de activación para complementar fenotipos asociados a TCSs específicos se comparó utilizando TCSs, para los cuales teníamos identificados fenotipos que nos permitían evaluar la activación del sistema: GraRS, SaeSR, ArlSR, SrrBA, VraRS, NreCB y BraSR. La cepa deficiente en todos los TCSs no esenciales, *S. aureus* ΔXV (Villanueva et al., 2018), se utilizó como testigo para analizar la funcionalidad de ambas estrategias de activación de los TCSs. Para ello, la cepa fue complementada con cada uno de los plásmidos que contenían estos TCSs o sus respectivos RR*. El análisis de los fenotipos mostró que tanto la sobreexpresión del TCS completo, así como de su correspondiente RR*, eran capaces de restaurar el fenotipo asociado (Fig. 2). De esta forma, la complementación con GraRS/GraR* restauraba la capacidad para crecer en condiciones de pH ácido (pH= 4.5); SaeSR/SaeR* restauraban la capacidad para adherir fibronectina humana; ArlSR/ArlR* restauraban la producción de proteína A; SrrBA/SrrA* restauraban la capacidad para crecer a baja temperatura (28°C), y VraRS/VraR* la resistencia a la presencia de detergentes (Triton); NreCB/ NreC* restauraban la capacidad para reducir nitratos y, finalmente, BraSR/BraR* restablecían la resistencia de la bacterias al péptido cíclico bacitracina. En todos los ejemplos analizados, ambos sistemas de activación eran funcionales y las cepas complementadas recuperaban el fenotipo. Sin embargo, la complementación con la forma fosfomimética del RR resultaba en general menos eficaz que la complementación con el TCS completo. El caso extremo lo encontramos en VraR*, donde la complementación del fenotipo con el RR* no fue posible. Esto podía indicar que el RR* era menos eficaz que el TCS completo o que el

exceso de activación de la cascada de señalización acababa generando cierta toxicidad en la bacteria.

Figura 2. Sobreexpresión de los TCS y RR* y caracterización fenotípica. **A.** Curvas de crecimiento a pH 4,5. Los datos representados son la media y desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Se añadieron 2 ng ml⁻¹ de aTC en las muestras que contienen el plásmido pRMC2. **B.** Adhesión a fibronectina humana. Las placas de ELISA se cubrieron con 10 μg ml⁻¹ de fibronectina humana. Las bacterias con el plásmido pRMC2 se indujeron con 100 ng ml⁻¹ de aTC. Los datos representados son la media y SD de tres experimentos independientes. El programa GraphPad 5.01 se utilizó para analizar y representar los resultados. La significancia estadística se calculó con un test de ANOVA de una variable seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni, **p < 0,05. **C.** Expresión de proteína A. La expresión de proteína A en un medio de cultivo de composición definida se detectó por western-blot. La restauración parcial del fenotipo en las cepas con RR* se obtuvo induciendo las muestras con 100 ng ml⁻¹ de aTC. **D.** Crecimiento a 28°C. El crecimiento bacteriano en placas de TSA a 28°C se determinó mediante diluciones seriadas. Para las cepas que expresaban el plásmido pRMC2 las placas se complementaron con aTC (10 ng ml⁻¹). **E.** Sensibilidad al TritonX-100. Los cultivos se aplicaron a lo largo de placas que contenían un gradiente de concentración de Triton X-100. Se probaron diferentes concentraciones de aTC pero no se consiguió complementar el fenotipo con RR*. **F.** Capacidad para reducir nitratos. La presencia de nitratos se detectó colorimétricamente. Se usaron 10 ng ml⁻¹ de aTC para la inducción de la expresión de los plásmidos pRMC2. **G.** Resistencia a la bacitracina. El crecimiento bacteriano en medio TSA complementado con bacitracina (5 μg ml⁻¹) se determinó con diluciones seriadas. Fueron necesarios 100 ng ml⁻¹ de aTC para obtener niveles óptimos de la proteína BraR*.

Análisis transcriptómico de las cepas complementadas con el TCS o con RR*

Para evaluar con mayor exactitud la eficiencia de ambas estrategias, comparamos los cambios en los niveles de expresión globales de bacterias complementadas con tres TCSs completos (SaeSR, NreCB y BraSR) o sus correspondientes RR* (SaeR*, NreC* y BraR*). La expresión diferencial de los genes se definió como significativa cuando la abundancia de los transcritos sufría un cambio en los niveles de expresión superior a dos veces, con un valor ajustado de P menor a 0.05, en comparación con la misma cepa transformada con el plásmido vacío. Los resultados mostraron que los cambios en los niveles de expresión y el número de genes diferencialmente expresados que cumplían los requisitos establecidos era significativamente mayor en las cepas complementadas con el RR* que en las cepas que expresaban las formas nativas de los TCSs. En concreto, 107, 154 y 264 transcritos cambiaron su nivel de expresión en al menos dos veces en la cepa complementada con SaeR*, NreC* y BraR*, respectivamente (ver Anexo, Tabla 1). Sin embargo, únicamente 4, 12, y 2 transcritos superaron los umbrales de significancia establecidos en las cepas complementadas con las formas nativas de los TCS, SaeSR, NreCB y BraSR, respectivamente. Como cabría esperar, todos los genes diferencialmente expresados en las cepas complementadas con el TCS completo estaban incluidos entre los genes diferencialmente expresados en las cepas complementadas con los RR* pero la variación del nivel de expresión era menor.

De acuerdo con los resultados mostrados en los volcano-plots y la representación de los mapas de lectura de la transcriptómica (valores normalizados de log2), las cepas bacterianas que expresaban los RR* presentaban un mayor grado de activación de los genes conocidos del regulón de cada uno de los tres TCSs que las cepas que expresaban las formas nativas de los TCSs (Fig. 3 y Fig. 4). El resultado de los regulones obtenidos para SaeR* y NreC* coinciden en gran medida con genes descritos en la ruta de señalización de estos dos TCSs en estudios previos, indicando que la sobreexpresión de los RR* imitaba correctamente el proceso de transducción de señal previamente descrito por otros estudios y descartando la posibilidad que la forma fosfomimética estuviese provocando una activación/represión inespecífica de la expresión de genes. Por otro lado, nuestros resultados también demostraban que la sobreproducción de los RR* causa una activación más intensa de la cascada de señalización que la sobreproducción de la forma nativa de los TCS, aunque esta última era suficiente para activar el correspondiente fenotipo. En base a estos resultados, se

decidió utilizar la cepa *S. aureus* Δ XV complementada con la forma fosfomimética de cada uno de los RR como estrategia para identificar el regulón de cada uno de los TCSs de *S. aureus*.

Nuestros resultados también ponen en evidencia una limitación del análisis de los datos transcriptómicos, porque el cambio en los niveles de expresión que se exige para ser considerados como significativos, muy probablemente, excluye cambios de expresión de genes que siendo relevantes desde el punto de vista biológico no alcanzan el nivel de significación exigido para ser considerado significativo en el análisis transcriptómico.

Figura 3. Resultados de RNA-Seq. Resultados de las cepas expresando la forma nativa de los TCS (SaeSR, NreCB y BraSR) bajo el control del promotor P_{cad} comparado con la cepa control con el plásmido vacío y de las cepas complementadas con la forma fosfomimética de los RRs (SaeR*, NreC* y BraR*) bajo el control del promotor inducible $P_{xyl/tet}$ comparado con la cepa control. Los genes diferencialmente expresados se consideraron como significativos para valores de $p < 0.05$ ($-\log_{10}$ p-value > 1.3) y valores de Fold Change mayores o menores a ± 2 ($-\log_2$ FC $> \pm 1$). La sobreexpresión de los RR* provoca una mayor activación de los niveles de la señal de transducción, el número de genes diferencialmente expresados es mayor en estas células.

Figura 4. Mapas de las lecturas de RNA-Seq. Imágenes que muestran la distribución de las lecturas de los operones de (SaeSR, NreCB y BraSR) y de los genes contiguos a ellos. Los mapas se obtuvieron con el programa CGL Genomics y se modificaron con Adobe Illustrator CS4. En la imagen se muestra una representación esquemática de diferentes regiones del genoma. Las flechas en color verde representan los marcos de lectura abiertos (open reading frame, ORF) de las HKs y RRs, las flechas azules corresponde con las ORFs de los genes contiguos al operón. Los alineamientos de los paneles corresponden desde arriba hacia abajo con: MW2 Δ XV con el plásmido pCN51 (plásmido vacío como control), pCN51::TCS (expresando la forma nativa completa de los tres TCSs estudiados en cada caso), pRMC2 (plásmido vacío como control) y pRMC2::RR* (expresando la forma fosfomimética de cada uno de los RR estudiados)

Análisis transcripcional de la red sensorial de sistemas de dos componentes

Para identificar el regulón específico de cada uno de los TCSs de *S. aureus* utilizamos la colección de dieciséis cepas derivadas del mutante *S. aureus* Δ XV complementadas con la forma fosfomimética de cada uno de los RR*. Al emplear la cepa *S. aureus* Δ XV teníamos la ventaja de poder identificar el regulón de cada TCS en ausencia de interferencias por otros TCS. Para ello, a partir de 5 ml de un cultivo a $DO_{600} = 0.8$ se purificó el RNA total de cada una de las cepas y se construyeron librerías de secuenciación, como se describe en los materiales y métodos. El resultado de las librerías se secuenció en un secuenciador Illumina NextSeq500. Un total de 2443 transcritos, asociados a 1075 genes (36.6% del genoma de la cepa MW2), cambiaron sus niveles de expresión al menos en dos veces y tenían un valor ajustado de P menor a 0.05 en comparación con la cepa *S. aureus* Δ XV complementada con el plásmido vacío (Fig. 5, ver Anexo, Tabla 2). En conjunto, los niveles de expresión aumentaban en 712 genes, disminuían en 306 y en el caso de 57 genes, su nivel de expresión aumentaba o disminuía dependiendo del RR* expresado (ver Anexo, Tabla 3). Estos resultados indican que, de forma general, los TCSs modifican la fisiología de las bacterias mayoritariamente activando la expresión de genes y en menor medida inhibiendo su expresión. El número de genes diferencialmente expresados para cada TCS era muy desigual dependiendo del TCS y variaba desde dos genes en el caso de HptR* hasta 386 genes en el caso de PhoR* (ver Anexo, Tabla 1). Para determinar los genes que están regulados específicamente por cada TCS, se consideraron los genes afectados exclusivamente por ese TCS (Fig. 6). Los resultados mostraban que los regulones de todos los TCS contienen genes regulados específicamente por cada uno de ellos (Fig. 4, ver Anexo Tabla 4). El número de genes regulados específicamente es muy bajo en HptSR, LytSR y TCS7SR, mientras que otros TCSs regulan la expresión de centenares de genes (Fig. 5). Por otro lado, el análisis de los regulones mostraba la existencia de numerosos genes cuya expresión estaba afectada por varios TCSs, lo que sugiere que la adaptación a diferentes escenarios fisiológicos exige la modificación de la expresión de las mismas rutas metabólicas. En concreto, hay varias rutas metabólicas que son activadas, al menos, por la mitad de los TCSs y en la mayoría de los casos en la misma dirección. Entre estos genes se encuentran genes asociados a la síntesis de purinas (operon *pur*), adquisición de hierro (*sriA*, *isdCD*), glicolisis (*gapR*), biosíntesis de metionina (*metN1*, *metN2*), permeasas (*lysP*) o proteínas secretadas (*ssa*), entre otros (ver Anexo, Tabla 5). No obstante, también detectamos la presencia

de un grupo de 57 genes que presentan una regulación diferente en función del RR* expresado (ver Anexo, Tabla 2), lo que sugiere la existencia de una compleja red de regulación de los niveles de expresión de estos genes que depende de múltiples estímulos externos. Los regulones que presentaban un mayor solapamiento de genes son los que correspondían a los sistemas HssR* y NreC*, que comparten un 68% de los genes.

Considerados globalmente, estos resultados representan la identificación en condiciones de activación de todo el conjunto de genes que regula cada uno de los TCSs de una misma bacteria. Además, el análisis se ha realizado en ausencia de interferencias producidas por otros TCSs y en una misma condición ambiental. Los resultados ponen en evidencia que cada TCS regula genes afectados únicamente por ese sistema y genes cuya expresión está afectada por varios TCS, indicando que ningún TCS puede sustituir a otro TCS y que varios TCS tienen que recurrir a modificar las mismas rutas metabólicas para conseguir la adaptación a diferentes condiciones ambientales.

Figura 5. Heatmap de genes significativamente expresados. Los cambios en la expresión de genes de la cepa MW2 ΔXV con los plásmidos derivados del pRMC2 expresando las versiones fosfomiméticas de los RRs se representó con el paquete heatmap3 para R en la versión 1.1.463 en el programa R en versión 3.5.1. Los agrupamientos jerárquicos se establecieron usando la distancia euclidiana con un modelo de uniones completas. Los datos transcriptómicos completos se encuentran disponibles en nuestro visualizador web de mapas de ARN (<http://rnamaps.unavarra.es/>).

Análisis proteómico de la red sensorial de los sistemas de dos componentes

El análisis de los cambios que ocurren a nivel de ARN mensajero en una condición ambiental específica provee una imagen incompleta de la respuesta que desencadena la activación de los TCSs en el interior de la célula. Un TCS podría modificar los niveles de expresión de una proteasa y como consecuencia alterar los niveles de expresión de proteínas sin que provocase cambios en los niveles del correspondiente ARN mensajero (mARN). Para completar el análisis del regulón afectado por cada TCS, analizamos los cambios a nivel de proteína en cada una de las cepas mediante técnicas de identificación y cuantificación de proteínas de espectrometría de masas (LC-MS). El análisis de la expresión diferencial de la colección de dieciséis cepas derivadas de la cepa *S. aureus* Δ XV complementadas con cada RR* resultó en 267 proteínas diferencialmente expresadas de las 1721 proteínas que fueron identificadas en el extracto total de los lisados bacterianos. Entre las 267 proteínas, 163 se encontraban en mayor cantidad, 100 se encontraban en menor cantidad y 4 proteínas modificaban su expresión en función del RR* presente (ver Anexo, Tabla 3 y Tabla 6). Para la mayoría de los TCSs el número de proteínas diferencialmente expresadas es menor que el número de genes seleccionados de los datos transcriptómicos, a excepción de HptR*, LytR* y GraR*, donde el número de proteínas diferencialmente expresadas es mayor (Fig. 5).

En general los resultados mostraron que el grupo de proteínas reguladas por cada TCS, al igual que ocurre con el mARN, contiene proteínas reguladas específicamente por cada TCS, confirmando la singularidad funcional de los TCSs (Fig. 6). Además, de acuerdo con los datos de transcriptómica, los cambios en la expresión de las proteínas se producen en la misma dirección que los cambios en la expresión de genes, confirmando que cada TCS modifica la expresión de un grupo de genes tanto a nivel de ARN como de proteínas para adaptar la fisiología de la bacteria a diferentes condiciones ambientales. Las proteínas que forman los regulones proteómicos de cada TCSs están recogidas en la Tabla 7 del anexo de esta tesis.

Figura 6. Análisis de los genes y proteínas comunes entre el conjunto completo de la red de TCS. **A.** Número de genes comunes entre los regulones de los diferentes TCSs y número de genes regulados específicamente por cada TCS. **B.** Número de proteínas comunes entre regulones de los diferentes TCSs y número de proteínas reguladas específicamente por cada TCS. En el panel superior las intersecciones de cada fila y columna indican en número de genes o proteínas comunes para cada pareja de TCSs. En la diagonal y coloreados aparecen el número de genes o proteínas que forman los regulones completos de cada TCS. En el panel inferior y siguiendo las flechas se indican el número de genes o proteínas regulados específicamente por cada TCS.

Generación de biosensores fluorescentes específicos para cada sistema de dos-componentes

Los resultados del análisis transcriptómico global de cada uno de los TCS nos habían permitido identificar genes cuya expresión estaba regulada específicamente por un TCS. Para confirmar nuestros análisis transcriptómicos y al mismo tiempo generar sistemas reporteros que nos permitiesen visualizar de una forma sencilla la activación de un TCS de forma específica, decidimos utilizar la información de los genes regulados por cada TCS (ver Anexo, Tabla 4) y la correlación entre los datos transcriptómicos y proteómicos (ver Anexo, Tabla 7) para generar una colección de genes reporteros específicos para cada TCS. Con excepción de *VraR**, identificamos promotores de genes cuya expresión es significativamente mayor en presencia del *RR** correspondiente para todos los TCSs (Fig. 7). En el caso de *atl* (*WalR**), *lrgA*

(*LytR**), *qox* (*SrrA**) y *ctsR* (*BraR**) existía un nivel basal de expresión del gen reportero en ausencia del inductor.

Figura 7. Generación de la colección de biosensores. Imágenes representativas de western-blot muestran la expresión de la proteína GFP expresada en la cepa *S. aureus* ΔXV. En cada caso la bacteria contiene una de las fusiones transcripcionales diseñadas para cada diana seleccionado y el RR* individual correspondiente. Se usaron diferentes tiempos de exposición en una misma membrana en función del biosensor. Las bacterias crecieron a 37°C hasta alcanzar una fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.8$) y en los casos donde fue necesario se añadió aTC (100 ng ml⁻¹). Como control de carga se muestra una porción del gel (stain-free).

Para verificar que los promotores de los genes seleccionados eran realmente específicos de cada uno de los TCS, utilizamos tres genes reporteros *efb* (*SaeR**), *mgrA* (*ArlR**) y *qox* (*SrrA**) como prueba de concepto y evaluamos la especificidad de la expresión estos. Para ello, se analizó la expresión de la proteína fluorescente en la colección de cepas derivadas del mutante ΔXV y que estaban complementadas con cada uno de los RR* (Fig. 8). Los resultados confirmaban que la expresión del gen reportero se activaba de forma significativa en presencia del correspondiente RR*. Por otro lado, para confirmar que ningún otro TCS afectaba a la expresión del gen reportero, se introdujeron los sistemas reporteros en una colección de mutantes simples en cada uno de los TCSs. Los niveles de expresión del gen reportero disminuían significativamente solo en ausencia del TCS correspondiente (Fig. 8). Estos resultados demuestran que la colección de genes reporteros construida era específica para cada uno de los TCSs.

Esta colección de genes reporteros podría ser de mucha utilidad para identificar las señales ambientales a las que responde cada uno de los TCSs o para la búsqueda de drogas que bloquean la función de cada uno de los TCSs.

Figura 8. Evaluación de la especificidad de los genes reporteros *efb*, *mgrA* y *qox*. Imágenes representativas de western-blot muestran los niveles de expresión de la proteína GFP de los biosensores *Pefb-gfp*, *PmgrA-gfp* y *Pqox-gfp*. **A, C, E.** Los niveles de expresión se estudiaron en la colección de cepas de *S. aureus* Δ XV complementada con cada RR* de manera individual. Únicamente cuando el RR* específico o la copia del TCS en el genoma de la cepa salvaje está presente se observa activación del biosensor. **B, D, F.** Los niveles de expresión de GFP se analizaron en la colección de cepas de mutantes individuales en cada uno de los TCSs. Los niveles de expresión disminuyen significativamente en las cepas que no contienen el TCS responsable de la activación de los genes estudiados. Las bacterias crecieron a 37°C hasta alcanzar una fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.8$) y en los casos donde fue necesario se añadió aTC (100 ng ml⁻¹). Como control de carga se muestra una porción del gel (stain-free).

CAPÍTULO II

*Análisis comparativo del regulón de cada sistema de dos
componentes*

Análisis comparativo del regulón de cada sistema de dos componentes

Sabiendo que la forma fosfomimética de los RR es una forma constitutivamente activa de los RR, estos podrían estar activando una respuesta exacerbada en el interior de la célula induciendo la expresión de genes fuera de la cascada de señalización correspondiente a cada TCS. Un análisis general de nuestros resultados muestra que en su mayoría, los regulones obtenidos en este estudio presentan un número menor de genes que los regulones obtenidos de forma clásica, comparando los resultados de la cepa salvaje con los de la cepa mutante en el correspondiente TCS. Esto sugiere que, por un lado, la forma fosfomimética no altera la expresión de genes de manera indiscriminada y, por otro, que en los estudios realizados hasta ahora, los regulones podrían estar incluyendo genes regulados por otros TCSs (Fig. 1). A continuación se muestra un resumen de los resultados más característicos del regulón de cada uno de los TCS.

Figura 1. Resumen de los cambios transcriptómicos y proteómicos observados al sobreexpresar la forma fosfomimética de cada RR. Las cepas expresaban la versión fosfomimética de cada RR desde el plásmido pMCS bajo el control del promotor inducible $P_{xyl/tet}$. Las bacterias crecieron a 37°C hasta alcanzar una fase exponencial ($OD_{600nm} = 0.6 - 0.8$) y los genes diferencialmente expresados se consideraron como significativos para valores de $p < 0.05$ ($-\log_{10} p\text{-value} > 1.3$) y cambios en los niveles de expresión de Fold Change mayores o menores a ± 2 ($\log_2 FC > \pm 1$) y se representaron en rojo. A la derecha de los volcano-plots se representa el solapamiento entre genes y proteínas activados e inhibidos por cada RR* el cual, se estableció mediante la comparación de listas de genes y proteínas con el software BioVinci versión 1.1.5 desarrollado por BioTuring Inc., San Diego California USA, www.bioturing.com

WalRK

WalRK es el único TCS esencial para el crecimiento de *S. aureus*. WalRK es un importante regulador del metabolismo del peptidoglicano a través del control de la expresión de genes de hidrolasas de la pared celular. También regula la expresión de proteínas de unión a la matriz extracelular, toxinas citolíticas y proteínas de evasión del sistema inmune innato, algunas de ellas reguladas a su vez por SaeSR (Delauné et al., 2012). Además, se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la vancomicina (Cameron et al., 2016; Howden et al., 2011; Jansen et al., 2007). El sistema está codificado en un operón junto con dos proteínas accesorias (WalH, WalI) de las que se sabe que forman complejos proteicos junto con la HK del TCS en la membrana de la bacteria (Cameron et al., 2016). En *B. subtilis* se ha descrito que estas proteínas inhiben la actividad de WalK (Szurmant et al., 2007). Sin embargo, en *S. aureus* parecen tener un efecto contrario y estarían activando a la HK. Cepas mutantes en *walH* y *walI* presentan una menor expresión de genes de autolisinas y menor sensibilidad a la vancomicina (Cameron et al., 2016; Gajdiss et al., 2020). Estudios recientes sobre la HK del sistema han determinado que de los dos dominios PAS que contiene, el dominio PAS intracelular es capaz de unir iones de zinc. La interacción con este ión provoca cambios en la conformación de la proteína (Monk et al., 2019). Además, se ha descrito que existen en la membrana de la bacteria otras proteínas como SpdC y PknB que se co-localizan junto con WalK. SpdC interacciona con la HK e inhibe su actividad (Poupel et al., 2018) y PknB (Stk1) es una Ser/Thr quinasa capaz de fosforilar un residuo de treonina del RR, WalR, localizado en la interfaz de dimerización de la molécula y podría afectar al proceso de dimerización e interacción con el ADN del RR (Hardt et al., 2017).

La sobreexpresión de WalR* activó la expresión de 138 genes e inhibió la expresión de 149 genes (ver Anexo Tabla 1 y Tabla 2). El número de genes regulados específicamente por WalR* es de 56 (ver Anexo Tabla 4). En este regulón se incluyen genes como *atl* y *ssaA* que codifican para hidrolasas del peptidoglicano, *icaA* que forma parte del operón encargado de la síntesis del polisacárido PIA/PNAG o genes que codifican para proteínas estructurales del ribosoma como *rplT*, *rmpl* e *infC*. Por otro lado, los datos de proteómica mostraron que se había alterado la expresión de 47 proteínas (9 activadas y 38 inhibidas) (ver Anexo Tabla 7). El análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas utilizando Gene Ontology (GO) mostraba que el

regulón de WalR* está enriquecido en procesos relacionados con el metabolismo de la pared celular y la traducción de proteínas (ver Anexo Tabla 8).

HptRS

HptSR es necesario para la detección de hexosas fosfato y activa la transcripción del gen *uhpT*, gen que codifica para el único transportador de glucosa 6-fosfato de *S. aureus* y que se localiza aguas abajo del operón del TCS (Park et al., 2015). Este transportador también es responsable del transporte del antibiótico Fosfomicina (Xu et al., 2017). Cepas de *S. aureus* mutantes en este TCS mostraron deficiencias en su capacidad para multiplicarse intracelularmente (Park et al., 2015). De acuerdo con los datos transcriptómicos la expresión de la forma fosfomimética de HptR resultó en la activación exclusiva de *uhpT* (ver Anexo, Tabla 2). Sin embargo, los resultados de proteómica mostraron un regulón formado por cuatro proteínas que incluyen la proteína de la familia de tioredoxinas, MW2457 y la inhibición de la proteína MW2050 (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO no destacó ningún proceso biológico característico de este sistema (ver Anexo, Tabla 8).

LytSR

La estructura de la HK con seis dominios transmembrana sugiere que LytS es capaz de detectar señales asociadas a la membrana (E W Brunskill and Bayles, 1996). LytSR responde a cambios en el potencial de membrana, procesos de autólisis y formación de biofilms (Patton et al., 2006). Es por esto que, LytSR puede ser importante en la interacción entre *S. aureus* y el hospedador. Análisis transcriptómicos previos, en los que se comparaban los perfiles de expresión de la cepa parental y su correspondiente mutante en *lytSR* mostraron que en ausencia de LytS se alteraba la expresión de más de 200 genes relacionados con el metabolismo energético, de azúcares y nucleótidos y con la replicación, transcripción y traducción. Los genes con cambios más drásticos de dieron en el operón *lrgAB* (Sharma-Kuinkel et al., 2009). Sorprendentemente, nuestro análisis mostraba que únicamente tres genes, entre ellos el operón *lrgAB*, modificaban su expresión al sobreexpresar LytR*, (ver Anexo, Tabla 2). Una posible explicación para esta manifiesta discrepancia es que la mutación de LytSR en la cepa salvaje provoque la activación de otros TCSs que son responsables de la activación indirecta de un gran número de genes. El operón *lrgAB* codifica para un inhibidor de hidrolasas de mureína (E W Brunskill and Bayles, 1996). Las hidrolasas de mureína catalizan la escisión de componentes de la pared celular,

regulando así el crecimiento bacteriano y el recambio del peptidoglicano. En ausencia de LytSR, la expresión de las hidrolasas de mureína es mayor y provoca la autólisis de *S. aureus* y la liberación de ADN genómico (componente de la matriz del biofilm).

LytR* es, junto con HptR*, uno de los casos en los que el regulón del TCS obtenido mediante técnicas proteómicas es mayor que el obtenido a partir de los datos transcriptómicos. Los resultados mostraban trece proteínas con expresión alterada. Las proteínas que forman parte de este grupo están involucradas en el metabolismo energético, el ciclo celular y la transmisión de las señales en la bacteria (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO mostraba que el proceso biológico enriquecido cuando LytRS está activo es la muerte celular programada (ver Anexo, Tabla 8).

GraRS

La HK del sistema GraRS forma parte de la familia de HK intra-membrana. Para la transmisión de la señal necesita de la proteína accesoria GraX (Falord 2011).

GraRS es responsable de la resistencia frente a péptidos catiónicos (CAMPs) mediante la modificación de ácidos teicoicos y del fosfatidilglicerol para aumentar la carga positiva de la superficie de la bacteria y disminuir las posibilidades de unión de los CAMPs (Li et al., 2007; Meehl et al., 2007). También regula la resistencia frente a estos péptidos antimicrobianos modificando la expresión del transportador tipo ABC, *vraFG*, situado a continuación del TCS en el genoma y del que se ha descrito que es capaz de detectar los CAMPs (Falord et al., 2012; Meehl et al., 2007).

Este sistema ha sido relacionado con la resistencia bacteriana a vancomicina (Cui et al., 2005), a condiciones de alta temperatura y en situaciones de estrés oxidativo. Cepas mutantes en *graS* han mostrado una virulencia atenuada en modelos infección *in vivo* (Cheung et al., 2014). Además, se ha demostrado que este TCS es necesario para la supervivencia de las bacterias en el interior de células, como los macrófagos, debido a su capacidad para detectar cambios de pH, lo que permite a la bacteria adaptarse a las condiciones del fagolisosoma y dividirse (Flannagan et al., 2018). La actividad de GraRS se puede ver afectada también por la fosforilación del GraR a través del sistema Stk1 (Fridman et al., 2013).

GraR* activó la expresión de 18 genes e inhibió la expresión de un gen (ver Anexo Tabla 1 y Tabla 2). El grupo de genes regulados específicamente por GraR* incluye una enzima relacionada con transferencia del grupo acetilo (MW2618). Los

resultados de proteómica mostraron que GraR* modificó la expresión de 20 proteínas (11 activaron y 9 inhibieron su expresión respectivamente) (ver Anexo Tabla 7). La correlación entre los datos de transcriptómica y proteómica es de un 17%. El análisis de GO reveló una representación significativa de genes relacionados con la biosíntesis de ácidos lipoteicoicos y la biosíntesis de la pared celular mediante la activación del operón *dlt* (ver Anexo Tabla 8)

SaeRS

SaeSR regula la secreción de toxinas, exoenzimas, y proteínas inmunomoduladores importantes para la patogénesis de *S. aureus* (Giraud et al., 1994). El sistema se activa ante perturbaciones de membrana que permiten al patógeno reaccionar frente a moléculas efectoras de las fagocitosis (Geiger et al., 2008) y se ha mostrado también que se inhibe en condiciones de elevada concentración de NaCl o pH ácido (Geiger et al., 2012). Junto con SaeSR, en el operón se incluyen dos proteínas auxiliares (SaeP y SaeQ) que regulan los niveles de RR fosforilado modificando la actividad fosfatasa de SaeS a través de un complejo proteico (Jeong et al., 2012). Estudios previos han mostrado que SaeSR activa la expresión de numerosos genes: *sib*, *efb*, *eap*, *lukM*, *lukF*, *fnbA*, *fnbB*, *sspA*, *coa* e inhibe la expresión de polisacáridos capsulares, entre otros (Harraghy et al., 2005; Kuroda et al., 2007; Liu et al., 2016; Mainiero et al., 2010; Rogasch et al., 2006; Rooijakkers et al., 2006). Mutantes en *saeSR* presentan una menor virulencia y menor mortalidad en modelos de infección intraperitoneal o menor adherencia de células epiteliales en pulmón (Bae et al., 2004; Benton et al., 2004; Giraud et al., 1996; Liang et al., 2006).

Nuestros resultados mostraron que un total de 107 genes modificaba su expresión en presencia de SaeR*. El número de genes regulados específicamente por este TCS fue de 40 genes, todos ellos con cambios positivos de la expresión (ver Anexo, Tabla 4). Coincidiendo con los estudios previos, nuestros resultados indican que la mayoría de los genes regulados por SaeSR son toxinas y proteínas inmunomoduladoras (*coa*, *set16-22*, *hla*, *hlb*, *hlgABC*, *sbi*, *efb*). El análisis de enriquecimiento (GO) confirma un enriquecimiento significativo de los genes que intervienen en la interacción de *S. aureus* y el hospedador, incluyendo genes que codifican para leucocidinas y toxinas dirigidas a eritrocitos u otros elementos del sistema inmune del hospedador (Fig. 2). Por otro lado, genes relacionados con la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina, así como el transporte de metionina, se

encontraban inhibidos y significativamente enriquecidos en el grupo de genes inhibidos por SaeR* (Fig. 2). Al comparar los resultados de transcriptómica y proteómica se pudo comprobar que existía una correlación elevada entre ambas aproximaciones. El 31% de las proteínas cuyos niveles estaban modificados, también se encontraban alterados a nivel transcripcional (ver Anexo, Tabla 7).

Figura 2. Análisis del regulón de SaeR*. A, B. Volcano-plots representando los cambios relativos de la expresión de genes y proteínas entre la cepa expresando SaeR* y la cepa control con el plásmido pRMC2 vacío. Los genes y proteínas diferencialmente expresados se consideraron como significativos para valores de $p < 0.05$ ($-\log_{10} p\text{-value} > 1.3$) y valores de Fold Change mayores o menores a ± 2 ($-\log_2 FC > \pm 1$). C. El solapamiento entre los genes y proteínas activados e inhibidos por SaeR* se determinó mediante la comparación de las listas de genes y proteínas con el software BioVinci versión 1.1.5 desarrollado por BioTuring Inc. San Diego, California USA, www.bioturing.com. D. Resultado del análisis de enriquecimiento de Gene Ontology para los genes activados (barras de signo positivo) e inhibidos (barras de signo negativo) por SaeR*. Las categorías de GO están indicadas en la leyenda de la figura.

TCS7RS

De los dieciséis TCSs de *S. aureus*, TCS7RS es el único que no ha sido caracterizado. TCS7RS está presente únicamente en el género *Staphylococcus*, lo que sugiere que este puede tener un papel crucial en el estilo de vida de estas bacterias. La expresión de la versión fosfomimética del RR resultó en la activación de un grupo de catorce genes (ocho activados y seis inhibidos) en los que se incluyen genes como *ldhA*, *ndhF* o genes involucrados en biosíntesis de purinas (*purK*, *purC*, *purS*) que TCS7R* podría co-regular junto con otros TCSs (ver Anexo, Tabla 2). La mayoría de los genes regulados por TCS7RS están localizados en los alrededores del propio TCS (ver Anexo, Tabla 4). Los genes que presentan los mayores cambios de expresión (*MW1206* y *MW1207*) son contiguos a TCS7RS y codifican para un posible transportador tipo ABC, con dominios transmembrana y de unión a ATP, lo que sugiere que TCS7RS podría regular el transporte de moléculas específicas. Los cuatro genes, *MW1206-MW1207-tcs7S-tcs7R*, constituyen un operón cuya expresión se activa por el propio TCS. Esto genera un circuito de auto-regulación positiva que permite amplificar la respuesta que se desencadena como consecuencia de la activación del sistema. Los genes localizados aguas abajo del RR (*MW1210* and *nuc*) muestran una activación moderada en presencia de TCS7R*. *MW1210* se orienta en dirección opuesta al sistema y codifica para una proteína hipotética que podría formar parte de la familia de proteínas de membrana con dominio tipo LapA (involucradas en el ensamblaje del lipopolisacárido en bacterias gram negativas). Por otro lado, el gen *nuc* codifica para una termonucleasa necesaria para la disipación del biofilm mediante la degradación del ADN extracelular (Kiedrowski et al., 2011) y está controlado también por otro TCS, SaeSR (Olson et al., 2013).

El análisis proteómico identificaba ocho proteínas cuya expresión se había modificado en presencia del TCS7R* (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de enriquecimiento únicamente resultó significativo en el grupo de genes inhibidos por TCS7R* con un enriquecimiento del proceso biológico de la síntesis *de novo* de moléculas de inosina monofosfato (IMP), el cual está relacionado con la síntesis de purinas (ver Anexo, Tabla 8). Estos resultados indican que la función del TCS7RS está asociada a genes que se encuentran en las inmediaciones del mismo, lo que sugiere que el TCS7RS se adquirió junto al grupo de genes adyacentes y que se ha mantenido aislado del resto de TCSs.

ArlRS

ArlRS se ha relacionado con la regulación de la autólisis de la bacteria (Fournier and Hooper, 2000), la formación de biofilm (Toledo-Arana et al., 2005), la adhesión a proteínas de la matriz extracelular (Kwiecinski et al., 2019) y la agregación de proteínas del plasma (Walker et al., 2013). Su papel en la virulencia de la bacteria se ha descrito en diferentes modelos de infección de animales (Benton et al., 2004; Burgui et al., 2018; Radin et al., 2016; Walker et al., 2013) y parece que la regulación de MgrA es el principal mecanismo molecular que rige esta capacidad del TCS (Crosby et al., 2019). Experimentos recientes han profundizado en el conocimiento a cerca de la estructura y organización del dominio de unión a ADN de ArlR (Ouyang et al., 2019; Yan et al., 2019). Además, aunque se ha determinado una posible secuencia consenso de reconocimiento para este RR en la región promotora de distintos genes diana no se ha llegado a un único resultado (Crosby et al., 2019; Ouyang et al., 2019).

Nuestros datos indican que ArlR* activa la expresión de 34 genes e inhibe la expresión de 59 genes (ver Anexo Tabla 2). El grupo de genes regulados específicamente por ArlR* es de 20 genes incluyendo el regulador global MgrA, un operón que codifica para un transportador ABC y a otros transportadores de membrana como (MW0062) (ver Anexo Tabla 4). El análisis proteómico mostraba que 14 proteínas aumentaban y 10 disminuían sus niveles de expresión (ver Anexo Tabla 7). El estudio de GO mostró un enriquecimiento en procesos biológicos como el catabolismo de la urea, el transporte de péptidos y la biosíntesis de IMP (ver Anexo Tabla 8).

SrrBA

SrrBA es homólogo del TCS *resDE* de *B. subtilis* (Birkey et al., 1998) y tiene un importante papel en la regulación de la virulencia bacteriana en función de la disponibilidad de oxígeno (Throup et al., 2001; Yarwood et al., 2001). SrrBA activa la expresión de genes como *tst*, *spa*, *agr* o *icaR* en condiciones aeróbicas e inhibe la transcripción de los mismos en condiciones de bajas tensiones de oxígeno (Pragman et al., 2007). Aunque la expresión de SrrBA parece necesaria en condiciones de baja concentración de oxígeno esta no es la única condición que induce la expresión del TCS. SrrBA también se activa en presencia de especies reactivas de nitrógeno. Datos transcriptómicos obtenidos bajo esas condiciones mostraron que SrrBA es capaz de regular genes del metabolismo anaeróbico de la bacteria (*pflAB*, *adhE*, *nrdDG*), del

citocromo (*ctaB*, *cydAB*, *qoxABCD*), genes de la biosíntesis del grupo hemo (*hemACDX*), proteínas de reparación de grupos hierro-azufre (*scdA*) y detoxificación de NO (*hmp*) (Kinkel et al., 2013).

Nuestro análisis transcriptómico indicaba que SrrA* regula la expresión de 244 genes. De los cuales, activaba la expresión de 144 genes e inhibía la expresión de 104 genes. De este grupo, 91 genes estaban regulados específicamente por SrrA* (ver Anexo Tabla 4). En consonancia con estudios previos, nuestros resultados confirman el papel de SrrBA en la regulación del metabolismo bacteriano en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Sin embargo, genes relacionados con la resistencia a H₂O₂ no pasaban el umbral de significación exigido. Como novedad frente a los estudios previos, nuestros resultados indican que SrrA* también regula genes implicados en la biosíntesis de arginina, atpC.

El análisis proteómico identificó 59 proteínas. De estas, 41 habían sufrido también cambios a nivel transcripcional y 29 proteínas están reguladas específicamente por SrrBA (ver Anexo, Tabla 7). El análisis del enriquecimiento de GO mostraba que el regulón establecido para SrrA* está implicado en procesos de óxido-reducción, biosíntesis de arginina, grupo hemo, síntesis de ATP y transporte de iones (ver Anexo, Tabla 8).

PhoRP

PhoRP regula la adquisición y homeostasis de fosfato de las bacterias. La activación de PhoRP es importante durante el crecimiento bacteriano en condiciones limitantes de Pi además de ser esencial para el proceso de virulencia de la bacteria (Botella et al., 2014; Kelliher et al., 2017).

PhoP* alteró la expresión de 386 genes (237 activados y 149 inhibidos). De estos, 100 forman el grupo de genes regulados específicamente por PhoP* (ver Anexo Tabla 2 y Tabla 4). En este regulón se encuentran genes como el transportador tipo ABC involucrado en la adquisición de fosfato y fosfonato (*pstSACB*, *phnC*), entre otros. Los datos proteómicos mostraron que 58 proteínas sufrieron cambios en sus niveles de expresión, 21 activadas y 37 inhibidas respectivamente (ver Anexo Tabla 7). Según los resultados de enriquecimiento de GO el regulón de PhoP* está involucrado principalmente en el transporte de fosfato (ver Anexo Tabla 8).

AirSR

AirR activa la expresión de los genes que codifican para el pigmento de estafiloxantina, *ctrOPQMN*. La estafiloxantina es un pigmento carotenoides que actúa como agente antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno exógenas como H_2O_2 y se ha demostrado que tiene un papel importante en la supervivencia de *S. aureus* en cultivos *in vitro* con neutrófilos. AirSR es por tanto un regulador de la expresión de factores antioxidantes y de virulencia necesarios para la supervivencia de la bacteria en el interior de fagosomas (Hall et al., 2017).

Con la sobreexpresión de AirR* se alteró la expresión de 150 genes, de los cuales 96 y 54 aumentaron o disminuyeron su expresión, respectivamente. 48 genes estaban regulados específicamente por este TCS. En el regulón de AirR* podemos destacar genes como los del operón *cysJG*, que forman la ruta de síntesis del grupo prostético sirohemo en *S. aureus* (ver Anexo, Tabla 2 y 4). Otros genes a resaltar serían el gen de la ferredoxina (*fer*), *azo1*, gen responsable del metabolizar pigmentos azoicos, *sdrM* que codifica para una bomba de transportadora para múltiples drogas, entre otros.

El análisis proteómico resultó con 46 proteínas cuya expresión se había visto modificada como consecuencia de la sobreexpresión de AirR*, 29 fueron activadas y 16 inhibidas. La correlación de los datos transcriptómicos y proteómicos es de un 16 % en este caso. El regulón de proteínas reguladas específicamente por este TCS está formado por 20 proteínas (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO mostraba que AirR* regula la biosíntesis de IMP, la pared celular y proteínas de transporte (ver Anexo, Tabla 8).

VraRS

VraRS regula la activación de enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular y, como resultado, en su ausencia aumenta la susceptibilidad a múltiples antibióticos: metilina (Boyle-Vavra et al., 2006), vancomicina (Kuroda, Kuwahara-Arai, and Hiramatsu 2000), antibióticos que afectan a la pared celular (Gardete et al., 2006; Kuroda et al., 2000; Levinger et al., 2012; Pietiäinen et al., 2009; Su et al., 2015) o daptomicina (Taglialegna et al., 2019). Además, diferentes estudios han mostrado que *S. aureus* utiliza VraRS para sobrevivir en el interior de la célula y así evadir el proceso de fagocitosis y el sistema inmune (Dai et al., 2019; Gao et al., 2019).

Nuestro estudio transcriptómico identificaba 87 genes cuya expresión se modificó en presencia de *VraR** (ver Anexo, Tabla 2). Ninguno de estos genes era regulado exclusivamente por este TCS. Algunos de los genes que forman parte del regulón de *VraR** son genes relacionados con la biogénesis celular (*sgtB*), el transporte y metabolismo de azúcares (*MW2356*), la modificación post-transcripcional (*MW1549*, *prsA*) y otros con función sin determinar (*MW0945*, *MW1601*, *MW1779*, *MW2357*, *MW2427*) y que ya habían sido descritos como genes regulados por *VraRS*. Los ensayos de proteómica nos permitieron obtener un regulón formado por 13 proteínas, de las cuales 9 activaron y 4 inhibieron su expresión (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO no mostraba procesos metabólicos enriquecidos en el regulón de *VraR**.

AgrCA

AgrCA es uno de los principales reguladores de genes de virulencia de *S. aureus*, facilitando la expresión de factores de adhesión cuándo está inactivo e induciendo la expresión de toxinas y otros factores de virulencia una vez las bacterias alcanzan el estado de quórum óptimo y el sistema se activa. El RR *AgrA* actúa sobre unos pocos promotores de forma directa, entre ellos el propio promotor del sistema. *AgrC* se activa por la unión de un péptido autoinductor codificado por el gen *agrD* que desencadena la cascada de transferencia de fosfato desde la HK al RR. La forma activa de *AgrA* puede unirse a su propio promotor (P2) pero también al promotor modificado P3 del efector *RNAIII*, un RNA regulador responsable de la mayoría de los cambios en la expresión de genes provocados por *AgrCA*. Las modulinas solubles en fenol (*psm*) también contienen en su promotor la secuencia consenso de unión de *AgrA* (Peschel and Otto, 2013; Queck et al., 2008).

Nuestro análisis indicaba que en presencia de *AgrA** 135 genes modificaban su expresión, de los cuales, solo 9 genes estaban regulados específicamente por este TCS (ver Anexo, Tablas 2, y 4). Entre los genes con mayores niveles de inducción se encuentran los genes de las toxinas *psm*, así como la δ -hemolisina (*hld*). Como *Hld* esta codificada dentro del transcrito de *RNAIII* se confirma, así, que la expresión de *AgrA** puede activar la expresión de los genes diana conocidos del sistema. Otros genes destacados cuya expresión se activaba en presencia de *AgrA** era el operón *bsaBG* relacionado con la biosíntesis de lantionina, un péptido antibiótico (Daly et al., 2010).

La activación de este operón no es exclusiva de AgrA* y también está bajo el control de otros TCSs como SrrA* y PhoP*.

Los resultados de proteómica mostraban la activación de 6 proteínas y la represión de 5 proteínas (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO indicaba que el proceso de biosíntesis de purinas estaba enriquecido en el regulón de AgrA* (ver Anexo, Tabla 8).

KdpDE

El TCS KdpDE regula la adquisición de potasio (Price-Whelan et al., 2013) (ver Capítulo III para más información).

Los resultados transcriptómicos mostraron que en presencia de KdpE* se alteraba la expresión de 327 genes (224 activados y 103 inhibidos), de los cuales 76 estaban regulados exclusivamente por KdpE* (ver Anexo, Tablas 2 y 4). Aquellos con mayor inducción de la expresión fueron los genes del sistema de transporte KdpABC, el gen de la lipasa 2 (*geh*), la biosíntesis de la cápsula y las proteínas de unión a fibrinógeno. Además, dos genes que codifican para sintetasas de ppGpp de la familia RelA/SpoT, RelPy MerT forman parte de los genes activados por el TCS. Por otro lado, se identificaron 24 proteínas cuya expresión se había alterado. Todos los cambios observados a nivel de proteínas siguen la misma dirección de los cambios transcriptómicos. Sin embargo, solo los genes en los que los niveles de cambio de expresión eran mayores resultaron en cambios en los niveles de expresión de la proteína correspondiente (ver Anexo, Tabla 7). Finalmente, el análisis de enriquecimiento de GO mostró que el principal proceso biológico enriquecido es el transporte del potasio (ver Anexo, Tabla 8).

HssRS

El hierro es un co-factor que las bacterias patógenas necesitan para establecer la infección. *S. aureus* adquiere iones de hierro a través del sistema de transporte que transporta al grupo hemo (grupo prostético donde se acumulan iones de hierro) al interior de la bacteria para ser utilizado como fuente de nutrientes. Sin embargo, la acumulación de grupos hemo en el interior de la bacteria puede resultar tóxica debido a la elevada reactividad de la molécula. Se ha demostrado que el TCS HssRS tiene un papel importante en la homeostasis y metabolismo de los grupos hemo. HssRS se activa en presencia de grupos hemo exógenos y controla la acumulación de este grupo

prostético mediante la activación de un sistema de flujo de salida (*hrtAB*) (Stauff et al., 2007; Torres et al., 2007).

El número de genes cuya expresión se modificó en presencia de HssR* fue de 202, de los cuales 138 y 64 vieron activada o inhibida su expresión, respectivamente. El número de genes regulados específicamente por este TCS resultaron ser 9 (ver Anexo, Tabla 2 y 4). La activación de la transcripción de *hrtAB* por HssRS ya se había descrito anteriormente pero nuestros resultados proveen de nuevos posibles genes dianas específicos de HssR* como *murA mvaK* y *mltR*.

Los datos de proteómica mostraron que un total de 12 proteínas (8 activadas y 4 inhibidas) sobrepasaron los límites de los criterios establecidos (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de enriquecimiento de GO no mostraba un enriquecimiento específico en ningún proceso biológico.

NreCB:

NreCB es un sistema detector de oxígeno que en condiciones de anaerobiosis regula, especialmente, la expresión de genes, relacionados con la reducción de nitrato y nitrito en la bacteria (Nilkens et al., 2014). NreA se ha descrito como receptor de nitrato e interviene también en la regulación de la fosforilación de NreB (Stehle et al., 2014).

La presencia de NreC* resultó con la modificación de un total de 236 genes, de los cuales la expresión se activó en 154 y se inhibió en 82. Solo 15 genes forman parte del regulón de genes específicos (ver Anexo, Tablas 2 y 4). A parte de algunos de los genes encargados de la reducción de nitratos (*narJ*, *narH*, *narI*) no encontramos más coincidencias entre nuestro regulón y otros ya descritos para NreCB (Schlag et al., 2008).

Por otro lado, de los datos proteómicos se pudo extraer que 23 proteínas estaban reguladas por este TCS (ver Anexo, Tabla 7). Como es lógico los procesos biológicos enriquecidos según el estudio de GO son los procesos de oxido-reducción y la asimilación de nitrógeno. Al igual que para muchos otros TCS en el grupo de genes inhibidos por NreC* la categoría de GO enriquecida fue la relacionada con la biosíntesis de IMP (ver Anexo, Tabla 8).

BraSR

BraSR es uno de los TCSs involucrados en la resistencia a péptidos antimicrobianos juntos con WalRK, VraRS y GraRS. BraSR parece ser esencial en la resistencia frente a bacitracina y nisina y su función está relacionada con la activación de los transportadores tipo ABC, BraDE y VraDE (Blake et al., 2011; Hiron et al., 2011; Kawada-Matsuo et al., 2013; Kolar et al., 2011; Matsuo et al., 2010; Randall et al., 2018; Yoshida et al., 2011).

La presencia de BraR* resultó en la activación de la expresión de 127 genes y en la inhibición de la expresión de 137. Los genes que forman el regulón específico de este TCS son 80 (ver Anexo, Tablas 2 y 4). Los resultados proteómicos mostraron que en esta cepa se produjo la modificación de la expresión de 19 proteínas (13 activadas y 6 inhibidas) (ver Anexo, Tabla 7). El análisis de GO mostró enriquecimiento de categorías como el catabolismo de la urea, la síntesis de purinas, la traducción de proteínas o el metabolismo de aminoácidos dentro de los genes inhibidos por BraR* (ver Anexo, Tabla 8).

CAPÍTULO III

*Papel de los sistemas de dos componentes en la especiación
del género Staphylococcus.*

Análisis comparativo de las colecciones de sistemas de dos componentes de *S. aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*.

El análisis comparativo de los genomas secuenciados de 12 especies de *Staphylococcus* mostraba que el grupo de dieciséis TCSs que contiene *S. aureus* está conservado entre otras especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos (CONS) como *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Sin embargo, *S. saprophyticus* que también pertenece al grupo de estafilococos coagulasa negativos (CONS) y cuyo genoma es solo 0.3 Mb más pequeño que el de *S. aureus*, solo presenta once TCSs (Tabla 1)(Gumerov et al., 2019; Kuroda et al., 2005). *S. saprophyticus* es el segundo patógeno más frecuente responsable de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad (UTI) en pacientes mujeres jóvenes o de mediana edad, después de *Escherichia coli* (Flores-Mireles et al., 2015; Kline and Lewis, 2016). Es un habitante habitual del tracto urinario, región perineal, recto, uretra, cérvix o tracto gastrointestinal (Argemi et al., 2019). El número de tejidos y nichos que coloniza *S. saprophyticus* y el conjunto de infecciones que provoca es reducido en comparación con *S. aureus*, lo que indica que emplea unas estrategias de infección más especializadas (Rosenstein and Götz, 2013). Esta circunstancia nos llevó a plantearnos si los TCSs que están ausentes en el genoma de *S. saprophyticus* con respecto al genoma de *S. aureus* podrían estar relacionados con el espectro reducido de ambientes que esta bacteria es capaz de colonizar y discutir las consecuencias que esto puede tener para la bacteria.

Tabla 1. TCS en *S. aureus* y *S. saprophyticus*.

TCS	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Function
<i>walRK</i>	MW0018 MW0019	SSP0021 SSP0022	Cell wall maintenance, cell viability
<i>hptSR</i>	MW0198 MW0199		Intracellular survival, uptake of hexose phosphate
<i>lytSR</i>	MW0236 MW0237	SSP0463 SSP0464	Autolysis, eDNA release, biofilm
<i>graRS</i>	MW0621 MW0622	SSP2061 SSP2062	AMPs resistance, growth at low pH
<i>saeSR</i>	MW0667 MW0668		Virulence factors regulation (toxins, exoenzymes...)
<i>tcs7SR</i>	MW1208 MW1209	SSP1446 SSP1547	Uncharacterized function
<i>arlSR</i>	MW1304 MW1305	SSP1323 SSP1324	Pathogenesis mechanisms: autolysis, adhesion, biofilm...
<i>srrBA</i>	MW1445 MW1446	SSP1260 SSP1261	Anaerobic respiration metabolism, growth at low temperature
<i>phoRP</i>	MW1636 MW1637	SSP1073 SSP1074	Phosphate uptake and homeostasis
<i>airRS</i>	MW1789 MW1790	SSP0946 SSP0947	Oxydative stress response
<i>vraRS</i>	MW1824 MW1825	SSP0908 SSP0909	Cell wall affecting antibiotics resistance, biosynthesis,
<i>agrCA</i>	MW1962 MW1963	SSP0839 SSP0840	Quorum sensing and virulence factors
<i>kdpDE</i>	MW2002 MW2003		Potassium homeostasis regulation
<i>hssRS</i>	MW2282 MW2283	SSP0540 SSP0541	Heme metabolisms regulation
<i>nreCB</i>	MW2313 MW2314		Response to low oxygen, nitrates reduction
<i>braSR</i>	MW2544 MW2545		Antimicrobial peptides resistance

KdpDE

S. aureus se caracteriza por tener la capacidad para crecer en condiciones de alta concentración de Na⁺ y baja actividad de agua para tratarse de una bacteria no halófila (Graham and Wilkinson, 1992). Esta osmotolerancia le permite colonizar eficazmente ambientes con altas concentraciones de sal como la piel humana. El potasio es un ion monovalente muy abundante, necesario para mantener el pH, el potencial de la membrana y la presión osmótica. La concentración intracelular de potasio en células de *S. aureus* se mantiene alta (0.5-1.5 M) incluso cuando los ambientes no presentan una elevada osmolaridad, gracias a dos sistemas de adquisición de potasio específicos: el sistema inducible Kdp y el sistema constitutivo Ktr (Gründling, 2013). El sistema Kdp es un sistema inducible que requiere la presencia del TCS KdpDE, el cual se activa en condiciones de alta osmolaridad y se inhibe a través del mensajero secundario c-di-AMP (Moscoso et al., 2016). Ante la activación de KdpDE, los genes que experimentan

mayores cambios en los niveles de expresión son los genes del operón KdpFABC, responsables de la adquisición de K^+ , genes relacionados con la adquisición de azúcares, con la biosíntesis de la cápsula o con el metabolismo de aminoácidos Fig. 1)(Price-Whelan et al., 2013). En condiciones de baja concentración de K^+ , el sistema KdpFABC juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología de la bacteria (Price-Whelan et al., 2013). Sin embargo, en condiciones de alta concentración de K^+ , es el sistema Ktr, cuya expresión es constitutiva y que presenta baja afinidad por el K^+ , el encargado de su transporte (Gries et al., 2013). El análisis de cepas mutantes en los sistemas Kdp y Ktr reveló que el sistema Ktr es el principal sistema de adquisición de K^+ en *S. aureus* y que la actividad de Kdp se limita a condiciones de muy baja concentración de K^+ y/o en situaciones en las que las concentraciones de los iones son muy cambiantes. Sin embargo, la adquisición de K^+ en condiciones limitantes de K^+ juega un papel importante durante el proceso de infección de *S. aureus* (Freeman et al., 2013). Por ello, algunas cepas MRSA contienen una segunda copia del sistema *KdpDE* en el elemento móvil SSCmec (David and Daum, 2010). Se ha descrito la presencia de un homólogo de *KdpDE* en el elemento móvil catabólico de arginina (arginine catabolic mobil element, ACME) en algunas cepas de *S. epidermidis* (McManus et al., 2019; O'Connor et al., 2018). Algunas de las cepas de *S. epidermidis* que contienen este homólogo de *Kdp* en el elemento ACME han perdido su copia cromosómica del TCS *KdpDE*, probablemente para evitar posibles interferencias entre ambos sistemas.

Figura 1. Sistemas de dos componentes ausentes en *S. saprophyticus* y sus funciones principales. Cinco de los dieciséis TCS de *S. aureus* no están presentes en el genoma de *S. saprophyticus*. HptSR responde a fosfatos extracelulares y activa la expresión del transportador de glucosa-6-fosfato UhpT, pero también puede facilitar la salida del antibiótico fosfomicina. SaeSR controla la expresión y secreción de toxinas y factores involucrados en de evasión del sistema inmune por parte de la bacteria o la lisis de eritrocitos y leucocitos. KdpDE está asociado con el control de un sistema de adquisición de potasio (KdpFABC) necesario para el crecimiento en condiciones muy deficientes en potasio. El TCS es inhibido por el c-di-AMP e iones de potasio y puede activarse en condiciones de alta osmolaridad. NreCB está involucrado en la reducción de nitratos en nitritos y finalmente en óxido nítrico. El sistema se activa bajo condiciones de anaerobiosis y puede ser inhibido por NreA. BraSR regula la respuesta bacteriana frente a péptidos antimicrobianos como bacitracina y nisin.

S. saprophyticus necesita afrontar grandes variaciones en la concentración de iones en la orina sin la ayuda del sistema KdpDE. La osmotolerancia de *S. saprophyticus* se basa en la actividad de Ktr y en otros sistemas de transporte osmoprotectores como la prolina/betaina, glicina-betaina/colina y la permeasa de prolina (Fig. 2) (Kuroda et al., 2005). Debido a que las concentraciones de K^+ en la orina son generalmente elevadas parece lógico que el sistema Ktr sea suficiente para la adquisición de K^+ de la bacteria y que la presencia de un sistema de alta afinidad

Environmental signals				
Potassium	Host signals	Molecular oxygen	Antimicrobial peptides	Phospho-hexoses
KdpDE	SaeSR	NreCB	BraSR	HptSR
Potassium homeostasis regulation	Virulence and pathogenesis response	Fermentative anaerobic respiration	Bacitracin resistance mechanism	Intracellular survival
Potassium transport (<i>kdpFABC</i>) capsule metabolism (<i>cap5a</i>)	Exoproteins (<i>coa</i> , <i>fnbA</i> , <i>efb</i> , <i>lukM</i> , <i>lukF</i> , <i>sbi</i> , <i>hlgA</i> ...)	Nitrate (<i>narJ</i> , <i>narH</i> , <i>narI</i>) and nitrite reductases (<i>nirB</i> <i>nirD</i>)	ABC transporters (<i>braDE</i> , <i>vraDE</i>)	sugar transporter (<i>uhpT</i>)
Potassium transporter (<i>ctr</i> homologous) Osmoprotectant transporters (<i>proP</i> , <i>putP</i>)	Adhesion proteins (<i>ssp</i> , <i>uafA</i> , <i>uafB</i> , <i>sdr</i>)	Ammonium transporter and urease Nitrate reductase in subsp. <i>bovis</i>	GraRS	

SaeSR

131

en la evasión del sistema inmune mediante la inactivación del complemento, inhibición de la opsonización o del reclutamiento de neutrófilos en el foco de infección (Brown et al., 2013; Foster et al., 2014). Los estudios en modelos murinos de infección intraperitoneal indican que las cepas mutantes en SaeSR presentan una menor mortalidad y una menor adherencia a los pulmones y células epiteliales (Giraud et al., 1999; Liang et al., 2006). *S. saprophyticus* se caracteriza por infectar de forma casi exclusiva el epitelio del tracto urinario y por tanto la mayoría de los factores de virulencia regulados por SaeSR no parecen imprescindibles para que *S. saprophyticus* pueda colonizar y sobrevivir de forma eficaz en el hombre. En su lugar, *S. saprophyticus* necesita un sistema eficaz de adherencia a las células epiteliales de la vejiga y uréteres. Para ello, produce una serie de adhesinas específicas como la hemaglutinina Aas, la lipasa Ssp, que forma apéndices superficiales tipo fimbria, y las proteínas UafA, UafB, SssF y SdrI (Fig. 2) (Kuroda et al., 2005; O'Connor et al., 2018). UafA es una adhesina exclusiva de *S. saprophyticus* que media la adherencia a las células de la vejiga y la hemaglutinación. UfaB es una glicoproteína rica en serinas codificada desde plásmidos que permite la unión a proteínas como el fibrinógeno o la fibronectina y a células epiteliales de la vejiga. SssF también está localizada en plásmidos y es una proteína asociada a la membrana con gran prevalencia entre aislados clínicos de *S. saprophyticus*. La presencia de esta proteína se ha asociado a la resistencia frente al ácido linoleico (componente del sistema inmune innato de la piel en humanos), por ello se ha propuesto que esta proteína juega un papel importante en la supervivencia de la bacteria en la piel de los uréteres (de Paiva-Santos et al., 2018). Por último, SdrI es una proteína de membrana, rica en residuos de serina y ácido aspártico y que permite la unión al colágeno. Esta proteína está codificada desde plásmidos y juega un papel importante durante infecciones urinarias agudas e infecciones persistentes en riñones (Kline et al., 2010).

Otra característica particular de la uropatogenicidad de *S. saprophyticus* es la presencia de desaminasas de D-serina responsables de la degradación de este aminoácido, presente en concentraciones elevadas en la orina (Sakinç et al., 2009).

Aunque todavía no se conoce mucho sobre la regulación de la expresión de todos estos factores de colonización por parte de *S. saprophyticus*, las evidencias existentes indican que su expresión no está integrada bajo el control de un único TCS. En su lugar parece que *S. saprophyticus* ha optado por controlar la expresión de estos factores de forma individual para establecer una respuesta rápida de adaptación y

crecer en un medio, como es la orina, rico en metabolitos y con unos importantes cambios de flujo.

NreCB

En condiciones de baja concentración de oxígeno, *S. aureus* puede utilizar el nitrato o el nitrito en lugar del oxígeno como aceptor final de la cadena respiratoria. NreCB es un TCS que activa la expresión de un grupo de genes necesarios para la reducción del nitrato (*narJHGI*) y la reducción del nitrito (*nirRBD*) en respuesta a la presencia de oxígeno (Fig. 1) (Nilkens et al., 2014; Schlag et al., 2008). La activación de NreCB está controlada por la proteína sensora NreA, la cual inhibe la autofosforilación de la HK, NreB, uniéndose directamente a esta en ausencia de nitrato (Nilkens et al., 2014). La inactivación de NreCB impide a *S. aureus* llevar a cabo la reducción del nitrato y fuerza a la bacteria a activar vías fermentativas del metabolismo para poder asegurar su supervivencia. Los genes *nreCB* se transcriben junto con los genes de las enzimas nitrato reductasas (*narGHJI*) formando un operón que se localizan inmediatamente detrás de los genes que codifican para las nitrito reductasas (*nirRBD*). Localizado junto a estos operones se encuentra el gen que codifica para el transportador de nitrógeno (*narT*). Esta organización en el genoma sugiere que *nreCB* forma parte de un bloque de genes en el que todos ellos codifican para proteínas implicadas en la reducción de nitrato y nitrito que se han adquirido a través de transferencia horizontal. *S. saprophyticus* no es capaz de utilizar el nitrato o el nitrito como último aceptor de electrones ya que no presenta nitrato reductasas (*narGHJI*) ni nitrito reductasas asimilatorias (*nirRBD*). En consecuencia, tampoco contiene el TCS NreCB. Sin embargo, el análisis de los genomas de distintas subespecies de *S. saprophyticus* muestra que cepas de la subespecie bovis (*S. saprophyticus* subsp bovis), contiene en lo que podría constituir un transposon, el TCS NreCB y genes de enzimas nitrato reductasas pero no de nitrito reductasas. *S. saprophyticus* subsp bovis es un colonizador habitual de las fosas nasales de las vacas (Hájek et al., 1996).

Una consecuencia de la actividad de las enzimas nitrato reductasas es la generación de iones de amonio, que permiten la asimilación del nitrógeno a una forma orgánica. *S. saprophyticus* produce una potente enzima con actividad ureasa (uno de los principales factores de virulencia de estas bacterias), que le permite obtener iones de amonio a partir de la urea presente en la orina (Fig. 2). Esta actividad ureasa es significativamente más elevada en *S. saprophyticus* que en otras especies de

Staphylococcus, y es necesaria para la producción de infecciones urinarias persistentes (Gatermann et al., 1989). Una consecuencia de la actividad de la ureasa y la producción de amonio es el aumento del pH en la orina humana, lo que favorece la precipitación de iones de carbono, solubles en condiciones normales. Estos compuestos pueden agregar alrededor de la bacteria y provocar la formación de cálculos renales.

BraSR

BraSR está asociado a la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos de nisina y bacitracina (Blake et al., 2011; Falord et al., 2011; Hiron et al., 2011; Matsuo et al., 2010). BraSR forma un módulo con el transportador tipo ABC BraDE. Este transportador está implicado en la transferencia de fosfato entre la HK y RR de BraSR (Randall et al., 2018). El TCS y el transportador BraDE cooperan mutuamente para poder detectar la señal y responder a ella (Coates-Brown et al., 2018). BraSR también activa la expresión de VraDE, otro transportador tipo ABC asociado al TCS GraSR (Fig. 1).

BraSR no está presente en otras especies de estafilococos como *S. saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudointermedius*, entre otros (Coates-Brown et al., 2018). La ausencia de este TCS en *S. saprophyticus* podría estar compensada por la actividad del TCS ortólogo GraRS. De hecho, experimentos de evolución de *S. saprophyticus* en presencia de concentraciones crecientes de nisina han demostrado que GraRS juega un papel importante en la resistencia a este AMP (Coates-Brown et al., 2018).

En *S. aureus* la activación de GraRS induce la activación de expresión de genes como *mprF* y el operón *dltABCD*. El operón *dltABCD* contribuye a mantener una carga neta positiva en la superficie de la bacteria mediante la incorporación de residuos de D-alanina a los ácidos teicoicos de la pared celular. Por su parte, MprF añade residuos cargados positivamente de lisina a las moléculas de fosfatidil glicerol de la membrana celular (Yang et al., 2012). De esta forma se asume que el mecanismo de resistencia a péptidos antimicrobianos en *S. saprophyticus* requeriría la activación de los genes *mprF* y el operon *dltABCD* por parte de GraSR (Fig. 2). Esta hipótesis no ha sido probada experimentalmente.

HptSR

HptSR es necesario para la detección de hexosas-fosfato y para activar la transcripción del gen *uhpT*, localizado inmediatamente detrás del gen *hptSR*, y que codifica para el único transportador de glucosa 6-fosfato en *S. aureus* (Fig. 1) (Park et al., 2015). UhpT es también responsable del transporte del antibiótico Fosfomicina (Xu et al., 2017). Tradicionalmente se ha catalogado a *S. aureus* como un patógeno extracelular. Sin embargo, *S. aureus* es capaz de multiplicarse en el interior de células del hospedador, como los macrófagos, para evadir al sistema inmune o disminuir su exposición a antibióticos (Jorch et al., 2019; Rollin et al., 2017; Rowe et al., 2020). Al igual que otros patógenos intracelulares para sobrevivir y multiplicarse en el interior de las células del hospedador, *S. aureus* necesita adaptarse a este nuevo ambiente con diferentes condiciones fisiológicas de pH, temperatura o disponibilidad de oxígeno y al tipo de nutrientes disponibles (Chico-Calero et al., 2002).

Las hexosas fosfato son la principal fuente de carbono presentes en el citosol de las células del hospedador, de modo que el TCS *hptSR* es muy importante para la supervivencia y división de *S. aureus* durante su vida intracelular (Fig. 2). Así, cepas de *S. aureus* mutantes en este TCS mostraron deficiencias en su capacidad para multiplicarse intracelularmente (Park et al., 2015).

S. saprophyticus es un patógeno extracelular que presenta gran capacidad de adhesión a diferentes líneas celulares epiteliales. Recientemente se ha descrito que *S. saprophyticus* es capaz de internalizarse en líneas celulares de carcinoma de vejiga aunque no hay evidencias que este proceso ocurra *in vivo* (Park et al., 2015). Como *S. saprophyticus* carece del sistema HptSR-UhpT, la adquisición de hexosas fosfato tendría que producirse en esta bacteria por un mecanismo alternativo, para permitir la replicación de la bacteria en el interior del citoplasma de las células del hospedador.

El sistema HptSR está formado por un grupo de cuatro genes adyacentes en el genoma de *S. aureus*. La complementación de *S. saprophyticus* con este grupo de cuatro genes permitiría demostrar si el sistema HptSR es suficiente para conferir a *S. saprophyticus* la capacidad para replicarse en el interior de las células del hospedador.

Transducción de TCSs en *S. saprophyticus*

La ausencia de cinco TCSs en el genoma de *S. saprophyticus* con respecto a *S. aureus* y otras especies de estafilococos puede deberse a que *S. saprophyticus* ha perdido a lo largo de la evolución los TCSs que eran prescindibles en el ambiente en el que se desarrolla. Alternativamente, también es posible que las demás especies de estafilococos fueran adquiriendo nuevos TCSs para adaptar su crecimiento a otras condiciones ambientales. En el caso de que *S. saprophyticus* haya perdido los TCS, es posible que la introducción de los TCSs todavía fuese capaz de modificar la expresión de ciertos genes de su genoma. Para responder a esta hipótesis, la cepa de *S. saprophyticus* ATCC15305 fue complementada con los sistemas SaeSR, NreCB y BraSR a través de un proceso de transducción. Para ello se utilizó una cepa de *S. saprophyticus* que contenía una versión del fago $\phi 11$ de *S. aureus* capaz de llevar a cabo la transferencia de material genético desde la cepa de *S. aureus* RN4220 a la cepa *S. saprophyticus* ATCC15305. La variante del fago $\phi 11$ tenía un marcador de resistencia a eritromicina y, por tanto, los experimentos de transducción para seleccionar bacterias portadoras del fago debían hacerse en presencia de este antibiótico. En los experimentos previos, los TCSs se habían expresado desde el plásmido pCN51, que también confiere resistencia a eritromicina. Para solucionar este problema se construyó una versión del plásmido pCN51 (pCN38:P_{cad}:TT) pero con resistencia a cloranfenicol (Cam). De esta forma la expresión de las proteínas estaba bajo el control del mismo promotor (P_{cad}, sin inducir) y se podían producir cantidades similares de las proteínas tanto en *S. aureus* como en *S. saprophyticus* (Fig. 3).

Figura 3. Control de la expresión del TCS NreCB de *S. aureus* en *S. saprophyticus*. Imagen representativa de western-blot en la que se muestra la expresión de las proteínas NreC marcadas con el epítipo 3xFLAG. *S. aureus* se transformó con los plásmidos pCN51 y pCN38:P_{cad}:TT que expresaban el TCS NreCB donde, NreC había sido marcada en el extremo carboxilo terminal con el epítipo 3xFLAG para su detección. La expresión de la proteína desde ambos plásmidos era similar. Los niveles de expresión de la proteína obtenidos desde *S. saprophyticus* eran comparables con los obtenidos desde *S. aureus*. Las bacterias crecieron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.8, las proteínas se detectaron con un anticuerpo comercial anti-3xFLAG. Como control de cargar se muestra una porción del gel (stain-free).

Análisis transcripcional de *S. saprophyticus* expresando SaeSR, NreCB y BraSR de *S. aureus*

Las cepas de *S. saprophyticus* ATCC15305 que sobreexpresaban los TCSs SaeSR, NreCB y BraSR se seleccionaron para estudiar los posibles cambios en los niveles de expresión global. El objetivo era comprobar si la introducción de estos TCSs de *S. aureus* en *S. saprophyticus* era capaz de inducir cambios transcriptómicos. Tanto las muestras de ARN, la secuenciación, como el análisis de los datos se llevaron a cabo de manera similar a experimentos anteriores. Se consideraron como significativos cambios en los niveles de expresión de genes superiores a dos veces con un valor P de significancia estadística ajustada menor a 0.05. El análisis transcriptómico demostraba que los TCSs se estaban expresando en *S. saprophyticus* (Fig. 4). Sin embargo, con los criterios de significación que habíamos establecido, no se pudo seleccionar ningún gen que cumpliera ambos criterios en la cepa que expresaba SaeSR. Esto podía deberse a que, con algunas excepciones (*sodM*, *opuBA*, *fnbB* y *SSP1996*), la mayoría de los genes del regulón de SaeSR no tienen un homólogo en el genoma de *S. saprophyticus*. En el caso de NreCB, los principales genes inducidos en *S. aureus* corresponden a los genes implicados en la reducción del nitrato y nitrito (*narJHGI* y *nirRBD*). Como estos genes no están presentes en *S. saprophyticus*, la alteración de su expresión no se podía detectar. En el caso de genes regulados por NreCB en *S. aureus* y que están presentes en el genoma de *S. saprophyticus* (*rsml*, *plsY*, *spoVG*, *SSP2012*, *SS1134*), no se detectaron modificaciones significativas de sus niveles de expresión. Por último, la mayoría de los genes del regulón de BraSR están presentes en el genoma de *S. saprophyticus*. Sin embargo, únicamente la expresión de *agrD*, que no forma parte del regulón de BraSR en *S. aureus*, se ve significativamente modificada al sobreexpresar el TCS. En *S. aureus* este TCS participa en la resistencia de la bacteria frente a AMPs como bacitracina y nisina junto con otros TCSs como GraRS y VraRS. Ensayos evolutivos de *S. saprophyticus* demostraron experimentalmente que la resistencia a nisina aumentaba en las cepas evolucionadas debido a mutaciones en GraS (Coates-Brown et al., 2018). GraRS contribuye así en la resistencia frente a nisina asumiendo el papel que BraSR lleva a cabo en otras bacterias como *S. aureus*. Por tanto, es posible que en *S. saprophyticus* la regulación de los genes diana de BraSR ya se encuentre bajo el control de otro TCS como es GraRS y por ello no podamos observar cambios en los niveles de transcripción.

Figura 4. Mapas de las lecturas de RNA-Seq de *S. saprophyticus*. Imágenes que muestran la distribución de las lecturas de los operones de (SaeSR, NreCB y BraSR) expresados en *S. saprophyticus*. Los mapas se obtuvieron con el programa CGL Genomics y se modificaron con Adobe Illustrator CS5. En la imagen se muestra una representación esquemática de diferentes regiones del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2. Las flechas en color verde representan los ORFs de las HKs y RRs, las flechas azules corresponden con las ORFs de los genes contiguos al operón. Los alineamientos de los paneles corresponden desde arriba hacia abajo con: *S. saprophyticus* ATCC15305 con el plásmido pCN38 (plásmido vacío como control), pCN38::TCS (expresando la pareja de HK y RR de los TCSs estudiados en cada caso).

CAPÍTULO IV

Desarrollo de anticuerpos frente a la histidina quinasa Walk

Elaboración de anticuerpos frente a walk

Durante el proceso de infección *S. aureus* necesita detectar las condiciones presentes en los tejidos del hospedador y adaptar su fisiología a las mismas. Varios TCSs juegan un papel importante en este proceso, ya que su ausencia disminuye la virulencia de la bacteria. Además, los TCSs no presentan homólogos en las células de mamíferos y en algunos casos, como WalRK, son esenciales para el crecimiento bacteriano. Es por esto que, en el campo de las nuevas terapias frente a *S. aureus*, la inhibición de la actividad de los TCS se considere una estrategia terapéutica con mucho potencial. Con el objetivo de desarrollar una terapia alternativa frente a *S. aureus* que tenga como diana de acción los TCS, decidimos utilizar anticuerpos que bloqueasen la actividad de una HK. En concreto, la HK seleccionada ha sido Walk ya que es la HK del único TCS esencial en *S. aureus*. Dentro de la proteína Walk, elegimos como región de reconocimiento de los anticuerpos el dominio de unión de ligando (LBD) de Walk, por tratarse de una región extracelular que reconoce la(s) señal(es) detectadas por la HK y por tanto es el punto de inicio de la cascada de señalización. Además, el hecho de que se trate de una región extracelular facilita la interacción/unión con los anticuerpos.

Ante la infección por *S. aureus*, el sistema inmune del hospedador activa una respuesta humoral con anticuerpos frente a diferentes antígenos de la bacteria (Selle et al., 2016). Dado que, nuestras estrategias dirigidas a Walk se iban a basar en la producción de anticuerpos frente al LBD de la proteína, decidimos analizar si hay una respuesta humoral frente a esta región de la proteína Walk en pacientes que han tenido infección por *S. aureus*. Para ello, en colaboración con el servicio de microbiología de la Clínica Universidad de Navarra, recogimos una colección de sueros de pacientes que habían sufrido infección por *S. aureus* relacionada con implantes médicos (Tabla 1). La proteína recombinante Walk_LBD producida en *E. coli* se incubó junto con los sueros de los pacientes. Los resultados mostraron la presencia de IgG que reconocían el antígeno Walk_LBD en el suero de dos de los pacientes estudiados (Fig. 1). Estos resultados indicaban que esta región de Walk es reconocida por el sistema inmune e induce una respuesta en los pacientes infectados apoyando nuestra hipótesis de que anticuerpos contra esta región de la proteína podrían facilitar la acción del sistema inmune y bloquear el desarrollo de la bacteria durante la infección.

Tabla 1. Sueros pacientes

Número Identificación	Cultivo	Tipo de Muestras	Lugar de Prótesis
5	<i>S. aureus</i>	Catéter	Vía Central
11	<i>S. aureus</i>	Prótesis	Rodilla
12	<i>S. aureus</i>	Prótesis	Rodilla
23	<i>S. aureus</i> MRSA	Catéter	Vía Central
24	<i>S. aureus</i>	Catéter	Vía Central
26	<i>S. aureus</i>	Prótesis	Cadera
28	<i>S. aureus</i>	Catéter	Vía Central
39	<i>S. aureus</i>	Catéter	Vía Central

Fig.1. Presencia de anticuerpos frente a Walk_LBD en suero de pacientes infectados. Imagen representativa del wWestern-blot realizado con la proteína Walk_LBD frente a sueros de pacientes con infección por *S. aureus*. 15 µg de la proteína recombinante se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15% de acrilamida. Tiras de la membrana de nitrocelulosa se incubaron con los diferentes sueros (1:1000). Como control negativo se utilizó el suero de un individuo sano. La presencia de IgG humanas se detectó con el anticuerpo, KPL-peroxidase labeled anti human IgG (1:5000). Como control positivo de la técnica una tira de membrana se incubó con el anticuerpo anti-histidinas (HRP-conjugated anti-his tag) con el que está marcada la proteína.

Como primera aproximación decidimos generar anticuerpos monoclonales. En colaboración con la *Unidad de Herramientas Proteicas* del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se produjeron anticuerpos monoclonales frente a Walk_LBD. En el laboratorio realizamos las tareas de cribado de los clones candidatos para la producción final del anticuerpo. Por otro lado y en colaboración con el grupo de investigación *Ingeniería de bacterias para aplicaciones biomédicas* se llevó a cabo la producción de los nanoanticuerpos. La familia de los camélidos produce anticuerpos diferentes al resto de los mamíferos. Estos anticuerpos no contienen cadenas ligeras y se caracterizan por presentar únicamente dos cadenas pesadas. Cada una de las cadenas pesadas contiene un dominio variable (VHH) y un dominio constante (CH). El dominio VHH está formado a su vez por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) flanqueadas por cuatro regiones FR. El dominio VHH es la fracción mínima funcional de unión a antígeno de los anticuerpos de cadena pesada y se conoce como nanoanticuerpo cuando se obtiene de forma recombinante. El uso de estos nanoanticuerpos en terapia está cada vez más extendido debido a las ventajas que presentan: (i) facilidad para generar extensas librerías de nanoanticuerpos; (ii)

facilidad para manipulación genética debido a su único dominio; (iii) facilidad de producción desde sistemas microbiológicos como *E. coli* a partir de plásmidos que permiten la secreción del nanoanticuerpo al espacio periplásmico; (iv) alta estabilidad y solubilidad; (v) pequeño tamaño, lo que facilita su capacidad para penetrar en tejidos y reconocer antígenos de difícil acceso; y (vi) rápida eliminación del organismo y baja respuesta inmunogénica (Harmsen and De Haard, 2007).

En nuestro caso, tras la inmunización de los dromedarios con la proteína recombinante, se amplificaron las secuencias de las correspondientes regiones VHH y se elaboró la librería para la selección de aquellos clones que reconocían de forma específica la proteína. Como control de la diversidad de la librería se procedió a la secuenciación de diferentes clones para comprobar que las secuencias de reconocimiento y por tanto los epítomos que reconocían en la proteína eran diferentes entre los distintos clones. Después se seleccionaron los clones con mayor afinidad por Walk_LBD mediante técnicas de enriquecimiento (MACS o FACS) y se construyeron los plásmidos para la producción y purificación de los nanoanticuerpos en células de *E. coli* (Salema and Fernández, 2017).

Tanto en el caso de los anticuerpos monoclonales como en el caso de los nanoanticuerpos producidos frente a Walk_LBD, se comprobó que eran capaces de reconocer el péptido Walk_LBD recombinante de forma específica (Fig. 2). En el caso de los nanoanticuerpos, debido a que se trata de péptidos sencillos marcados con diferentes epítomos (cola de histidinas y c-myc), se pudo analizar su capacidad para reconocer la proteína *in vivo*, es decir en su forma nativa expresada en la superficie de la bacteria (Fig. 2). Los resultados de los experimentos de inmunoprecipitación de los complejos bacteria-nanoanticuerpo mostraron que solo en el caso del nanoanticuerpo nAB::Walk.2 se observaba interacción con la proteína expresada por la bacteria. Esto puede ser debido a que el epítomo reconocido por este nanoanticuerpo se encuentra más expuesto en la conformación natural de la HK o que la afinidad del resto de los nanoanticuerpos era menor.

Fig.2. Interacción de los anticuerpos con la proteína Walk_LBD. Imágenes representativas de western-blot. **A.** Reconocimiento del péptido LBD de Walk por parte del anticuerpo monoclonal. Se analizaron diferentes diluciones del anticuerpo (1:500 y 1:1000). Como control negativo se utilizó un anticuerpo obtenido frente a un antígeno diferente sin relación con la bacteria. **B.** Reconocimiento del péptido LBD de Walk por parte de los nanoanticuerpos purificados. Para la detección de los nanoanticuerpos se utilizó el anticuerpo anti-c-myc (1:1000, Sigma). Como control negativo se utilizó un nanoanticuerpo que reconoce EGFR. Como controles positivo y negativo de la técnica, se incubaron tiras de la membrana con el anticuerpo anti-His (control negativo) y con el anticuerpo anti-c-myc (control positivo). **C.** Reconocimiento de Walk *in vivo*. Imagen representativa de la inmunoprecipitación realizada con la cepa de *S. aureus* MW2 y los diferentes nanoanticuerpos producidos. Los nanoanticuerpos ($0.05 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$) se incubaron con el cultivo bacteriano ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 5$) durante 2 h a 4°C en agitación suave. Como control, se preparó una muestra sin nanoanticuerpos y una con el nAB::EGFR. Para la detección de los inmuno-complejos se utilizó el anticuerpo anti-histidinas. Únicamente en el caso del nAB::Walk.2 se pudo observar una interacción entre el nanoanticuerpo y la proteína Walk en su forma nativa en la bacteria.

Análisis de la actividad de los anticuerpos

Con objeto de estudiar el efecto del anticuerpo monoclonal y los nanoanticuerpos sobre la actividad de la HK, primero analizamos si su presencia afectaba al crecimiento de la bacteria durante la curva de crecimiento. Los resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal no modificaba el tiempo de generación de la bacteria, ni la fase de latencia. Sin embargo, en el caso de los nanoanticuerpos, sorprendentemente su presencia favorecería el crecimiento bacteriano, reduciendo el tiempo en el que las bacterias alcanzaban la fase exponencial del crecimiento (Fig. 3).

Fig.3. Efecto de los anticuerpos sobre el crecimiento bacteriano. Curvas de crecimiento en presencia de los diferentes nanoanticuerpos (1:4). Los datos representados son la media y SD de tres experimentos independientes. La adición de los nanoanticuerpos disminuyó el tiempo en el que las bacterias alcanzaron la fase exponencial del crecimiento. El programa GraphPad 5.01 se utilizó para analizar y representar los resultados.

Para analizar si este aumento de crecimiento obedecía a una activación de la actividad de WalRK, se midió la actividad autolisina de cultivos de bacterias incubados con el anticuerpo. En condiciones estándar el sistema WalRK activa la expresión de diferentes autolisinas (*atl*, *lytM*) como parte del proceso de regulación del metabolismo de la pared celular durante la división de la bacteria. La actividad de estas proteínas se puede inducir en presencia del detergente Triton X-100 (0.1%). Nuestra hipótesis era que si la interacción de los nanoanticuerpos con la región sensora de WalK estaba activando la cascada de señalización de este TCS, deberíamos observar un incremento en el fenotipo de autólisis similar al que se produce con la adición del Triton X-100. La incubación de *S. aureus* MW2 con los diferentes nanoanticuerpos o con el Triton X-100 como control de la inducción de la autólisis mostraba un aumento de la autólisis con respecto a la muestra control (sin tratamiento). Tras tres horas de incubación, la densidad del cultivo (DO₆₀₀) descendía un 12% más en el caso de las bacterias incubadas con el nanoanticuerpo que en las muestras no tratadas (Fig. 4). No obstante, este incremento en la autólisis, era mucho más pronunciado en el caso del tratamiento con Triton X-100 donde se llegan a alcanzar porcentajes de autólisis del 70%. Por tanto, estos resultados sugieren que el

nanoanticuerpo es capaz de interaccionar y activar al sistema WalRK, pero el efecto de esta interacción es contrario a lo esperado. En lugar de inhibir la cascada de señalización, provoca una activación de la misma. La activación de WalRK por los nanoanticuerpos podría tener algún valor terapéutico, si la activación del sistema facilita la inactivación de la bacteria en presencia de antibióticos. Hay que tener en cuenta que determinados antibióticos, como por ejemplo los betalactámicos, necesitan que la bacteria se este multiplicando para ejercer su función.

Fig.4. Efecto de los nanoanticuerpos sobre la actividad de WalK. Representación del porcentaje de autólisis de cultivos de *S. aureus* en presencia de los nanoanticuerpos. Cultivos de las bacterias se recogieron en fase estacionaria, se lavaron y se resuspendieron en buffer Tris-HCl (0.05 M, pH = 7.2). La autólisis se activó añadiendo Triton X-100 al 0.1%. Los nanoanticuerpos se añadieron durante el crecimiento bacteriano (500 μ l). La lisis de las bacterias se determinó midiendo la DO_{600nm} de las muestras cada 30min.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las bacterias detectan y responden a cambios en las condiciones ambientales a través de los sistemas transducción de señal de dos componentes. Las bacterias de vida libre pueden contener docenas de TCSs. El número de TCSs es proporcional al tamaño del genoma, la diversidad de nichos en los que la bacteria habita y a la complejidad de la diferenciación celular (Galperin, 2005). Gracias al esfuerzo de muchos grupos de investigación, actualmente tenemos un conocimiento detallado sobre los mecanismos moleculares que subyacen en la transmisión de la señal desde que es detectada por la HK hasta que llega al RR en el citoplasma de la célula. Tenemos también una información detallada acerca del conjunto de genes regulados por distintos TCSs, especialmente en bacterias patógenas (Beier and Gross, 2006; Büttner and Bonas, 2010; Francis et al., 2017; Gómez-Mejía et al., 2018; Gooderham and Hancock, 2009; Haag and Bagnoli, 2017). Sin embargo, toda esta información se ha acumulado gracias a estudios que han sido realizados utilizando la cepa con la que habitualmente trabajaba ese laboratorio, en las condiciones de crecimiento habituales de ese laboratorio y de forma general, cada investigación se centraba en el análisis de un único TCS. Como consecuencia, aunque la información disponible para ciertos TCSs es muy extensa, no en todos los casos es una información comparable. La razón por la que los laboratorios se han centrado en el estudio de TCS individuales se debe a dificultades técnicas para modificar varios TCSs simultáneamente en una misma bacteria. Las aproximaciones individuales, aunque facilitan la comprensión de los resultados, también tienen sus limitaciones porque no permiten afrontar preguntas generales sobre el funcionamiento del sistema sensorial de TCS en su conjunto como, por ejemplo, (i) qué grado de solapamiento existe entre los regulones de distintos TCS de una misma bacteria, (ii) cuáles son los genes que son regulados específicamente por cada uno de los TCS en ausencia de interferencias de los otros sistemas, (iii) qué porcentaje del genoma de la bacteria está dedicado a responder a estímulos ambientales, (iv) qué rutas metabólicas basales necesitan ser activadas para permitir la adaptación a estímulos ambientales distintos, y (v) cuál es el grado de aislamiento de cada TCS con respecto a los demás. En este trabajo hemos realizado un análisis sistemático funcional de la red sensorial de TCSs de una bacteria en una misma condición ambiental. Como es muy poco probable que en esta condición ambiental las señales de activación de cada uno de los sistemas estén presentes, nuestra aproximación ha incluido la complementación con TCSs constitutivamente activos que

han sido introducidos de forma individual en una bacteria en la que previamente hemos eliminado todos los TCS no esenciales y que contiene un único TCS esencial.

La primera comparación que nos planteamos fue analizar la eficacia de activación de la cascada de señalización de la forma nativa de los TCSs y de la forma fosfomimética de los RRs. Nuestros resultados indican que el nivel de activación de los regulones obtenidos con cada aproximación es muy diferente, siendo muy inferior en el caso de la complementación con la forma nativa de los TCSs. Existen evidencias que indican que la sobreexpresión con la forma nativa de un TCS imita la forma activa del mismo, probablemente porque el aumento en la cantidad de las proteínas facilita la acumulación del RR fosforilado. La acumulación del RR fosforilado puede deberse a la fosforilación por la HK canónica, la fosforilación por otras HKs no canónicas (cross-talk) o a la actividad de proteínas donadoras de fosfato o quinasas alternativas (Ser/Thr quinasas). El nivel de fosforilación de los RRs también depende de la actividad fosfatasa de la HK canónica. Esta actividad fosfatasa es necesaria para apagar el sistema una vez que la señal ambiental no está presente. Por tanto, es posible, que en las condiciones de crecimiento en las que se recogieron las muestras de ARN para el análisis transcriptómico, la complementación con la forma nativa de los TCSs no llegase a producir una activación completa de la cascada de señalización. En el caso de los RR*, como no son susceptibles a la defosforilación desde sus HKs canónicas y están activos de forma constitutiva, la activación de la ruta de señalización es completa. A pesar del reducido número de genes que se activaban en las cepas complementadas por el TCS salvaje, la complementación restauraba el fenotipo asociado a dicho TCS, indicando que la complementación era biológicamente relevante. Paradójicamente, en el caso de las cepas complementadas con los RRs* donde el número de genes activados es mucho mayor, la complementación de los fenotipos asociados a cada TCS era inesperadamente menos eficaz, al menos para algunos TCSs. Una explicación para este fenotipo es que, el exceso de activación de la vía de señalización resulta perjudicial para la bacteria. Estos resultados ponen en evidencia un aspecto que es importante resaltar respecto a los umbrales que arbitrariamente se establecen para determinar los cambios en los niveles de expresión que se consideran significativos en los experimentos ómicos (Dalman et al., 2012; Zhao et al., 2018). Es muy probable que muchos de los cambios de expresión causados por la activación del TCS a pesar de ser biológicamente relevantes no superen el umbral de significación exigido y por tanto no se detecten en experimentos

ómicos a no ser que se provoque una activación no fisiológica de la ruta de señalización.

Otro aspecto que es importante señalar respecto a la utilización de la forma fosfomimética de los RR*, es que para algunos TCSs se ha descrito que la forma no fosforilada del RR también tiene actividad reguladora (Inieta and Shapiro, 2008; Latasa et al., 2012). Lógicamente, en nuestra aproximación los genes regulados por la forma no fosforilada del RR no han podido ser identificados. Esta es una de las líneas de investigación que nos gustaría desarrollar en un futuro proyecto, explorar los genes regulados por las formas no fosforiladas de los RRs de *S. aureus* usando la misma estrategia de complementación de la cepa de *S. aureus* que solo contiene el TCS WalRK con variantes no fosforilables de los RR.

La mayoría de los RRs ejercen la regulación de los genes diana a través de su unión a las regiones promotoras, lo que afecta al reclutamiento del complejo de la ARN-polimerasa y la activación o inhibición de la transcripción (Gao and Stock, 2015). Nuestros resultados indican que un porcentaje importante de genes resultó afectado por la presencia de varios RRs*, lo que confirma la necesidad de analizar el regulón de cada TCS en ausencia del resto de los TCSs para, así, diferenciar inequívocamente los genes regulados específicamente por cada TCS y evitar que genes que son activados por más de un TCS no sean detectados debido a la presencia de otros TCSs que también activan su expresión. El tamaño de los regulones es muy variable, lo que indica que la adaptación a diferentes estímulos exige la participación de un número de genes diferente. Tampoco podemos descartar que haya TCSs que detecten y respondan a una única señal mientras que otros TCSs pueden integrar diferentes señales y regular cambios en el estilo de vida de la bacteria de forma más sofisticada. El regulón más pequeño corresponde a HptR* y afecta a un solo gen, *uhpT*, el cual se encuentra aguas abajo de los genes del TCS y se transcribe en dirección opuesta (Park et al., 2015). Este TCS ha permanecido aislado de otras vías de regulación tras su incorporación al genoma por transferencia horizontal (Capra and Laub, 2012). Una situación similar nos encontramos en LytR* (Eric W. Brunskill and Bayles, 1996). Los resultados del regulón de LytR* muestran que la principal actividad reguladora de este TCS está dirigida al operón localizado aguas abajo, *lrgAB*. De nuevo, estos resultados sugieren que el TCS y el operón *lrgAB* forman un módulo que se ha transmitido unido a lo largo del proceso evolutivo (E W Brunskill and Bayles, 1996). Sin embargo, a diferencia de HptR*, el regulón de LytR* no se ha mantenido aislado, ya

que SrrB* también afecta a la expresión de *lrgAB*. A medida que el número de genes que forman los diferentes regulones aumenta, la posibilidad de que los genes estén regulados por más de un TCS también es mayor. Nuestros resultados indican que el solapamiento entre los regulones de mayor tamaño varía desde un 24% (para PhoRP y KdpDE) hasta un 65% (para HssRS y NreCB). Un ejemplo de este solapamiento entre los diferentes regulones es el grupo de genes regulados por al menos la mitad de los TCSs de *S. aureus*. Esta regulación de la expresión de genes por varios TCSs sugiere que la adaptación a diferentes condiciones ambientales requiere la modificación de funciones básicas del metabolismo central bacteriano y que por tanto podrían ser utilizados como potenciales dianas, para combatir infecciones producidas por *S. aureus*. Es importante señalar que la co-regulación de estas vías no se podría haber detectado en estrategias basadas en el análisis de sistemas individuales porque la presencia del resto de los TCSs habría mantenido activadas las vías en ausencia de un TCS concreto. La existencia de genes comunes en regulones de diferentes TCSs no significa que la regulación por el RR sea directa, también es posible que distintos RR regulen la expresión de un regulador común y que sea este regulador el que reconoce la región promotora de estos genes y afecta a la transcripción de los mismos. Una pregunta que se genera con el grupo de genes que son regulados por muchos TCSs es si los promotores de estos genes contienen secuencias de reconocimiento específicas para cada uno de ellos o si, por el contrario, existen secuencias que son reconocidas por varios RRs. En muchos casos, se ha propuesto la secuencia de unión al ADN de un RR y esta secuencia parece específica de ese RR en particular. Sin embargo, no siempre los resultados de distintos estudios coinciden en la misma secuencia de reconocimiento para un RR (Crosby et al., 2019; Ouyang et al., 2019) y en muchos casos la secuencia no se identifica en la región promotora de genes que están regulados por ese RR, lo cual plantea dudas sobre la necesidad de una secuencia consenso específica para el reconocimiento de cada RR. Este es otro aspecto que deberá ser investigado en un futuro proyecto.

Como conclusión, una parte importante de esta tesis ha sido dedicada a realizar el primer análisis de la red sensorial completa de TCSs en una bacteria utilizando una aproximación reduccionista donde hemos evaluado la contribución de cada TCS de forma individual en una cepa bacteriana y en una única condición de crecimiento. La principal ventaja de esta estrategia sobre los estudios realizados previamente es que permite la identificación de especificidades y similitudes de los regulones de cada TCS

sin interferencias por parte del resto de miembros de la familia de proteínas de señalización. En nuestra opinión, estos resultados tendrán un enorme valor no sólo para entender la biología de este importante patógeno sino también para identificar nuevas dianas para el desarrollo de terapias frente a *S. aureus*.

El número de TCSs que presentan los genomas de las bacterias varía de unas especies a otras y se correlaciona con la diversidad de ambientes en los que habita la bacteria. De este modo, bacterias con capacidad de desarrollarse en nichos diferentes contienen un número mayor de TCSs en comparación con bacterias que viven en hábitats más constantes.

La adquisición de nuevos TCSs se produce a través de dos mecanismos, la duplicación o la transferencia horizontal de genes. Cuando la adquisición de un nuevo sistema se produce por duplicación de un sistema existente, es necesario que las proteínas vayan acumulando paulatinamente cambios que los distingan de los TCSs presentes en la bacteria tanto a nivel de la señal que detectan como del conjunto de genes a los que afectan, pero siempre preservando la interacción específica entre la HK y RR canónicos. Este proceso debe ocurrir con cierta rapidez para que el TCS facilite la adaptación de la bacteria a una nueva condición ambiental y se fije en el genoma bacteriano. De lo contrario acumularía mutaciones y se perdería.

En este contexto, en el tercer capítulo hemos realizado un análisis comparativo de las redes de TCSs de dos especies cercanas, *S. aureus* y *S. saprophyticus*, para contrastar si la presencia/ausencia de los TCS nos podría ayudar a entender por qué una especie es capaz de colonizar numerosos nichos y producir una gran diversidad de infecciones mientras que otra tiene una distribución y patogenicidad más restringida. Los análisis comparativos de genomas basados en la presencia/ausencia de genes ortólogos se han utilizado con éxito para entender la ecología de las especies bacterianas (Coates-Brown et al., 2018; Suzuki et al., 2012). Nuestro análisis sugiere que simplemente el número de TCS no es suficiente para explicar por qué *S. aureus* tiene una mayor capacidad patogénica, ya que otras especies de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* y *S. pseudointermedius*) contienen en su genoma un número de TCS similar al del genoma de *S. aureus* y sin embargo su capacidad patogénica es inferior a la de *S. saprophyticus*. Nuestros resultados indican que con excepción de HptSR, donde no parece que *S. saprophyticus* cuente con un sistema de transporte de hexosas alternativo, para el resto de los TCSs ausentes en *S.*

saprophyticus, la bacteria parece disponer de rutas metabólicas alternativas que le permiten adaptarse a las condiciones del ambiente en el que habita. Una pregunta para la que todavía no tenemos respuesta es si la bacteria ancestral en esta familia contenía dieciséis TCSs y *S. saprophyticus* ha sufrido la pérdida de genes prescindibles en el ambiente en el que habita y la reducción de su genoma durante el proceso evolutivo o si, por el contrario, la bacteria ancestral contenía un número menor de TCSs y *S. saprophyticus* a diferencia de otras especies de estafilococos no ha experimentado la ganancia de ningún nuevo TCS.

Con objeto de explorar la hipótesis de que *S. saprophyticus* haya perdido los TCSs durante su adaptación al nicho ambiental en el que se desarrolla, complementamos una cepa de *S. saprophyticus* con tres de estos TCSs y analizamos los cambios que ocasiona en el transcriptoma de la bacteria. La complementación de *S. saprophyticus* con los tres TCSs de *S. aureus* no ocasionó cambios detectables en el transcriptoma de la bacteria. Estos resultados pueden deberse a que los genes del regulón se encuentran bajo el control de otro TCS y/o a que el nivel de activación conseguido con la complementación no ha sido suficiente para superar el umbral establecido. Para descartar esta segunda hipótesis sería interesante realizar la complementación con las formas fosfomiméticas de cada uno de los RR. De esta forma garantizaríamos que la activación de la expresión de los genes de la ruta de señalización es la máxima posible. Otra posibilidad es que el TCS necesite ser adquirido junto con un paquete de genes que son necesarios para conferir la adaptación. Un ejemplo con el que podríamos comprobar esta hipótesis de forma experimental es el sistema HptSR. La complementación de *S. saprophyticus* con los cuatro genes que forman el sistema HptSR-UhpT debería ser suficiente para conferir la capacidad para transportar hexosas fosfato cuando la bacteria se encuentra en el citoplasma de la célula huésped si nuestra hipótesis es correcta y *S. saprophyticus* debería adquirir la capacidad para sobrevivir en el interior de las células del hospedador y esto, a su vez, debería llevar asociado un incremento en la resistencia a la fosfomicina de esta bacteria. Finalmente, sería interesante analizar si los TCSs que son comunes a *S. aureus* y *S. saprophyticus* regulan el mismo grupo de genes en ambas bacterias y en respuesta a los mismos estímulos. Los mecanismos por los que las bacterias ganan y/o pierden TCS se han determinado teóricamente pero hasta el momento no hay pruebas experimentales que demuestren estos fenómenos. Por tanto, la puesta en marcha de experimentos a largo plazo que permitan a las bacterias ganar una capacidad selectiva mediante la

adquisición o pérdida de un TCS podrían ayudar a entender cómo la adaptación a diferentes nichos ha ocurrido a lo largo del proceso evolutivo.

La presencia de cepas de *S. aureus* multi-resistentes es cada vez más frecuente en el ambiente hospitalario, y existe un consenso mundial sobre la necesidad de desarrollar nuevas terapias complementarias a los tratamientos antibióticos clásicos. Las terapias alternativas que se están contemplando incluyen moléculas y/o estrategias como: (i) uso de enzimas: endolisinas (producidas por fagos), degradadoras de biofilms (lisostafina, dispersina-B), nucleasas (Belyansky et al., 2011; Donelli et al., 2007; Haddad Kashani et al., 2018); (ii) péptidos antimicrobianos (AMPs), sintéticos (SMAMPs) o de origen natural como las bacteriocinas (Ghosh et al., 2019); (iii) oligonucleótidos recombinantes para silenciar genes de resistencia a antibióticos o esenciales para el crecimiento bacteriano (Meng et al., 2015; Sully and Geller, 2016); (iv) agentes inmunomoduladores dirigidos al hospedador (Chiang et al., 2018); (v) probióticos o los trasplantes fecales (FMT) (Isolauro et al., 2002; Wilson et al., 2019); (vi) mezclas de fagos capaces de infectar y destruir bacterias (Kortright et al., 2019; Krom et al., 2015; Oechslin et al., 2017); (vii) nanopartículas para recubrimiento de superficies en implantes médicos (Kwon et al., 2017; Wang et al., 2017); (viii) anticuerpos monoclonales: diseñados frente a toxinas, factores de virulencia, proteínas de superficie (Badarau et al., 2016; Raafat et al., 2019; Rouha et al., 2015) y (ix) herramientas CRISPR capaces de provocar la rotura del cromosoma bacteriano (Bikard et al., 2014, 2013).

En general, muchas de estas terapias no convencionales tienen como diana de acción mecanismos de virulencia de la bacteria, formación de biofilms o comunicación entre bacterias (quorum sensing). Los TCSs son unas potenciales diana terapéuticas muy interesantes porque además de tener un papel fundamental en la adaptación de la bacteria para vivir en distintas condiciones ambientales, incluidas las que se dan durante el proceso de infección, no existen homólogos de estas proteínas en células de mamíferos.

En el cuarto capítulo hemos explorado la posibilidad de utilizar los TCSs de *S. aureus* como diana de acción de dos terapias alternativas basadas en inmunoterapias. El resultado preliminar que nos animó a desarrollar esta estrategia fue la presencia en suero de pacientes que habían sufrido una infección por *S. aureus* de anticuerpos que reaccionaban frente a la región sensora de la HK Walk. Esto nos hizo pensar que esta

región es inmunogénica y que estos anticuerpos juegan un papel en la respuesta protectora que genera nuestro organismo frente a la infección. Para investigar esta hipótesis hemos desarrollado dos estrategias terapéuticas distintas: anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos.

El clon del anticuerpo monoclonal seleccionado era capaz de reconocer la región sensora de WalK, sin embargo no afectaba al crecimiento de la bacteria. Pensamos que esto podía deberse a que su tamaño le impedía introducirse entre el peptidoglicano e interactuar con la diana, por lo que en una segunda fase desarrollamos nanoanticuerpos generados en camélidos frente a la misma región de WalK. Los nanoanticuerpos seleccionados, en lugar de bloquear el crecimiento de la bacteria, lo favorecían. Este resultado es inesperado, pero también es cierto que desconocíamos el efecto que la unión del nanoanticuerpo podía tener sobre la activación o inhibición de la actividad de WalK, que recordamos es la HK del único TCS esencial de *S. aureus*. Una alternativa que nos gustaría explorar es si la inducción del crecimiento provocada por los nanoanticuerpos puede incrementar el efecto bactericida de antibióticos. Muchos antibióticos (penicilinas) necesitan que la bacteria crezca para que la molécula tenga un efecto antimicrobiano. El hecho de que el nanoanticuerpo provoque la activación del crecimiento de la bacteria podría favorecer su destrucción por algunos antibióticos. Finalmente, también deberíamos analizar el posible efecto de los nanoanticuerpos en modelos de infección experimental, donde el anticuerpo además de su posible interferencia en la cascada de regulación del WalRK podría actuar como vehículo para dirigir tratamientos alternativos hacia la bacteria.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El estudio de la red sensorial de TCS mediante la individualización de cada uno de los miembros en una cepa en la que previamente se han eliminado todos los TCS permite identificar inequívocamente la vía de señalización dependiente de cada TCS, sin interferencias con otros miembros de la red sensorial.

2. Tanto la sobreexpresión de la forma nativa de cada TCS como la forma fosfomimética de los RRs complementan eficazmente los fenotipos asociados a la ausencia de cada TCS y por tanto son estrategias eficaces para activar las vías de señalización de cada TCSs.

3. La complementación con la forma nativa de los TCSs causa la activación transcripcional de un número de genes muy inferior a la complementación con la forma fosfomimética del RR correspondiente. Una explicación a estos resultados es que los umbrales que arbitrariamente se establecen para seleccionar cambios de expresión significativos en experimentos de transcriptómica impiden la detección de cambios que son significativos desde el punto de vista biológico.

4. Hemos identificado el regulón, tanto a nivel transcriptómico como proteómico, de cada uno de los TCSs en una misma condición ambiental y en ausencia de interferencias entre TCSs. Aunque existe un solapamiento entre los regulones de los distintos TCSs, cada uno de ellos regula un grupo de genes que es específico y por tanto ningún TCS es sustituible por otro. El tamaño de los regulones es muy variado y oscila entre dos genes del regulón de HptR* a más de trescientos genes en el caso del regulón dependiente de PhoP*.

5. Hemos generado una colección con biosensores para cada uno de los TCSs. En el caso de los biosensores para SaeSR, ArlSR y SrrBA se ha comprobado que sus respectivos genes señalizadores *efb*, *mgrA* y *qox* son regulados única y exclusivamente por estos TCSs.

6. La ausencia de los TCSs HptSR SaeSR, KdpDE, NreCB y BraSR en *S. saprophyticus* con respecto a *S. aureus* puede explicar las diferencias en patogenicidad, capacidad de colonización de tejidos y estilo de vida que existen entre estas dos especies bacterianas.

7. Se han diseñado y desarrollado anticuerpos monoclonales y nanoanticuerpos dirigidos al sitio de unión a ligando de la HK del TCS esencial de *S. aureus*, WalRK. La interacción de los nanoanticuerpos con WalK provoca la activación del TCS.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Agrawal, R., Sahoo, B.K., Saini, D.K., 2016. Cross-talk and specificity in two-component signal transduction pathways. *Future Microbiol.* 11, 685–697. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0001>
- Al-Bassam, M.M., Bibb, M.J., Bush, M.J., Chandra, G., Buttner, M.J., 2014. Response Regulator Heterodimer Formation Controls a Key Stage in *Streptomyces* Development. *PLoS Genet.* 10, e1004554. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004554>
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S., Bourret, R.B., 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: Not necessarily a road less traveled. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80158-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80158-0)
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., Prévost, G., 2019. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
- Ashenberg, O., Keating, A.E., Laub, M.T., 2013. Helix bundle loops determine whether histidine kinases autophosphorylate in cis or in trans. *J. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.011>
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K.I., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K., 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819–1827. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08713-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08713-5)
- Badarau, A., Rouha, H., Malafa, S., Battles, M.B., Walker, L., Nielson, N., Dolezilkova, I., Teubenbacher, A., Banerjee, S., Maierhofer, B., Weber, S., Stulik, L., Logan, D.T., Welin, M., Mirkina, I., Pleban, C., Zauner, G., Gross, K., Jägerhofer, M., Magyarics, Z., Nagy, E., 2016. Context matters: The importance of dimerization-induced conformation of the LukGH leukocidin of *Staphylococcus aureus* for the generation of neutralizing antibodies. *MAbs* 8, 1347–1360. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1215791>
- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., Miller, S.I., 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>
- Bae, T., Banger, A.K., Wallace, A., Glass, E.M., Åslund, F., Schneewind, O., Missiakas, D.M., 2004. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12312–12317.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0404728101>
- Barakat, M., Ortet, P., Jourlin-Castelli, C., Ansaldi, M., Méjean, V., Whitworth, D.E., 2009. P2CS: A two-component system resource for prokaryotic signal transduction research. *BMC Genomics* 10, 315. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-315>
- Barbieri, C.M., Mack, T.R., Robinson, V.L., Miller, M.T., Stock, A.M., 2010. Regulation of response regulator autophosphorylation through interdomain contacts. *J. Biol. Chem.* 285, 32325–32335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157164>
- Batchelor, J.D., Sterling, H.J., Hong, E., Williams, E.R., Wemmer, D.E., 2009. Receiver Domains Control the Active-State Stoichiometry of Aquifex aeolicus σ 54 Activator NtrC4, as Revealed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mol. Biol.* 393, 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.033>
- Beier, D., Gross, R., 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.005>
- Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., Pancholi, V., 2009. Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect. Immun.* 77, 1406–1416. <https://doi.org/10.1128/IAI.01499-08>
- Belyansky, I., Tsirlina, V.B., Martin, T.R., Klima, D.A., Heath, J., Lincourt, A.E., Satishkumar, R., Vertegel, A., Heniford, B.T., 2011. The addition of lysostaphin dramatically improves survival, protects porcine biomes from infection, and improves graft tensile shear strength. *J. Surg. Res.* 171, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.04.014>
- Benton, B.M., Zhang, J.P., Bond, S., Pope, C., Christian, T., Lee, L., Winterberg, K.M., Schmid, M.B., Buysse, J.M., 2004a. Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 8478–8489. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8478-8489.2004>
- Benton, B.M., Zhang, J.P., Bond, S., Pope, C., Christian, T., Lee, L., Winterberg, K.M., Schmid, M.B., Buysse, J.M., 2004b. Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 8478–8489. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8478-8489.2004>
- Bijlsma, J.J.E., Groisman, E.A., 2003. Making informed decisions: Regulatory interactions

- between two-component systems. Trends Microbiol. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00176-8)
- Bikard, D., Euler, C.W., Jiang, W., Nussenzweig, P.M., Goldberg, G.W., Duportet, X., Fischetti, V.A., Marraffini, L.A., 2014. Exploiting CRISPR-cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nat. Biotechnol. 32, 1146–1150. <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., Marraffini, L.A., 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 41, 7429–7437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., Simon, M.I., 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. Cell 96, 131–41. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80966-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80966-6)
- Birkey, S.M., Liu, W., Zhang, X., Duggan, M.F., Hulett, F.M., 1998. Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. Mol. Microbiol. 30, 943–953. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01122.x>
- Blake, K.L., Randall, C.P., O'Neill, A.J., 2011. In vitro studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in *Staphylococcus aureus* and define a genetic basis for nisin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 2362–2368. <https://doi.org/10.1128/AAC.01077-10>
- Boll, J.M., Hendrixson, D.R., 2011. A specificity determinant for phosphorylation in a response regulator prevents in vivo cross-talk and modification by acetyl phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 20160–20165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113013108>
- Bonde, M., Højland, D.H., Kolmos, H.J., Kallipolitis, B.H., Klitgaard, J.K., 2011. Thioridazine affects transcription of genes involved in cell wall biosynthesis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 318, 168–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02255.x>
- Botella, E., Devine, S.K., Hubner, S., Salzberg, L.I., Gale, R.T., Brown, E.D., Link, H., Sauer, U.,

- Codée, J.D., Noone, D., Devine, K.M., 2014. PhoR autokinase activity is controlled by an intermediate in wall teichoic acid metabolism that is sensed by the intracellular PAS domain during the PhoPR-mediated phosphate limitation response of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 94, 1242–1259. <https://doi.org/10.1111/mmi.12833>
- Boyle-Vavra, S., Yin, S., Daum, R.S., 2006. The VraS/VraR two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00384.x>
- Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E., 2008. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
- Brown, A.F., Leech, J.M., Rogers, T.R., McLoughlin, R.M., 2013. *Staphylococcus aureus* colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00507>
- Brunskill, E W, Bayles, K.W., 1996. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 5810–2.
- Brunskill, Eric W., Bayles, K.W., 1996. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 611–618. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.611-618.1996>
- Burbulys, D., Trach, K.A., Hoch, J.A., 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545–552. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90238-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90238-T)
- Burdette, D.L., Vance, R.E., 2013. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.2491>
- Burgui, S., Gil, C., Solano, C., Lasa, I., Valle, J., 2018. A systematic evaluation of the two-component systems network reveals that ArlRS is a key regulator of catheter colonization by *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00342>
- Büttner, D., Bonas, U., 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>

- Cameron, D.R., Jiang, J.H., Kostoulas, X., Foxwell, D.J., Peleg, A.Y., 2016. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YycH activation of the WalRK essential two-component regulatory system. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep30823>
- Canova, M.J., Baronian, G., Brelle, S., Cohen-Gonsaud, M., Bischoff, M., Molle, V., 2014. A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* Vancomycin-resistance-associated response regulator VraR mediated by Stk1 protein phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.BBRC.2014.03.128>
- Capra, E.J., Laub, M.T., 2012a. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Capra, E.J., Laub, M.T., 2012b. The Evolution of Two-Component. *Annu Rev Microbiol.* 66, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>.The
- Capra, E.J., Perchuk, B.S., Ashenberg, O., Seid, C.A., Snow, H.R., Skerker, J.M., Laub, M.T., 2012a. Spatial tethering of kinases to their substrates relaxes evolutionary constraints on specificity. *Mol. Microbiol.* 86, 1393–1403. <https://doi.org/10.1111/mmi.12064>
- Capra, E.J., Perchuk, B.S., Skerker, J.M., Laub, M.T., 2012b. Adaptive mutations that prevent crosstalk enable the expansion of paralogous signaling protein families. *Cell* 150, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.033>
- Carpenter, B.M., West, A.L., Gancz, H., Servetas, S.L., Pich, O.Q., Gilbreath, J.J., Hallinger, D.R., Forsyth, M.H., Merrell, D.S., Michel, S.L.J., 2015. Crosstalk between the HpArsRS two-component system and HpNikR is necessary for maximal activation of urease transcription. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00558>
- Casino, P., Miguel-Romero, L., Marina, A., 2014. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat. Commun.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms4258>
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., Novick, R.P., 2004. Novel Cassette-based shuttle vector system for Gram-positive bacteria. *Appl. Environmental Microbiol.* 6076–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004>
- Chaudhuri, R.R., Allen, A.G., Owen, P.J., Shalom, G., Stone, K., Harrison, M., Burgis, T.A.,

- Lockyer, M., Garcia-Lara, J., Foster, S.J., Pleasance, S.J., Peters, S.E., Maskell, D.J., Charles, I.G., 2009. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). BMC Genomics 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-291>
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Yeaman, M.R., Xiong, Y.Q., Waring, A.J., Memmi, G., Donegan, N., Chaili, S., Yang, S.J., 2014. Site-specific mutation of the sensor kinase gras in *Staphylococcus aureus* alters the adaptive response to distinct cationic antimicrobial peptides. Infect. Immun. 82, 5336–5345. <https://doi.org/10.1128/IAI.02480-14>
- Chiang, C.Y., Uzoma, I., Moore, R.T., Gilbert, M., Duplantier, A.J., Panchal, R.G., 2018. Mitigating the impact of antibacterial drug resistance through host-directed therapies: Current progress, outlook, and challenges. MBio. <https://doi.org/10.1128/mBio.01932-17>
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, Werner, Glaser, P., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Buchrieser, C., Chakraborty, T., Charbit, A., Couvé, E., De Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Durand, L., Entian, K.D., Frangeul, L., Fsihi, H., Del Portillo, F.G., Garrido, P., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Kreft, J., Kunst, F., Mata-Vicente, J., Ng, E., Nordsiek, G., Pérez-Díaz, J.C., Remmel, B., Rose, M., Rusniok, C., Schluetter, T., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P., 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in Listeria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 431–436. <https://doi.org/10.1073/pnas.012363899>
- Coates-Brown, R., Moran, J.C., Pongchaikul, P., Darby, A.C., Horsburgh, M.J., 2018. Comparative genomics of *Staphylococcus* reveals determinants of speciation and diversification of antimicrobial defense. Front. Microbiol. 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02753>
- Cocchiaro, J.L., Gomez, M.I., Risley, A., Solinga, R., Sordelli, D.O., Lee, J.C., 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 59, 948–960. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04978.x>
- Commichau, F.M., Dickmanns, A., Gundlach, J., Ficner, R., Stülke, J., 2015. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. Mol. Microbiol. 97, 189–204. <https://doi.org/10.1111/mmi.13026>

- Commichau, F.M., Pietack, N., Stülke, J., 2013. Essential genes in *Bacillus subtilis*: A re-evaluation after ten years. *Mol. Biosyst.* <https://doi.org/10.1039/c3mb25595f>
- Conrath, K.E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frère, J.M., Kinne, J., Wyns, L., Muyldermans, S., 2001. β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2807–2812. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2807-2812.2001>
- Corrigan, R.M., Abbott, J.C., Burhenne, H., Kaeffer, V., Gründling, A., 2011. c-di-AMP Is a New Second Messenger in *Staphylococcus aureus* with a Role in Controlling Cell Size and Envelope Stress. *PLoS Pathog.* 7, e1002217. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002217>
- Corrigan, R.M., Bowman, L., Willis, A.R., Kaeffer, V., Gründling, A., 2015. Cross-talk between two nucleotide-signaling pathways in *staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 290, 5826–5839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598300>
- Corrigan, R.M., Foster, T.J., 2009. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.10.001>
- Corrigan, R.M., Gründling, A., 2013. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 513–524. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3069>
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Crosby, H.A., Schlievert, P.M., Merriman, J.A., King, J.M., Salgado-Pabón, W., Horswill, A.R., 2016. The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. *PLoS Pathog.* 12, 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005604>
- Crosby, H.A., Tiwari, N., Kwiecinski, J.M., Xu, Z., Dykstra, A., Jenul, C., Fuentes, E.J., Horswill, A.R., 2019. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA. *Mol. Microbiol.* mmi.14404. <https://doi.org/10.1111/mmi.14404>
- Cucarella, C., Tormo, M.Á., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, Í., Foster, T.J., Penadés, J.R., 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* 70, 3180–3186.

- <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3180-3186.2002>
- Cue, D., Junecko, J.M., Lei, M.G., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., Lee, C.Y., 2015. SaeRS-Dependent Inhibition of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Newman. PLoS One 10, e0123027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123027>
- Cui, L., Lian, J.Q., Neoh, H.M., Reyes, E., Hiramatsu, K., 2005. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3404–3413. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3404-3413.2005>
- Curtis, M.M., Russell, R., Moreira, C.G., Adebessin, A.M., Wang, C., Williams, N.S., Taussig, R., Stewart, D., Zimmermann, P., Lu, B., Prasad, R.N., Zhu, C., Rasko, D.A., Huntley, J.F., Falck, J.R., Sperandio, V., 2014. QseC inhibitors as an antivirulence approach for gram-negative pathogens. MBio 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.02165-14>
- Dai, Y., Gao, C., Chen, L., Chang, W., Yu, W., Ma, X., Li, J., 2019. Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Uses the *VraSR* Regulatory System to Modulate Autophagy for Increased Intracellular Survival in Macrophage-Like Cell Line RAW264.7. Front. Microbiol. 10, 1222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01222>
- Dalman, M.R., Deeter, A., Nimishakavi, G., Duan, Z.H., 2012. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. BMC Bioinformatics 13 Suppl 2, S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S2-S11>
- Daly, K.M., Upton, M., Sandiford, S.K., Draper, L.A., Wescombe, P.A., Jack, R.W., O'Connor, P.M., Rossney, A., Götz, F., Hill, C., Cotter, P.D., Ross, R.P., Tagg, J.R., 2010. Production of the Bsa lantibiotic by community-acquired *Staphylococcus aureus* strains. J. Bacteriol. 192, 1131–1142. <https://doi.org/10.1128/JB.01375-09>
- Darwin, A.J., Tyson, K.L., Busby, S.J.W., Stewart, V., 1997. Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. Mol. Microbiol. 25, 583–595. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4971855.x>
- David, M.Z., Daum, R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin. Microbiol. Rev. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>
- David, M.Z.M., Daum, R., R.S., 2017. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections, in:

- Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, pp. 325–383. <https://doi.org/10.1007/82>
- de Paiva-Santos, W., de Sousa, V.S., Giambiagi-deMarval, M., 2018. Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. Microb. Pathog. 119, 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.054>
- Débarbouillé, M., Dramsi, S., Dussurget, O., Nahori, M.A., Vaganay, E., Jouvion, G., Cozzzone, A., Msadek, T., Duclos, B., 2009. Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 191, 4070–4081. <https://doi.org/10.1128/JB.01813-08>
- Delauné, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., Leduc, A., Fitting, C., Nicolas, P., Cavaillon, J.-M., Adib-Conquy, M., Msadek, T., 2012. The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. Infect. Immun. 80, 3438–53. <https://doi.org/10.1128/IAI.00195-12>
- Didier, J.P., Cozzzone, A.J., Duclos, B., 2010. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 306, 30–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01930.x>
- Djordjevic, S., Goudreau, P.N., Xu, Q., Stock, A.M., West, A.H., 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 1381–1386. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1381>
- Donelli, G., Francolini, I., Romoli, D., Guaglianone, E., Piozzi, A., Ragunath, C., Kaplan, J.B., 2007. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2733–2740. <https://doi.org/10.1128/AAC.01249-06>
- Dutta, R., Qin, L., Inouye, M., 1999. Histidine kinases: Diversity of domain organization. Mol. Microbiol. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01646.x>
- Dworkin, J., 2015. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 24, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.005>
- Eymann, C., Becher, D., Bernhardt, J., Gronau, K., Klutzny, A., Hecker, M., 2007. Dynamics of protein phosphorylation on Ser/Thr/Tyr in *Bacillus subtilis*. Proteomics 7, 3509–3526. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700232>

- Falord, M., Karimova, G., Hiron, A., Msadeka, T., 2012. GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1047–1058. <https://doi.org/10.1128/AAC.05054-11>
- Falord, M., Mäder, U., Hiron, A., Débarbouillé, M., Msadek, T., Dbarbouillé, M., Msadek, T., 2011. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. *PLoS One* 6, e21323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021323>
- Feng, Y., Cronan, J.E., 2012. Crosstalk of *Escherichia coli* FadR with Global Regulators in Expression of Fatty Acid Transport Genes. *PLoS One* 7, e46275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046275>
- Fischer, A., Kambara, K., Meyer, H., Stenz, L., Bonetti, E.J., Girard, M., Lalk, M., Francois, P., Schrenzel, J., 2014. GdpS contributes to *Staphylococcus aureus* biofilm formation by regulation of eDNA release. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 284–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.10.010>
- Flannagan, R.S., Kuiack, R.C., McGavin, M.J., Heinrichs, D.E., 2018. *Staphylococcus aureus* uses the GraXRS regulatory system to sense and adapt to the acidified phagolysosome in macrophages. *MBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01143-18>
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J., 2015. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Foster, T.J., 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948–958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fournier, B., Hooper, D.C., 2000. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 3955–3964. <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.3955-3964.2000>
- Francis, V.I., Porter, S.L., 2019. Multikinase Networks: Two-Component Signaling Networks Integrating Multiple Stimuli. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 199–223.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115846>
- Francis, V.I., Stevenson, E.C., Porter, S.L., 2017. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 364. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX104>
- Freeman, Z.N., Dorus, S., Waterfield, N.R., 2013. The KdpD/KdpE Two-Component System: Integrating K⁺ Homeostasis and Virulence. PLoS Pathog. 9, e1003201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003201>
- Fridman, M., Williams, G.D., Muzamal, U., Hunter, H., Siu, K.W.M., Golemi-Kotra, D., 2013. Two Unique Phosphorylation-Driven Signaling Pathways Crosstalk in *Staphylococcus aureus* to Modulate the Cell-Wall Charge: Stk1/Stp1 Meets GraSR. Biochemistry 52, 7975–7986. <https://doi.org/10.1021/bi401177n>
- Gajdiss, M., Monk, I.R., Bertsche, U., Kienemund, J., Funk, T., Dietrich, A., Hort, M., Sib, E., Stinear, T.P., Bierbaum, G., 2020. YYCH and YYCI regulate expression of *Staphylococcus aureus* autolysins by activation of walrk phosphorylation. Microorganisms 8, 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060870>
- Galperin, M.Y., 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. BMC Microbiol. 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-35>
- Galperin, M.Y., Higdon, R., Kolker, E., 2010. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. Mol. Biosyst. 6, 721–728. <https://doi.org/10.1039/b908047c>
- Gao, C., Dai, Y., Chang, W., Fang, C., Wang, Z., Ma, X., 2019. VraSR has an important role in immune evasion of *Staphylococcus aureus* with low level vancomycin resistance. Microbes Infect. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2019.04.003>
- Gao, R., Stock, A.M., 2015. Temporal hierarchy of gene expression mediated by transcription factor binding affinity and activation dynamics. MBio 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00686-15>
- Gao, R., Tao, Y., Stock, A.M., 2008. System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. Mol. Microbiol. 69, 1358–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06355.x>

- Gardete, S., Wu, S.W., Gill, S., Tomasz, A., 2006. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3424–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-06>
- Gatermann, S., John, J., Marre, R., 1989. *Staphylococcus saprophyticus* urease: Characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. *Infect. Immun.* 57, 110–116. <https://doi.org/10.1128/iai.57.1.110-116.1989>
- Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., Schrenzel, J., Lalk, M., Wolz, C., 2012. The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathog.* 8, e1003016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003016>
- Geiger, T., Goerke, C., Mainiero, M., Kraus, D., Wolz, C., 2008. The virulence regulator sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* 190, 3419–3428. <https://doi.org/10.1128/JB.01927-07>
- Geisinger, E., Muir, T.W., Novick, R.P., 2009. agr receptor mutants reveal distinct modes of inhibition by staphylococcal autoinducing peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1216–1221. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807760106>
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., Halder, J., 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* 27, 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>
- Giraud, A.T., Calzolari, A., Cataldi, A.A., Bogni, C., Nagel, R., 1999. The sae locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00282-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00282-7)
- Giraud, A.T., Rampone, H., Calzolari, A., Nagel, R., 1996. Phenotypic characterization and virulence of a sae- agr- mutant of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* 42, 120–123. <https://doi.org/10.1139/m96-019>
- Giraud, A.T., Raspanti, C.G., Calzolari, A., Nagel, R., 1994. Characterization of a Tn 551 - mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* 40, 677–681. <https://doi.org/10.1139/m94-107>
- Goldmann, O., Medina, E., 2018. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 625–630.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.013>
- Gómez-Mejía, A., Gámez, G., Hammerschmidt, S., 2018. *Streptococcus pneumoniae* two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment. *Int. J. Med. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.012>
- Gooderham, W.J., Hancock, R.E.W., 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x>
- Gotoh, Y., Doi, A., Furuta, E., Dubrac, S., Ishizaki, Y., Okada, M., Igarashi, M., Misawa, N., Yoshikawa, H., Okajima, T., Msadek, T., Utsumi, R., 2010a. Novel antibacterial compounds specifically targeting the essential WalR response regulator. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 63, 127–134. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.4>
- Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., Utsumi, R., 2010b. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.008>
- Graham, J.E., Wilkinson, B.J., 1992. *Staphylococcus aureus* osmoregulation: Roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/jb.174.8.2711-2716.1992>
- Gries, C.M., Bose, J.L., Nuxoll, A.S., Fey, P.D., Bayles, K.W., 2013. The Ktr potassium transport system in *Staphylococcus aureus* and its role in cell physiology, antimicrobial resistance and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 89, 760–73. <https://doi.org/10.1111/mmi.12312>
- Gries, C.M., Bruger, E.L., Moormeier, D.E., Scherr, T.D., Waters, C.M., Kielian, T., 2016. Cyclic di-AMP released from *Staphylococcus aureus* biofilm induces a macrophage type I interferon response. *Infect. Immun.* 84, 3564–3574. <https://doi.org/10.1128/IAI.00447-16>
- Griffiths, J.M., O'Neill, A.J., 2012. Loss of function of the GdpP protein leads to joint β -lactam/ glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 579–581. <https://doi.org/10.1128/AAC.05148-11>
- Gründling, A., 2013. Potassium uptake systems in *Staphylococcus aureus*: New stories about ancient systems. *MBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00784-13>

- Gumerov, V.M., Ortega, D.R., Adebali, O., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., 2019. MiST 3.0: an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz988>
- Haag, A.F., Bagnoli, F., 2017. The role of Two-component Signal transduction Systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* https://doi.org/10.1007/82_2015_5019
- Haag, A.F., Wehmeier, S., Muszyński, A., Kerscher, B., Fletcher, V., Berry, S.H., Hold, G.L., Carlson, R.W., Ferguson, G.P., 2011. Biochemical characterization of *Sinorhizobium meliloti* mutants reveals gene products involved in the biosynthesis of the unusual lipid A very long-chain fatty acid. *J. Biol. Chem.* 286, 17455–17466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236356>
- Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E., Moniri, R., 2018. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Current status of research and novel delivery strategies. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.00071-17>
- Hájek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J., Freney, J., 1996. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. bovis subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 792–796. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-792>
- Hall, J.W., Yang, J., Guo, H., Ji, Y., 2017. The *Staphylococcus aureus* AirSR Two-Component System Mediates Reactive Oxygen Species Resistance via Transcriptional Regulation of Staphyloxanthin Production. *Infect. Immun.* 85. <https://doi.org/10.1128/IAI.00838-16>
- Hanssen, A.M., Ericson Sollid, J.U., 2006. SCCmec in staphylococci: Genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H.-G., Bierbaum, G., Schneider, T., Grein, F., 2017. The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 307, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.12.001>
- Harmsen, M.M., De Haard, H.J., 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13–22.

<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2>

- Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., Herrmann, M., 2005. *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology* 151, 1789–1800. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27902-0>
- Hellingwerf, K.J., Postma, P.W., Tommassen, J., Westerhoff, H. V., 1995. Signal transduction in bacteria: phospho-neural network(s) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 309–321. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00178.x>
- Hengge, R., 2016. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0498>
- Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Débarbouillé, M., Msadek, T., 2011. Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: A novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol. Microbiol.* 81, 602–622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07735.x>
- Holland, L.M., O'Donnell, S.T., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, L., Slater, S.R., Fey, P.D., Gomelsky, M., O'Gara, J.P., 2008. A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. *J. Bacteriol.* 190, 5178–89. <https://doi.org/10.1128/JB.00375-08>
- Howden, B.P., McEvoy, C.R.E., Allen, D.L., Chua, K., Gao, W., Harrison, P.F., Bell, J., Coombs, G., Bennett-Wood, V., Porter, J.L., Robins-Browne, R., Davies, J.K., Seemann, T., Stinear, T.P., 2011. Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog.* 7, e1002359. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002359>
- Igarashi, M., Watanabe, T., Hashida, T., Umekita, M., Hatano, M., Yanagida, Y., Kino, H., Kimura, T., Kinoshita, N., Inoue, K., Sawa, R., Nishimura, Y., Utsumi, R., Nomoto, A., 2013. Waldiomycin, a novel Walk-histidine kinase inhibitor from *Streptomyces* sp. MK844-mF10. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 66, 459–464. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.33>
- Inieta, A.A., Shapiro, L., 2008. A bacterial control circuit integrates polar localization and proteolysis of key regulatory proteins with a phospho-signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16602–16607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808807105>

- Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Salminen, S., 2002. Probiotics: A role in the treatment of intestinal infection and inflammation, in: Gut. BMJ Publishing Group, pp. iii54–iii59. https://doi.org/10.1136/gut.50.suppl_3.iii54
- Janczarek, M., Vinardell, J.M., Lipa, P., Karaś, M., 2018. Hanks-type serine/threonine protein kinases and phosphatases in bacteria: Roles in signaling and adaptation to various environments. Int. J. Mol. Sci. <https://doi.org/10.3390/ijms19102872>
- Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., Nagel, M., Clever, I., Bierbaum, G., 2007. Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 297, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.002>
- Jarick, M., Bertsche, U., Stahl, M., Schultz, D., Methling, K., Lalk, M., Stigloher, C., Steger, M., Schlosser, A., Ohlsen, K., 2018. The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. Sci. Rep. 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32109-7>
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C., 2017. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. Nat. Rev. Microbiol. 15, 271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- Jenkins, A., Diep, B.A., Mai, T.T., Vo, N.H., Warrenner, P., Suzich, J., Stover, C.K., Sellman, B.R., 2015. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. MBio 6, e02272-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02272-14>
- Jeong, D.-W., Cho, H., Jones, M.B., Shatzkes, K., Sun, F., Ji, Q., Liu, Q., Peterson, S.N., He, C., Bae, T., 2012. The auxiliary protein complex SaePQ activates the phosphatase activity of sensor kinase SaeS in the SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 86, 331–348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08198.x>
- Jones, R.N., 2008. Key considerations in the treatment of complicated staphylococcal infections. Clin. Microbiol. Infect. 14, 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01923.x>
- Jorch, S.K., Surewaard, B.G.J., Hossain, M., Peiseler, M., Deppermann, C., Deng, J., Bogoslawski, A., van der Wal, F., Omri, A., Hickey, M.J., Kubes, P., 2019. Peritoneal GATA6+ macrophages function as a portal for *Staphylococcus aureus* dissemination. J. Clin. Invest. 129, 4643–4656. <https://doi.org/10.1172/JCI127286>

- Kalantari, A., Derouiche, A., Shi, L., Mijakovic, I., 2015. Serine/threonine/tyrosine phosphorylation regulates DNA binding of bacterial transcriptional regulators. *Microbiol. (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000148>
- Karatan, E., Saulmon, M.M., Bunn, M.W., Ordal, G.W., 2001. Phosphorylation of the Response Regulator CheV Is Required for Adaptation to Attractants during *Bacillus subtilis* Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 276, 43618–43626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104955200>
- Kawada-Matsuo, M., Yoshida, Y., Zendo, T., Nagao, J., Oogai, Y., Nakamura, Y., Sonomoto, K., Nakamura, N., Komatsuzawa, H., 2013. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 8, e69455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069455>
- Kelliher, J.L., Radin, J.N., Grim, K.P., Párraga Solórzano, P.K., Degnan, P.H., Kehl-Fie, T.E., 2017. Acquisition of the Phosphate Transporter NptA Enhances *Staphylococcus aureus* Pathogenesis by Improving Phosphate Uptake in Divergent Environments. *Infect. Immun.* 86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00631-17>
- Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., Horswill, A.R., 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026714>
- Kinkel, T.L., Roux, C.M., Dunman, P.M., Fang, C., 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes 4, 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-13>.Editor
- Kline, K.A., Ingersoll, M.A., Nielsen, H. V., Sakinc, T., Henriques-Normark, B., Gatermann, S., Caparon, M.G., Hultgren, S.J., 2010. Characterization of a novel murine model of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infection reveals roles for Ssp and SdrI in virulence. *Infect. Immun.* 78, 1943–1951. <https://doi.org/10.1128/IAI.01235-09>
- Kline, K.A., Lewis, A.L., 2016. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract, in: *Urinary Tract Infections*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 459–502. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch19>

- Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev. 10, 505–20.
- Kolar, S.L., Nagarajan, V., Oszmiana, A., Rivera, F.E., Miller, H.K., Davenport, J.E., Riordan, J.T., Potempa, J., Barber, D.S., Koziel, J., Elasri, M.O., Shaw, L.N., 2011. NsaRS is a cell-envelope-stress-sensing two-component system of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 157, 2206–2219. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049692-0>
- Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E., 2019. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. Cell Host Microbe. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Kreiswirth, B.N., Löfdahl, S., Betley, M.J., O'reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., Novick, R.P., 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature 305, 709–712. <https://doi.org/10.1038/305709a0>
- Krom, R.J., Bhargava, P., Lobritz, M.A., Collins, J.J., 2015. Engineered Phagemids for Nonlytic, Targeted Antibacterial Therapies. Nano Lett. 15, 4808–4813. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01943>
- Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L., Hiramatsu, K., 2007. Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. FEMS Microbiol. Lett. 268, 98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00568.x>
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K., Hiramatsu, K., 2000. Identification of the Up- and Down-Regulated Genes in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Mu3 and Mu50 by cDNA Differential Hybridization Method. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269, 485–490. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.2277>
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Kobayashi, N., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K.I., Nagai, Y., Lian, J.Q., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R.I., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357, 1225–1240.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)

- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M., Ohta, T., 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13272–13277. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502950102>
- Kwiecinski, J.M., Crosby, H.A., Valotteau, C., Nayak, M.K., Chauhan, A.K., Dufrêne, Y.F., Horswill, A.R., 2019. Inhibition of *Staphylococcus aureus* endovascular infections through regulation of giant surface proteins. *PLoS Pathog.*
- Kwon, E.J., Skalak, M., Bertucci, A., Braun, G., Ricci, F., Ruoslahti, E., Sailor, M.J., Bhatia, S.N., 2017. Porous Silicon Nanoparticle Delivery of Tandem Peptide Anti-Infectives for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *Adv. Mater.* 29, 1701527. <https://doi.org/10.1002/adma.201701527>
- Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., García-del Portillo, F., Solano, C., Lasa, I., 2012. *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J. Bacteriol.* 194, 3708–3722. <https://doi.org/10.1128/JB.00361-12>
- Laub, M.T., Goulian, M., 2007. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* 41, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>
- Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M.E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., Molle, V., 2012. A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 43607–43619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418913>
- Lévine, A., Vannier, F., Absalon, C., Kuhn, L., Jackson, P., Scrivener, E., Labas, V., Vinh, J., Courtney, P., Garin, J., Séror, S.J., 2006. Analysis of the dynamic *Bacillus subtilis* Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes. *Proteomics* 6, 2157–2173. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500352>
- Levinger, O., Bikels-Goshen, T., Landau, E., Fichman, M., Shapira, R., 2012. Epigallocatechin gallate induces upregulation of the two-component VraSR system by evoking a cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7954–9.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.02253-12>
- Li, M., Cha, D.J., Lai, Y., Villaruz, A.E., Sturdevant, D.E., Otto, M., 2007. The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 66, 1136–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05986.x>
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y., 2006a. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74, 4655–4665. <https://doi.org/10.1128/IAI.00322-06>
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y., 2006b. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74, 4655–4665. <https://doi.org/10.1128/IAI.00322-06>
- Liebeke, M., Meyer, H., Donat, S., Ohlsen, K., Lalk, M., 2010. A metabolomic view of *Staphylococcus aureus* and its ser/thr kinase and phosphatase deletion mutants: Involvement in cell wall biosynthesis. *Chem. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.012>
- Liu, Q., Yeo, W.S., Bae, T., 2016. The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)*. 7. <https://doi.org/10.3390/genes7100081>
- Luo, Y., Helmann, J.D., 2012. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* σ^M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Mol. Microbiol.* 83, 623–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07953.x>
- Mainiero, M., Goerke, C., Geiger, T., Gonser, C., Herbert, S., Wolz, C., 2010. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J. Bacteriol.* 192, 613–23. <https://doi.org/10.1128/JB.01242-09>
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G., 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases 70.
- Matsuo, M., Kato, F., Oogai, Y., Kawai, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., 2010. Distinct two-component systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* can change the susceptibility to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dkq141>

- McManus, B.A., O'Connor, A.M., Egan, S.A., Flanagan, P.R., Coleman, D.C., 2019. First description of arginine catabolic mobile element (ACME) type VI harboring the kdp operon only in *Staphylococcus epidermidis* using short and long read whole genome sequencing: Further evidence of ACME diversity. *Infect. Genet. Evol.* 71, 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.008>
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F., Cheung, A., 2007. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2679–2689. <https://doi.org/10.1128/AAC.00209-07>
- Mehne, F.M.P., Gunka, K., Eilers, H., Herzberg, C., Kaefer, V., Stülke, J., 2013. Cyclic Di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: Both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *J. Biol. Chem.* 288, 2004–2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395491>
- Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M.K., Layer, F., Werner, G., Krause, G., 2016. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. Springer, Cham, pp. 55–87. https://doi.org/10.1007/82_2016_497
- Meng, J., He, G., Wang, H., Jia, M., Ma, X., Da, F., Wang, N., Hou, Z., Xue, X., Li, M., Zhou, Y., Luo, X., 2015. Reversion of antibiotic resistance by inhibiting mecA in clinical methicillin-resistant *Staphylococci* by antisense phosphorothioate oligonucleotide. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 68, 158–164. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.132>
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., Thomas, P.D., 2019. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 47, D419–D426. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>
- Mijakovic, I., Grangeasse, C., Turgay, K., 2016. Exploring the diversity of protein modifications: Special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw003>
- Milburn, M. V., Privé, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E., Kim, S.H., 1991. Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science (80-)*. 254, 1342–1347. <https://doi.org/10.1126/science.1660187>
- Monk, I.R., Shah, I.M., Xu, M., Tan, M.W., Foster, T.J., 2012. Transforming the

- untransformable: Application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. MBio 3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00277-11>
- Monk, I.R., Shaikh, N., Begg, S.L., Gajdiss, M., Sharkey, L.K.R., Lee, J.Y.H., Pidot, S.J., Seemann, T., Kuiper, M., Winnen, B., Hvorup, R., Collins, B.M., Bierbaum, G., Udagedara, S.R., Morey, J.R., Pulyani, N., Howden, B.P., Maher, M.J., McDevitt, C.A., King, G.F., Stinear, T.P., 2019. Zinc-binding to the cytoplasmic PAS domain regulates the essential WalK histidine kinase of *Staphylococcus aureus*. Nat. Commun. 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10932-4>
- Monk, I.R., Tree, J.J., Howden, B.P., Stinear, T.P., Foster, T.J., 2015. Complete bypass of restriction systems for major *Staphylococcus aureus* lineages. MBio 6, 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00308-15>
- Moormeier, D.E., Endres, J.L., Mann, E.E., Sadykov, M.R., Horswill, A.R., Rice, K.C., Fey, P.D., Bayles, K.W., 2013. Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3413–3424. <https://doi.org/10.1128/AEM.00395-13>
- Moscato, J.A., Schramke, H., Zhang, Y., Tosi, T., Dehbi, A., Jung, K., Gründling, A., 2016. Binding of cyclic di-AMP to the *Staphylococcus aureus* sensor kinase KdpD occurs via the universal stress protein domain and downregulates the expression of the Kdp potassium transporter. J. Bacteriol. 198, 98–110. <https://doi.org/10.1128/JB.00480-15>
- Nguyen, M.-P., Yoon, J.-M., Cho, M.-H., Lee, S.-W., 2015. Prokaryotic 2-component systems and the OmpR/PhoB superfamily. Can. J. Microbiol. 61, 799–810. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0345>
- Nikolskaya, A.N., 2002. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. Nucleic Acids Res. 30, 2453–2459. <https://doi.org/10.1093/nar/30.11.2453>
- Nilkens, S., Koch-Singenstreu, M., Niemann, V., Götz, F., Stehle, T., Unden, G., 2014. Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*. Mol. Microbiol. 91, 381–393. <https://doi.org/10.1111/mmi.12464>
- O'Connor, A.M., McManus, B.A., Coleman, D.C., 2018. First description of novel arginine

- catabolic mobile elements (ACMEs) types IV and V harboring a kdp operon in *Staphylococcus epidermidis* characterized by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 61, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.012>
- O'Hara, B.P., Norman, R.A., Wan, P.T.C., Roe, S.M., Barrett, T.E., Drew, R.E., Pearl, L.H., 1999. Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: A ligand-regulated transcription antitermination complex. *EMBO J.* 18, 5175–5186. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5175>
- Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J.M., Resch, G., Que, Y.A., 2017. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J. Infect. Dis.* 215, 703–712. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida Ki, K., Fujita, Y., Tanaka, T., 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B.subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* 29, 3804–13.
- Ohlsen, K., Donat, S., 2010. The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.016>
- Okada, A., Igarashi, M., Okajima, T., Kinoshita, N., Umekita, M., Sawa, R., Inoue, K., Watanabe, T., Doi, A., Martin, A., Quinn, J., Nishimura, Y., Utsumi, R., 2010. Walkmycin B targets WalK (YycG), a histidine kinase essential for bacterial cell growth. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 63, 89–94. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.128>
- Olson, M.E., Nygaard, T.K., Ackermann, L., Watkins, R.L., Zurek, O.W., Pallister, K.B., Griffith, S., Kiedrowski, M.R., Flack, C.E., Kavanaugh, J.S., Kreiswirth, B.N., Horswill, A.R., Voyich, J.M., 2013. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infect. Immun.* 81, 1316–24. <https://doi.org/10.1128/IAI.01242-12>
- Ouyang, Z., Zheng, F., Chew, J.Y., Pei, Y., Zhou, J., Wen, K., Han, M., Lemieux, M.J., Hwang, P.M., Wen, Y., 2019. Deciphering the activation and recognition mechanisms of *Staphylococcus aureus* response regulator ArlR. *Nucleic Acids Res.* 47, 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz891>
- Pannen, D., Fabisch, M., Gausling, L., Schnetz, K., 2016. Interaction of the RcsB response

- regulator with auxiliary transcription regulators in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 291, 2357–2370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.696815>
- Park, J.Y., Kim, J.W., Moon, B.Y., Lee, J., Fortin, Y.J., Austin, F.W., Yang, S.-J.J., Seo, K.S., 2015. Characterization of a novel two-component regulatory system, HptRS, the regulator for the hexose phosphate transport system in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 83, 1620–1628. <https://doi.org/10.1128/IAI.03109-14>
- Patton, T.G., Yang, S.-J., Bayles, K.W., 2006. The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* *cid* and *lrg* operons. Mol. Microbiol. 59, 1395–1404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05034.x>
- Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., 2016. Exploiting the commons: Cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. Curr. Opin. Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.12.004>
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A.C., Bach, T.-H.L., Tan, V.Y., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C., Otto, M., 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 1281–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Peschel, A., Otto, M., 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nat. Rev. Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110>
- Peterson, M.M., Mack, J.L., Hall, P.R., Alsup, A.A., Alexander, S.M., Sully, E.K., Sawires, Y.S., Cheung, A.L., Otto, M., Gresham, H.D., 2008. Apolipoprotein B Is an Innate Barrier against Invasive *Staphylococcus aureus* Infection. Cell Host Microbe 4, 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.001>
- Pietiäinen, M., François, P., Hyyryläinen, H.-L., Tangomo, M., Sass, V., Sahl, H.-G., Schrenzel, J., Kontinen, V.P., 2009. Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance. BMC Genomics 10, 429. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-429>
- Poupel, O., Proux, C., Jagla, B., Msadek, T., Dubrac, S., 2018. SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog. 14, 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006917>
- Pragman, A.A., Ji, Y., Schlievert, P.M., 2007. Repression of *Staphylococcus aureus* SrrAB

- Using Inducible Antisense *srrA* Alters Growth and Virulence Factor Transcript Levels
†. *Biochemistry* 46, 314–321. <https://doi.org/10.1021/bi0603266>
- Price-Whelan, A., Poon, C.K., Benson, M.A., Eidem, T.T., Roux, C.M., Boyd, J.M., Dunman, P.M., Torres, V.J., Krulwich, T.A., 2013. Transcriptional profiling of *Staphylococcus aureus* during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K⁺ uptake systems. *MBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00407-13>
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.H.L., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M., Otto, M., 2008. RNAIII-Independent Target Gene Control by the *agr* Quorum-Sensing System: Insight into the Evolution of Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.005>
- Raafat, D., Otto, M., Reppschläger, K., Iqbal, J., Holtfreter, S., 2019. Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. *Trends Microbiol.* 27, 303–322. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.009>
- Radin, J.N., Kelliher, J.L., Párraga Solórzano, P.K., Kehl-Fie, T.E., 2016. The Two-Component System ArlRS and Alterations in Metabolism Enable *Staphylococcus aureus* to Resist Calprotectin-Induced Manganese Starvation. *PLoS Pathog.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006040>
- Randall, C.P., Gupta, A., Utley-Drew, B., Lee, S.Y., Morrison-Williams, G., O'Neill, A.J., 2018. Acquired Nisin Resistance in *Staphylococcus aureus* Involves Constitutive Activation of an Intrinsic Peptide Antibiotic Detoxification Module . *mSphere* 3. <https://doi.org/10.1128/mspheredirect.00633-18>
- Rogasch, K., Rühmling, V., Pané-Farré, J., Höper, D., Weinberg, C., Fuchs, S., Schmudde, M., Bröker, B.M., Wolz, C., Hecker, M., Engelmann, S., 2006. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 188, 7742–7758. <https://doi.org/10.1128/JB.00555-06>
- Rollin, G., Tan, X., Tros, F., Dupuis, M., Nassif, X., Charbit, A., Coureuil, M., 2017. Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Endothelial Cells: A Matter of Growth or Persistence. *Front. Microbiol.* 8, 1354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01354>
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1–52.

- <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
- Römling, U., Gomelsky, M., Galperin, M.Y., 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57, 629–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x>
- Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., van Roon, J., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., van Wamel, W.J.B., 2006. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* 8, 1282–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x>
- Rosenstein, R., Götz, F., 2013. What distinguishes highly pathogenic staphylococci from medium- and non-pathogenic. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 33–89. https://doi.org/10.1007/82_2012_286
- Rouha, H., Badarau, A., Visram, Z.C., Battles, M.B., Prinz, B., Magyarics, Z., Nagy, G., Mirkina, I., Stulik, L., Zerbs, M., Jägerhofer, M., Maierhofer, B., Teubenbacher, A., Doležilková, I., Gross, K., Banerjee, S., Zauner, G., Malafa, S., Zmajkovic, J., Maier, S., Mabry, R., Krauland, E., Dane Wittrup, K., Gerngross, T.U., Nagy, E., 2015. Five birds, one stone: Neutralization of α -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *MAbs* 7, 243–254. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.985132>
- Rowe, S.E., Wagner, N.J., Li, L., Beam, J.E., Wilkinson, A.D., Radlinski, L.C., Zhang, Q., Miao, E.A., Conlon, B.P., 2020. Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0627-y>
- Rowland, M.A., Deeds, E.J., 2014. Crosstalk and the evolution of specificity in two-component signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 5550–5555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317178111>
- Sakinç, T., Michalski, N., Kleine, B., Gatermann, S.G., 2009. The uropathogenic species *Staphylococcus saprophyticus* tolerates a high concentration of d-serine. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 60–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01731.x>
- Salazar, M.E., Laub, M.T., 2015. Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways, *Current Opinion in Microbiology.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.003>

- Salema, V., Fernández, L.Á., 2017. *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies. *Microb. Biotechnol.* 10, 1468–1484. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12819>
- Salema, V., Mañas, C., Cerdán, L., Piñero-Lambea, C., Marín, E., Roovers, R.C., Van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Fernández, L.Á., 2016. High affinity nanobodies against human epidermal growth factor receptor selected on cells by *E. coli* display. *MAbs* 8, 1286–1301. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1216742>
- Schenk, S., Laddaga, R.A., 1992. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 94, 133–138. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90596-G](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90596-G)
- Schlag, S., Fuchs, S., Nerz, C., Gaupp, R., Engelmann, S., Liebeke, M., Lalk, M., Hecker, M., Götz, F., 2008. Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 7847–58. <https://doi.org/10.1128/JB.00905-08>
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* 187, 4774–4781. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4774-4781.2005>
- Selle, M., Hertlein, T., Oesterreich, B., Klemm, T., Kloppot, P., Müller, E., Ehricht, R., Stentzel, S., Bröker, B.M., Engelmann, S., Ohlsen, K., 2016. Global antibody response to *Staphylococcus aureus* live-cell vaccination. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24754>
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C., Becker, S., 2008. A Ligand-Induced Switch in the Periplasmic Domain of Sensor Histidine Kinase CitA. *J. Mol. Biol.* 377, 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.024>
- Shang, F., Xue, T., Sun, H., Xing, L., Zhang, S., Yang, Z., Zhang, L., Sun, B., 2009. The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein A gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner. *Infect. Immun.* 77, 2849–2856. <https://doi.org/10.1128/IAI.01405-08>
- Sharma-Kuinkel, B.K., Mann, E.E., Ahn, J.-S., Kuechenmeister, L.J., Dunman, P.M., Bayles,

- K.W., 2009. The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. J. Bacteriol. 191, 4767–75. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-09>
- Shu, C.J., Zhulin, I.B., 2002. ANTAR: An RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)02036-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)02036-9)
- Sidote, D.J., Barbieri, C.M., Wu, T., Stock, A.M., 2008. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR Domain Bound to DNA Reveals a Beta Fold with an Unusual Mode of Binding. Structure 16, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.011>
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U., 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. Mol. Microbiol. 53, 1123–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>
- Simms, S.A., Keane, M.G., Stock, J., 1985. Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. J. Biol. Chem. 260, 10161–10168.
- Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M., Laub, M.T., 2008. Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems. Cell 133, 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.040>
- Smith, J.G., Latiolais, J.A., Guanga, G.P., Pennington, J.D., Silversmith, R.E., Bourret, R.B., 2004. A search for amino acid substitutions that universally activate response regulators. Mol. Microbiol. 51, 887–901. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03882.x>
- Song, J.H., Ko, K.S., Lee, J.Y., Baek, J.Y., Oh, W.S., Yoon, H.S., Jeong, J.Y., Chun, J., 2005. Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. Mol. Cells 19, 365–374.
- Sourjik, V., Armitage, J.P., 2010. Spatial organization in bacterial chemotaxis. EMBO J. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.178>
- Stauff, D.L., Torres, V.J., Skaar, E.P., 2007. Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. J. Biol. Chem. 282, 26111–26121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703797200>
- Stehle, T., Neu, A., Niemann, V., Koch-Singenstreu, M., Nilkens, S., Götz, F., Unden, G., 2014.

- The NreA Protein Functions as a Nitrate Receptor in the Staphylococcal Nitrate Regulation System. J. Mol. Biol. 426, 1539–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.026>
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-Component Signal Transduction. Annu. Rev. Biochem. 69, 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Su, J., Iehara, M., Yasukawa, J., Matsumoto, Y., Hamamoto, H., Sekimizu, K., 2015. A novel mutation in the *vraS* gene of *Staphylococcus aureus* contributes to reduce susceptibility against daptomycin. J. Antibiot. (Tokyo). 68, 646–648. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.42>
- Sully, E.K., Geller, B.L., 2016. Antisense antimicrobial therapeutics. Curr. Opin. Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.017>
- Suzuki, H., Lefébure, T., Bitar, P.P., Stanhope, M.J., 2012. Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. BMC Genomics 13, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-38>
- Szurmant, H., Mohan, M.A., Imus, P.M., Hoch, J.A., 2007. YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 189, 3280–3289. <https://doi.org/10.1128/JB.01936-06>
- Szurmant, H., Muff, T.J., Ordal, G.W., 2004. *Bacillus subtilis* CheC and FliY are members of a novel class of CheY-P-hydrolyzing proteins in the chemotactic signal transduction cascade. J. Biol. Chem. 279, 21787–21792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311497200>
- Szurmant, H., Ordal, G.W., 2004. Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 301–319. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.2.301-319.2004>
- Taglialegna, A., Varela, M.C., Rosato, R.R., Rosato, A.E., 2019. *VraSR* and Virulence Trait Modulation during Daptomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. mSphere 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00557-18>
- Tang, Y.T., Gao, R., Havranek, J.J., Groisman, E.A., Stock, A.M., Marshall, G.R., 2012. Inhibition of Bacterial Virulence: Drug-Like Molecules Targeting the *Salmonella enterica* PhoP Response Regulator. Chem. Biol. Drug Des. 79, 1007–1017.

- <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01362.x>
- Throup, J.P., Zappacosta, F., Lunsford, R.D., Annan, R.S., Carr, S.A., Lonsdale, J.T., Bryant, A.P., McDevitt, D., Rosenberg, M., Burnham, M.K.R., 2001. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: Genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 40, 10392–10401. <https://doi.org/10.1021/bi0102959>
- Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Débarbouillé, M., Penadés, J.R., Lasa, I., 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* 187, 5318–5329. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5318-5329.2005>
- Torres, V.J., Stauff, D.L., Pishchany, G., Bezbradica, J.S., Gordy, L.E., Iturregui, J., Anderson, K.L.L., Dunman, P.M., Joyce, S., Skaar, E.P., 2007. A *Staphylococcus aureus* Regulatory System that Responds to Host Heme and Modulates Virulence. *Cell Host Microbe* 1. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.001>
- Truong-Bolduc, Q.C., Ding, Y., Hooper, D.C., 2008. Posttranslational modification influences the effects of MgrA on *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 7375–7381. <https://doi.org/10.1128/JB.01068-08>
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Urano, H., Umezawa, Y., Yamamoto, K., Ishihama, A., Ogasawara, H., 2015. Cooperative regulation of the common target genes between H₂O₂-sensing *yedvw* and Cu²⁺-sensing *cussr* in *Escherichia coli*. *Microbiol. (United Kingdom)* 161, 729–738. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000026>
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penadés, J.R., Lasa, I., 2003. SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48, 1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x>
- Vashist, A., Prithvi Raj, D., Gupta, U.D., Bhat, R., Tyagi, J.S., 2016. The $\alpha 10$ helix of DevR, the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy response regulator, regulates its DNA binding and activity. *FEBS J.* 283, 1286–1299. <https://doi.org/10.1111/febs.13664>

- Velikova, N., Fulle, S., Manso, A.S., Mechkarska, M., Finn, P., Conlon, J.M., Oggioni, M.R., Wells, J.M., Marina, A., 2016. Putative histidine kinase inhibitors with antibacterial effect against multi-drug resistant clinical isolates identified by in vitro and in silico screens. *Sci. Rep.* 6, 26085. <https://doi.org/10.1038/srep26085>
- Villanueva, M., García, B., Valle, J., Rapún, B., Ruiz De Los Mozos, I., Solano, C., Martí, M., Penadés, J.R.J.R., Toledo-Arana, A., Lasa, I., 2018. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02949-y>
- Wadhams, G.H., Warren, A. V., Martin, A.C., Armitage, J.P., 2003. Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell. *Mol. Microbiol.* 50, 763–770. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03716.x>
- Walker, J.N., Crosby, H.A., Spaulding, A.R., Salgado-Pabón, W., Malone, C.L., Rosenthal, C.B., Schlievert, P.M., Boyd, J.M., Horswill, A.R., 2013. The *Staphylococcus aureus* ArlRS Two-Component System Is a Novel Regulator of Agglutination and Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 9, e1003819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003819>
- Wang, L., Hu, C., Shao, L., 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wang, L., Tian, X., Wang, J., Yang, H., Fan, K., Xu, G., Yang, K., Tan, H., 2009. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8617–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900592106>
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wilson, B.A., Saylers, A.A., Whitt, D.D., Winker, M.E., 2002. *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach*, ASM Press, Washington.
- Wilson, B.C., Vatanen, T., Cutfield, W.S., O’Sullivan, J.M., 2019. The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00002>
- Witte, G., Hartung, S., Büttner, K., Hopfner, K.P., 2008. *Structural Biochemistry of a*

- Bacterial Checkpoint Protein Reveals Diadenylate Cyclase Activity Regulated by DNA Recombination Intermediates. *Mol. Cell* 30, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.020>
- Woodward, J.J., Lavarone, A.T., Portnoy, D.A., 2010. C-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* (80-.). 328, 1703–1705. <https://doi.org/10.1126/science.1189801>
- Worthington, R.J., Blackledge, M.S., Melander, C., 2013. Small-molecule inhibition of bacterial two-component systems to combat antibiotic resistance and virulence. *Future Med. Chem.* <https://doi.org/10.4155/fmc.13.58>
- Wozniak, D.J., Tiwari, K.B., Soufan, R., Jayaswal, R.K., 2012. The *mcsB* gene of the *clpC* operon is required for stress tolerance and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. (United Kingdom)* 158, 2568–2576. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060749-0>
- Xu, S., Fu, Z., Zhou, Y., Liu, Y., Xu, X., Wang, M., 2017. Mutations of the transporter proteins *glpt* and *uhpt* confer fosfomycin resistance in *staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00914>
- Yan, H., Wang, Q., Teng, M., Li, X., 2019. The DNA-binding mechanism of the TCS response regulator *ArlR* from *Staphylococcus aureus*. *J. Struct. Biol.* 208, 107388. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.09.005>
- Yan, M., Yu, C., Yang, J., Ji, Y., 2011. The essential two-component system *YhcSR* is involved in regulation of the nitrate respiratory pathway of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193, 1799–1805. <https://doi.org/10.1128/JB.01511-10>
- Yang, S.J., Bayer, A.S., Mishra, N.N., Meehl, M., Ledala, N., Yeaman, M.R., Xiong, Y.Q., Cheung, A.L., 2012. The *Staphylococcus aureus* two-component regulatory system, *grars*, senses and confers resistance to selected cationic antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 80, 74–81. <https://doi.org/10.1128/IAI.05669-11>
- Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S., Price, C.W., 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* 10, 2265–2275. <https://doi.org/10.1101/gad.10.18.2265>
- Yang, Y., Sun, H., Liu, X., Wang, M., Xue, T., Sun, B., 2015. Regulatory mechanism of the

- three-component system HptRSA in glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.* 205, 241–253. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0446-6>
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1113–1123. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1113-1123.2001>
- Yoshida, Y., Matsuo, M., Oogai, Y., Kato, F., Nakamura, N., Sugai, M., Komatsuzawa, H., 2011. Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02291.x>
- Zell, R., Fritz, H.J., 1987. DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* 6, 1809–1815. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02435.x>
- Zhao, B., Erwin, A., Xue, B., 2018. How many differentially expressed genes: A perspective from the comparison of genotypic and phenotypic distances. *Genomics* 110, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.08.007>
- Zhu, T., Zhao, Y., Wu, Y., Qu, D., 2017. The *Staphylococcus epidermidis* gdpS regulates biofilm formation independently of its protein-coding function. *Microb. Pathog.* 105, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.045>
- Zschiedrich, C.P., Keidel, V., Szurmant, H., 2016. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J. Mol. Biol.* 428, 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>
-

ANEXO

ANEXO

Tabla 1. Número de genes afectados por cada TCS.

Se ha analizado la expresión de los genes en las muestras expresando la versión fosfomimética de los RR (RR*) o la forma nativa de los TCSs. Los genes diferencialmente expresados se determinaron en relación a los plásmidos vacíos pRMC2 (para las cepas que sobreexpresan los RRs*) o el pCN51 (para las cepas que sobreexpresan los TCSs) como control. Las columnas indican el número de genes activados o inhibidos por cada RR* o TCS considerando un cambios en los niveles de expresión de Fold-Change >2 o >4 y un valor p corregido <0.05. Las columnas con los porcentajes de genes regulados muestran la proporción del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2 cuya expresión se ha visto alterada al menos dos o cuatro veces.

	Number of genes upregulated by fold change (p<0.05)		Number of genes downregulated by fold change (p<0.05)		Percentage of genes regulated > 2	Percentage of genes regulated > 4
	>2	>4	<-2	<-4		
Phosphomimetic RR*						
WalR	138	31	38	6	6.00%	1.26%
HptR	2	2	0	0	0.07%	0.07%
LytR	3	3	0	0	0.10%	0.10%
GraR	18	15	1	0	0.65%	0.51%
SaeR	74	53	33	2	3.65%	1.87%
TCS7	8	7	6	0	0.48%	0.24%
ArlR	34	20	59	19	3.17%	1.33%
SrrA	141	63	101	15	8.25%	2.66%
PhoP	237	64	149	48	13.16%	3.82%
AirR	96	50	54	3	5.11%	1.81%
VraR	63	21	24	2	2.97%	0.78%
AgrA	95	44	40	2	4.60%	1.57%
KdpE	224	87	103	17	11.15%	3.54%
HssR	138	52	64	2	6.88%	1.84%
NreC	154	55	82	8	8.04%	2.15%
BraR	127	23	137	16	9.00%	1.33%
Overexpressed TCS**						
SaeRS	4	4	0	0	0.14%	0.14%
NreBC	12	11	0	0	0.41%	0.37%
BraRS	2	2	2	2	0.07%	0.07%

*Expresión de la forma fosfomimética constitutivamente activa de los RR desde el pRMC2. ** Expresión de la forma nativa de los TCSs desde el pCN51.

Tabla 2. Regulones de cada uno de los TCSs de *S. aureus*.

Genes que forman parte del regulón de cada TCS. Las columnas denominadas Locus Tag muestran versiones diferentes de la anotación del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2.

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR*</i>	MW_RS00100	MW0018	<i>walR</i>	62,0
	MW_RS00420	MW0080	<i>nptA</i>	7,5
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-2,2
	MW_RS00565	MW0108		-10,6
	MW_RS00860	MW0163	<i>glcA</i>	2,1
	MW_RS01040	MW0200	<i>hptA</i>	3,2
	MW_RS01335	MW0252	<i>lytM</i>	7,8
	MW_RS01355	MW0256		-2,4
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	5,4
	MW_RS01710	MW0325		2,4
	MW_RS01715	MW0326		2,2
	MW_RS01795	MW0341	<i>rpsF</i>	3,6
	MW_RS01800	MW0342		3,8
	MW_RS01805	MW0343	<i>rpsR</i>	3,2
	MW_RS02190	MW0413		4,2
	MW_RS02220	MW0419	<i>sle</i>	8,5
	MW_RS02450	MW0456	<i>rplY</i>	3,8
	MW_RS02665	MW0481	<i>radA</i>	2,9
	MW_RS02720	MW0492	<i>rplK</i>	4,3
	MW_RS02725	MW0493	<i>rplI</i>	4,4
	MW_RS02730	MW0494	<i>rplJ</i>	3,7
	MW_RS02735	MW0495	<i>rplL</i>	3,2
	MW_RS02740	MW0496		2,4
	MW_RS02750	MW0498	<i>rpoC</i>	2,0
	MW_RS02755	MW0499		3,1
	MW_RS02760	MW0500	<i>rpsL</i>	3,0
	MW_RS02765	MW0501	<i>rpsG</i>	3,0
	MW_RS02770	MW0502	<i>fusA</i>	3,3
	MW_RS02775	MW0503	<i>tuf</i>	2,3
	MW_RS02840	MW0516	<i>sdrC</i>	4,1
	MW_RS02845	MW0517	<i>sdrD</i>	2,8
	MW_RS02885	MW0525		-2,0
	MW_RS03000	MW0549		11,5
	MW_RS03005	MW0550		16,0
	MW_RS03235	MW0593		-15,8
	MW_RS03240	MW0594		-10,6
	MW_RS03245	MW0595		-8,0
	MW_RS03400	MW0625	<i>pitR</i>	2,1
	MW_RS03405	MW0626	<i>pitA</i>	2,9
	MW_RS03410	MW0627		4,5
	MW_RS03870	MW0711		2,4
	MW_RS03910	MW0717		4,5
	MW_RS03915	MW0718		-2,5
	MW_RS04135	MW0761		-3,4
	MW_RS04255	MW0785		-2,4
	MW_RS04295	MW0792	<i>metQ1</i>	-2,2
	MW_RS04530	MW0838		-3,3
	MW_RS04545	MW0841	<i>glpQ</i>	3,5
	MW_RS04565	MW0845		3,0
	MW_RS04570	MW0846	<i>spsA</i>	2,2
	MW_RS04745	MW0882		-2,2
	MW_RS04845	MW0902		2,4
	MW_RS04885	MW0908		-2,4
	MW_RS04900	MW0911		3,3
	MW_RS05030	MW0936	<i>atl</i>	5,4
	MW_RS05055	MW0941	<i>qoxD</i>	2,3
	MW_RS05070	MW0944		2,1
	MW_RS05240	MW0975		-2,6
	MW_RS05305	MW0988		-3,8
	MW_RS05325	MW0992	<i>typA</i>	2,4
	MW_RS05415	MW1009		3,2
	MW_RS05420	N/A		2,2
	MW_RS05425	MW1010		2,1
	MW_RS05435	MW1012	<i>isdA</i>	-3,1
	MW_RS05945	MW1107	<i>rpmB</i>	2,2
	MW_RS06020	MW1121		2,6
	MW_RS06030	MW1123		2,0
	MW_RS06035	MW1124	<i>rplS</i>	4,0
	MW_RS06120	MW1139	<i>rpsB</i>	3,3
	MW_RS06130	MW1140	<i>tsf</i>	2,5
	MW_RS06210	MW1156	<i>rpsO</i>	3,4

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR*</i>	MW_RS06280	MW1170		-2,8
	MW_RS06595	MW1228		-2,1
	MW_RS06635	MW1236	<i>opuD</i>	2,3
	MW_RS06705	MW1248	<i>msrA</i>	2,9
	MW_RS07195	MW1339	<i>recU</i>	2,5
	MW_RS07360	MW1369	<i>ebpS</i>	-2,9
	MW_RS07850	MW1466		-2,2
	MW_RS08040	MW1503	<i>rpmG</i>	2,6
	MW_RS08160	MW1527	<i>rpsU</i>	2,8
	MW_RS08210	MW1537	<i>rpsT</i>	2,2
	MW_RS08470	MW1587	<i>secF</i>	2,9
	MW_RS08480	MW1589	<i>tgt</i>	2,5
	MW_RS08510	MW1595	<i>rpmA</i>	2,9
	MW_RS08515	N/A		3,3
	MW_RS08520	MW1597	<i>rplU</i>	3,0
	MW_RS08655	MW1622	<i>rplT</i>	2,9
	MW_RS08660	MW1623		2,7
	MW_RS08665	MW1624	<i>infC</i>	2,9
	MW_RS08810	MW1651		-2,0
	MW_RS08875	MW1662	<i>rpsD</i>	3,4
	MW_RS09085	MW1699	<i>sasC</i>	5,4
	MW_RS09100	MW1702		2,3
	MW_RS09265	MW1736		8,3
	MW_RS09550	MW1782	<i>prsA</i>	-2,8
	MW_RS09650	MW1800		3,1
	MW_RS09810	MW1802		-2,3
	MW_RS09815	MW1803		-3,0
	MW_RS10010	MW1837		4,9
	MW_RS10110	MW1855	<i>nos</i>	2,3
	MW_RS10350	MW1898		3,6
	MW_RS10455	MW1918		2,9
	MW_RS10640	MW1956		5,5
	MW_RS11135	MW2044		2,6
	MW_RS11165	MW2050		-2,0
	MW_RS11170	MW2051	<i>pyrG</i>	2,0
	MW_RS11280	MW2072		2,5
	MW_RS11320	MW2086	<i>fmtB</i>	6,0
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-2,8
	MW_RS11615	MW2136	<i>rpsI</i>	2,6
	MW_RS11620	MW2137		2,3
	MW_RS11645	MW2142	<i>rplQ</i>	2,7
	MW_RS11650	MW2143	<i>rpoA</i>	2,8
	MW_RS11655	MW2144	<i>rpsK</i>	3,1
	MW_RS11660	MW2145	<i>rpsM</i>	2,9
	MW_RS11665	MW2146	<i>rpmJ</i>	2,1
	MW_RS11670	MW2147	<i>infA</i>	2,7
	MW_RS11675	MW2148	<i>adk</i>	3,2
	MW_RS11680	MW2149	<i>secY</i>	3,1
	MW_RS11685	MW2150	<i>rplO</i>	3,2
	MW_RS11690	MW2151	<i>rpmD</i>	3,5
	MW_RS11695	MW2152	<i>rpsE</i>	3,3
	MW_RS11700	MW2153	<i>rplR</i>	3,0
	MW_RS11705	MW2154	<i>rplF</i>	3,1
	MW_RS11710	MW2155	<i>rpsH</i>	3,1
	MW_RS11715	MW2156	<i>rpsZ</i>	3,3
	MW_RS11720	MW2157	<i>rplE</i>	3,2
	MW_RS11725	MW2158	<i>rplX</i>	3,3
	MW_RS11730	MW2159	<i>rplN</i>	3,5
	MW_RS11735	MW2160	<i>rpsQ</i>	3,0
	MW_RS11740	MW2161	<i>rpmC</i>	3,7
	MW_RS11745	MW2162	<i>rplP</i>	3,6
	MW_RS11750	MW2163	<i>rpsC</i>	3,4
	MW_RS11755	MW2164	<i>rplV</i>	3,3
	MW_RS11760	MW2165	<i>rpsS</i>	3,4
	MW_RS11765	MW2166	<i>rplB</i>	3,8
	MW_RS11770	MW2167	<i>rplW</i>	3,7
	MW_RS11775	MW2168	<i>rplD</i>	3,5
	MW_RS11780	MW2169	<i>rplC</i>	3,8
	MW_RS11785	MW2170	<i>rpsJ</i>	4,1
	MW_RS11980	MW2206	<i>ureA</i>	-2,3
	MW_RS11985	MW2207	<i>ureB</i>	-2,1
	MW_RS11995	MW2209	<i>ureE</i>	-2,1
	MW_RS12000	MW2210	<i>ureF</i>	-2,4
	MW_RS12005	MW2211	<i>ureG</i>	-2,5
	MW_RS12010	MW2212	<i>ureD</i>	-2,1
	MW_RS12040	MW2217	<i>ssaA2</i>	8,1
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	29,5

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR*</i>				
	MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	3,0
	MW_RS12315	MW2273		4,1
	MW_RS12320	MW2274		3,9
	MW_RS12485	MW2303		-3,0
	MW_RS12585	MW2325		4,8
	MW_RS12590	MW2326		6,9
	MW_RS12660	MW2338		6,0
	MW_RS12665	MW2339		-11,0
	MW_RS13035	MW2403		-2,4
	MW_RS13355	MW2464		4,2
	MW_RS13360	MW2465		16,1
	MW_RS13475	MW2487	<i>ssaA1</i>	10,0
	MW_RS13685	MW2525	<i>fda</i>	-2,0
	MW_RS13850	MW2551	<i>clfB</i>	2,7
	MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	-4,2
	MW_RS14035	MW2586	<i>icaA</i>	5,6
	MW_RS14245	MW2628		2,2
	MW_RS14250	MW2629		2,2
	MW_RS14255	MW2630		2,5
	MW_RS14260	MW2631		3,9
	MW_RS14265	MW2632	<i>rpmH</i>	3,2
	MW_RS14380	N/A		3,3
	MW_RS14385	N/A		2,1
	MW_RS14600	N/A		2,1
	MW_RS14720	MW1322a		2,0
	MW_RS14820	MW1864a		2,4
	MW_RS14845	MW1888a		3,4
	MW_RS14865	N/A		2,1
<i>hptR*</i>				
	MW_RS01025	MW0197	<i>uhpT</i>	24,9
	MW_RS01030	MW0198	<i>hptR</i>	1292,3
<i>lytR*</i>				
	MW_RS01250	MW0237	<i>lytR</i>	947,9
	MW_RS01255	MW0238	<i>lrgA</i>	101,4
	MW_RS01260	MW0239	<i>lrgB</i>	207,4
<i>graR*</i>				
	MW_RS01825	MW0346		74,9
	MW_RS03380	MW0621	<i>graR</i>	1356,3
	MW_RS04405	MW0813	<i>dltX</i>	17,0
	MW_RS04410	MW0814	<i>dltA</i>	15,1
	MW_RS04415	MW0815	<i>dltB</i>	19,4
	MW_RS04420	MW0816	<i>dltC</i>	18,3
	MW_RS04425	MW0817	<i>dltD</i>	16,0
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-2,9
	MW_RS05355	MW0998	<i>ctaA</i>	4,0
	MW_RS05870	MW1092	<i>gmk</i>	2,1
	MW_RS06700	MW1247	<i>mprF</i>	25,1
	MW_RS12040	MW2217	<i>ssaA2</i>	2,8
	MW_RS13235	MW2441		7,0
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	4,2
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	35,6
	MW_RS14195	MW2618		6,7
	MW_RS14205	MW2620	<i>vraD</i>	14,2
	MW_RS14210	MW2621	<i>vraE</i>	28,0
	MW_RS14215	MW2622		43,2
<i>saeR*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	3,6
	MW_RS00050	MW0010		-2,1
	MW_RS00055	MW0011		-2,2
	MW_RS00525	MW0100	<i>butA</i>	4,8
	MW_RS00560	MW0107	<i>sodM</i>	2,2
	MW_RS00815	MW0155		4,3
	MW_RS01020	MW0196		53,3
	MW_RS01065	MW0205		15,4
	MW_RS01070	MW0206	<i>coa</i>	13,2
	MW_RS01075	N/A		12,3
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	13,9
	MW_RS01355	MW0256		-2,0
	MW_RS01485	MW0282		11,6
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	10,2
	MW_RS01675	MW0318		-2,1
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-3,8
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-2,6
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-2,0
	MW_RS01755	MW0333	<i>metF</i>	-2,4
	MW_RS01820	MW0345		39,6
	MW_RS02010	MW0382	<i>set16</i>	3,9

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>saeR*</i>				
	MW_RS02015	MW0383	<i>set17</i>	10,2
	MW_RS02035	MW0386	<i>set20</i>	6,9
	MW_RS02045	MW0387	<i>set21</i>	7,2
	MW_RS02050	MW0388	<i>set22</i>	7,1
	MW_RS02065	MW0391	<i>set25</i>	4,6
	MW_RS02095	MW0396		45,1
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	2,4
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,1
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,7
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,4
	MW_RS02800	MW0508		-2,1
	MW_RS03630	MW0668	<i>saeR</i>	1307,8
	MW_RS03635	MW0669	<i>saeQ</i>	136,2
	MW_RS03640	MW0670	<i>saeP</i>	824,3
	MW_RS03715	MW0684	<i>opuBA</i>	2,3
	MW_RS03720	MW0685		2,4
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	2,7
	MW_RS04120	MW0758	<i>ear</i>	3,6
	MW_RS04125	MW0759	<i>sec4</i>	48,3
	MW_RS04160	N/A		12,4
	MW_RS04165	MW0767	<i>emp</i>	22,5
	MW_RS04170	MW0768		30,3
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i>	23,0
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,2
	MW_RS04565	MW0845		2,2
	MW_RS04675	MW0868	<i>oppB</i>	-2,2
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-2,6
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-2,5
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-2,5
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-2,5
	MW_RS04945	MW0920		9,9
	MW_RS05080	MW0945		2,2
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>	-5,3
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-5,0
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-3,5
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-3,6
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-3,5
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2,9
	MW_RS05120	MW0953	<i>purF</i>	-2,7
	MW_RS05125	MW0954	<i>purM</i>	-2,7
	MW_RS05130	MW0955	<i>purN</i>	-2,7
	MW_RS05135	MW0956	<i>purH</i>	-2,4
	MW_RS05140	MW0957	<i>purD</i>	-2,2
	MW_RS05565	MW1037	<i>efb</i>	658,5
	MW_RS05570	N/A		8,2
	MW_RS05575	MW1038	<i>flr</i>	17,0
	MW_RS05580	MW1039		4,5
	MW_RS05585	MW1040	<i>fib</i>	1390,3
	MW_RS05590	MW1041		1688,9
	MW_RS05625	MW1044		11,0
	MW_RS05650	MW1049		10,2
	MW_RS06280	MW1170		2,4
	MW_RS06505	MW1212		2,0
	MW_RS06935	MW1292	<i>acyP</i>	2,0
	MW_RS06940	MW1293	<i>xpaC</i>	2,4
	MW_RS07120	MW1325	<i>norB</i>	29,6
	MW_RS07125	MW1326		88,9
	MW_RS07130	MW1327	<i>tdcB</i>	153,5
	MW_RS07135	MW1328	<i>ald1</i>	230,8
	MW_RS07410	MW1378	<i>lukF</i>	3,8
	MW_RS07415	MW1379	<i>lukS</i>	4,1
	MW_RS07730	MW1444		2,4
	MW_RS08895	MW1665		-2,0
	MW_RS10235	MW1879		281,1
	MW_RS10240	MW1880		392,7
	MW_RS10245	MW1881	<i>hlb</i>	40,3
	MW_RS10250	MW1882		6,1
	MW_RS10265	MW1884	<i>scn</i>	126,3
	MW_RS10570	MW1941		104,2
	MW_RS10575	MW1942		108,9
	MW_RS12350	MW2278	<i>tcaR</i>	15,1
	MW_RS12355	MW2279		2,6
	MW_RS12500	MW2306	<i>sarZ</i>	-2,5
	MW_RS12680	MW2341	<i>sbi</i>	511,0
	MW_RS12685	N/A		847,2
	MW_RS12690	MW2342	<i>hlgA</i>	5,5
	MW_RS12695	MW2343	<i>hlgC</i>	54,5
	MW_RS12700	MW2344	<i>hlgB</i>	24,5

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>saeR*</i>				
	MW_RS13050	MW2405		3,4
	MW_RS13130	MW2420	<i>fnbB</i>	13,2
	MW_RS13135	MW2421	<i>fnbA</i>	134,6
	MW_RS13340	MW2461	<i>cidB</i>	3,0
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	4,0
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA</i>	-2,4
	MW_RS14840	N/A		2,2
	MW_RS15000	N/A		-2,4
<i>tcs7R*</i>				
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	11,8
	MW_RS01485	MW0282		10,8
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	2,9
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-2,4
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-3,2
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-2,6
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-3,0
	MW_RS06475	MW1206		1013,2
	MW_RS06480	MW1207		671,3
	MW_RS06490	MW1209	<i>tcs7R</i>	1034,1
	MW_RS06495	MW1210		35,8
	MW_RS06500	MW1211	<i>nuc</i>	6,7
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-3,6
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-3,1
<i>arlR*</i>				
	MW_RS00330	MW0062		10,6
	MW_RS00335	MW0063		13,9
	MW_RS00420	MW0080	<i>nptA</i>	5,5
	MW_RS00765	MW0145		-3,6
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-4,4
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-4,1
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-2,1
	MW_RS01000	MW0192		5,4
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	10,8
	MW_RS01240	MW0235	<i>scdA</i>	3,2
	MW_RS01320	MW0249		-2,8
	MW_RS01485	MW0282		7,4
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	3,2
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-2,8
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-3,2
	MW_RS01690	MW0321	<i>efeU</i>	-2,7
	MW_RS01995	MW0379	<i>pcp</i>	-5,0
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,1
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,4
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,9
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,5
	MW_RS03515	MW0646		20,0
	MW_RS03520	MW0647		18,1
	MW_RS03525	MW0648	<i>mgrA</i>	8,2
	MW_RS03570	MW0657	<i>norA</i>	-2,0
	MW_RS03910	MW0717		-4,8
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	2,2
	MW_RS04125	MW0759	<i>sec4</i>	3,5
	MW_RS04150	MW0763		6,9
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,2
	MW_RS04295	MW0792	<i>metQ1</i>	-2,1
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-2,1
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-2,2
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-2,1
	MW_RS04730	MW0879	<i>spxA</i>	7,5
	MW_RS04935	MW0918		-2,6
	MW_RS04940	MW0919		-2,9
	MW_RS05020	MW0935		-6,2
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>	-3,7
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-3,9
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-3,0
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-3,2
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2,4
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2,2
	MW_RS05305	MW0988	<i>mntH</i>	-8,7
	MW_RS06070	MW1130	<i>lytN</i>	-7,3
	MW_RS06075	MW1131	<i>fmhC</i>	-4,8
	MW_RS06360	MW1187	<i>hfq</i>	-2,6
	MW_RS06460	MW1203		-3,4
	MW_RS06505	MW1212		2,0
	MW_RS07000	MW1305	<i>arlR</i>	1526,0
	MW_RS07115	MW1324	<i>ebh</i>	-8,1
	MW_RS07730	MW1444		2,3
	MW_RS08305	MW1555	<i>pxpA</i>	-2,7

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>arIR*</i>				
	MW_RS08310	MW1556		-2,9
	MW_RS08945	MW1674	<i>isdH</i>	-3,6
	MW_RS09085	MW1699	<i>sasC</i>	-3,9
	MW_RS09100	MW1702		2,1
	MW_RS10110	MW1855	<i>nos</i>	12,3
	MW_RS10115	MW1856	<i>pheA</i>	5,8
	MW_RS10705	MW1968		-2,4
	MW_RS10710	MW1969		-2,5
	MW_RS11275	MW2071		2,6
	MW_RS11320	MW2086	<i>fntB</i>	-5,4
	MW_RS11820	N/A		2,1
	MW_RS11870	MW2185	<i>sarV</i>	-3,5
	MW_RS11980	MW2206	<i>ureA</i>	-8,4
	MW_RS11985	MW2207	<i>ureB</i>	-6,9
	MW_RS11990	MW2208	<i>ureC</i>	-5,5
	MW_RS11995	MW2209	<i>ureE</i>	-5,0
	MW_RS12000	MW2210	<i>ureF</i>	-4,2
	MW_RS12005	MW2211	<i>ureG</i>	-3,4
	MW_RS12010	MW2212	<i>ureD</i>	-3,3
	MW_RS12360	MW2280	<i>hrtA</i>	3,0
	MW_RS12365	MW2281	<i>hrtB</i>	4,4
	MW_RS12940	MW2384		7,1
	MW_RS13050	MW2405		2,8
	MW_RS13090	MW2412		27,7
	MW_RS13095	MW2413		23,6
	MW_RS13195	MW2433		3,4
	MW_RS13200	MW2434		4,3
	MW_RS13390	MW2471	<i>feoB</i>	-3,3
	MW_RS13580	MW2506		-4,6
	MW_RS13585	MW2507		-5,4
	MW_RS13955	MW2571	<i>asp3</i>	-2,1
	MW_RS13960	MW2572	<i>asp2</i>	-2,2
	MW_RS13965	MW2573	<i>asp1</i>	-2,4
	MW_RS13975	MW2575	<i>sraP</i>	-2,3
	MW_RS14015	MW2582	<i>capC</i>	-4,7
	MW_RS14020	MW2583	<i>capB</i>	-5,4
	MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	2,2
	MW_RS14110	MW2600		-3,4
	MW_RS14170	MW2612	<i>capM</i>	4,4
<i>srrA*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	4,3
	MW_RS00050	MW0010		-2,2
	MW_RS00055	MW0011		-2,4
	MW_RS00265	MW0051	<i>entH</i>	27,2
	MW_RS00270	MW0053		6,4
	MW_RS00370	MW0070	<i>plc</i>	5,3
	MW_RS00420	MW0080	<i>nptA</i>	4,3
	MW_RS00425	MW0081		14,2
	MW_RS00435	MW0083	<i>lctP</i>	-4,5
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-2,4
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-3,6
	MW_RS00655	MW0123	<i>adhE</i>	3,2
	MW_RS00740	MW0140	<i>isdI</i>	-3,1
	MW_RS00745	MW0141		-4,1
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-3,0
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-3,3
	MW_RS00790	MW0150		-3,9
	MW_RS00820	MW0156	<i>argB</i>	2,2
	MW_RS00825	MW0157	<i>argJ</i>	2,1
	MW_RS00830	MW0158	<i>argC</i>	2,1
	MW_RS00835	MW0159	<i>rocD1</i>	2,1
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-3,4
	MW_RS00955	MW0183		-3,9
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-4,2
	MW_RS00965	MW0185		-3,1
	MW_RS01040	MW0200	<i>hptA</i>	2,9
	MW_RS01045	MW0201	<i>pflB</i>	85,4
	MW_RS01050	MW0202	<i>pflA</i>	70,1
	MW_RS01055	MW0203		11,8
	MW_RS01115	MW0213		17,9
	MW_RS01120	MW0214		36,6
	MW_RS01125	MW0215		57,7
	MW_RS01130	MW0216		43,2
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	9,7
	MW_RS01150	MW0218		2,3
	MW_RS01240	MW0235	<i>scdA</i>	42,0
	MW_RS01255	MW0238	<i>lrgA</i>	3,6
	MW_RS01260	MW0239	<i>lrgB</i>	3,4

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>srrA*</i>			
	MW_RS01285	MW0243	3,2
	MW_RS01355	MW0256	-2,3
	MW_RS01485	MW0282	5,3
	MW_RS01495	MW0284	2,1
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i> -2,3
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i> -3,1
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i> -2,8
	MW_RS01690	MW0321	<i>efeU</i> -2,4
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i> -2,6
	MW_RS01755	MW0333	<i>metF</i> -2,8
	MW_RS01795	MW0341	<i>rpsF</i> 2,1
	MW_RS01800	MW0342	2,2
	MW_RS01885	MW0359	-2,5
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i> 2,6
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i> 2,6
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i> -4,2
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i> -4,5
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i> -3,6
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i> -3,4
	MW_RS02260	MW0427	<i>gltD</i> -2,7
	MW_RS02270	MW0428	<i>treP</i> 3,9
	MW_RS02275	MW0429	<i>treC</i> 4,0
	MW_RS02280	MW0430	<i>treR</i> 2,9
	MW_RS02450	MW0456	<i>rplY</i> 2,1
	MW_RS02625	MW0474	<i>pdxS</i> -2,2
	MW_RS02630	MW0475	<i>pdxT</i> -2,4
	MW_RS02730	MW0494	<i>rplJ</i> 2,2
	MW_RS02735	MW0495	<i>rplL</i> 2,4
	MW_RS02800	MW0508	-2,6
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i> 8,9
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i> -5,6
	MW_RS03320	MW0610	<i>fhuB</i> -3,5
	MW_RS03325	MW0611	<i>fhuG</i> -2,3
	MW_RS03400	MW0625	<i>pitR</i> 2,3
	MW_RS03405	MW0626	<i>pitA</i> 2,0
	MW_RS03530	MW0649	3,7
	MW_RS03535	MW0650	2,1
	MW_RS03545	MW0652	2,9
	MW_RS03585	MW0660	<i>fruR</i> 2,9
	MW_RS03590	MW0661	<i>fruB</i> 2,9
	MW_RS03595	MW0662	<i>fruA</i> 2,6
	MW_RS03650	MW0672	<i>queE</i> 2,3
	MW_RS03655	MW0673	<i>queD</i> 2,3
	MW_RS03660	MW0674	<i>queC</i> 2,7
	MW_RS03885	MW0714	<i>hpf</i> -2,1
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i> 2,7
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i> 2,1
	MW_RS04130	MW0760	<i>sel2</i> 7,1
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i> 2,8
	MW_RS04230	MW0780	2,3
	MW_RS04245	MW0783	-2,6
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i> -2,4
	MW_RS04290	MW0791	<i>metP1</i> -2,2
	MW_RS04295	MW0792	<i>metQ1</i> -2,7
	MW_RS04465	MW0825	3,1
	MW_RS04530	MW0838	-3,2
	MW_RS04535	MW0839	<i>rocD2</i> -2,4
	MW_RS04540	MW0840	<i>gluD</i> -2,0
	MW_RS04550	MW0842	<i>argH</i> 6,1
	MW_RS04555	MW0843	<i>argG</i> 6,5
	MW_RS04675	MW0868	<i>oppB</i> -3,8
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i> -4,2
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i> -5,0
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i> -4,5
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i> -4,5
	MW_RS05055	MW0941	<i>qoxD</i> 7,2
	MW_RS05060	MW0942	<i>qoxC</i> 7,2
	MW_RS05065	MW0943	<i>qoxB</i> 7,1
	MW_RS05070	MW0944	<i>qoxA</i> 6,5
	MW_RS05080	MW0945	2,9
	MW_RS05085	MW0946	<i>folD</i> -2,8
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i> -2,2
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i> -2,2
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i> -2,7
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i> -2,2
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i> -2,3
	MW_RS05120	MW0953	<i>purF</i> -2,1
	MW_RS05130	MW0955	<i>purN</i> -2,2

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>srrA*</i>			
	MW_RS05195	MW0967	-2,1
	MW_RS05200	MW0968	22,1
	MW_RS05205	MW0969	23,6
	MW_RS05210	MW0970	2,0
	MW_RS05350	MW0997	-2,1
	MW_RS05355	MW0998	9,0
	MW_RS05360	MW0999	3,3
	MW_RS05365	MW1000	4,2
	MW_RS05435	MW1012	-2,1
	MW_RS05440	MW1013	-5,1
	MW_RS05445	MW1014	-4,9
	MW_RS05450	MW1015	-4,0
	MW_RS05455	MW1016	-2,8
	MW_RS05465	MW1018	-3,2
	MW_RS06120	MW1139	2,2
	MW_RS06125	N/A	2,6
	MW_RS06335	MW1182	-2,1
	MW_RS06505	MW1212	7,7
	MW_RS06520	MW1215	-3,0
	MW_RS06525	MW1216	-2,8
	MW_RS06530	MW1217	-2,6
	MW_RS06555	MW1221	-2,7
	MW_RS06565	MW1223	4,0
	MW_RS06875	MW1281	-4,6
	MW_RS06880	MW1282	-3,0
	MW_RS06885	MW1283	-3,4
	MW_RS06890	MW1284	-2,8
	MW_RS06895	MW1285	-3,0
	MW_RS06900	MW1286	-2,5
	MW_RS06905	MW1287	-2,4
	MW_RS07120	MW1325	24,7
	MW_RS07125	MW1326	74,0
	MW_RS07130	MW1327	116,2
	MW_RS07135	MW1328	165,4
	MW_RS07740	MW1446	915,9
	MW_RS07795	MW1457	-2,0
	MW_RS07955	MW1487	-2,1
	MW_RS07960	MW1488	-2,4
	MW_RS07965	MW1489	-2,2
	MW_RS08415	MW1576	3,1
	MW_RS08465	MW1586	2,0
	MW_RS08600	MW1613	2,3
	MW_RS08605	MW1614	2,3
	MW_RS08610	MW1615	2,7
	MW_RS08615	MW1616	2,3
	MW_RS08670	MW1625	2,4
	MW_RS08740	MW1638	-2,5
	MW_RS08745	MW1639	-2,8
	MW_RS08755	MW1641	2,0
	MW_RS08830	MW1654	3,7
	MW_RS08895	MW1665	-2,2
	MW_RS08900	MW1666	-2,0
	MW_RS08945	MW1674	-3,2
	MW_RS08955	MW1675	-2,9
	MW_RS09255	MW1734	-2,2
	MW_RS09260	MW1735	-2,4
	MW_RS09415	MW1764	5,4
	MW_RS09420	MW1765	11,0
	MW_RS09495	N/A	3,3
	MW_RS09500	MW1772	2,8
	MW_RS09505	MW1773	2,9
	MW_RS09510	MW1774	2,8
	MW_RS09525	MW1776	2,1
	MW_RS09640	MW1798	4,7
	MW_RS09645	MW1799	4,4
	MW_RS09990	MW1834	6,5
	MW_RS10110	MW1855	6,9
	MW_RS10115	MW1856	3,7
	MW_RS10190	MW1870	-2,4
	MW_RS10280	MW1885	4,7
	MW_RS10655	MW1959	11,9
	MW_RS11010	MW2020	-2,3
	MW_RS11045	MW2026	2,4
	MW_RS11050	MW2027	2,3
	MW_RS11055	MW2028	2,2
	MW_RS11060	MW2029	2,1
	MW_RS11065	MW2030	2,2
	MW_RS11070	MW2031	2,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>srrA*</i>	MW_RS11075	MW2032	<i>atpE</i>	2,0
	MW_RS11080	MW2033	<i>atpB</i>	2,4
	MW_RS11085	MW2034	<i>atpI</i>	2,5
	MW_RS11185	MW2054	<i>coaW</i>	2,1
	MW_RS11240	MW2064		4,5
	MW_RS11250	MW2066		2,3
	MW_RS11270	MW2070	<i>czrB</i>	2,0
	MW_RS11275	MW2071		2,6
	MW_RS11295	MW2080	<i>glmS</i>	2,5
	MW_RS11435	MW2100		5,8
	MW_RS11440	MW2101	<i>htsC</i>	-2,5
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-3,9
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-5,4
	MW_RS11535	MW2119	<i>lacC</i>	4,5
	MW_RS11690	MW2151	<i>rpmD</i>	2,0
	MW_RS11820	N/A		2,1
	MW_RS11960	MW2201		-2,3
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-2,5
	MW_RS11970	MW2203		2,4
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-2,9
	MW_RS12205	MW2250		-2,6
	MW_RS12440	MW2295		10,2
	MW_RS12490	MW2304	<i>gltT</i>	2,3
	MW_RS12495	MW2305		8,0
	MW_RS12585	MW2325		12,7
	MW_RS12590	MW2326		11,0
	MW_RS13040	MW2404		-2,2
	MW_RS13050	MW2405		33,0
	MW_RS13185	MW2431		-2,5
	MW_RS13190	MW2432		2,0
	MW_RS13235	MW2441		4,6
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	-11,6
	MW_RS13380	MW2469	<i>clpL</i>	7,8
	MW_RS13595	MW2509	<i>pyrD</i>	9,7
	MW_RS13600	MW2510		3,9
	MW_RS13710	MW2530		3,8
	MW_RS13755	MW2536	<i>nrdG</i>	18,8
	MW_RS13760	MW2537	<i>nrdD</i>	17,4
	MW_RS13850	MW2551	<i>clfB</i>	2,8
	MW_RS14125	MW2603		-2,6
	MW_RS14130	MW2604		-2,4
	MW_RS14135	MW2605		-3,0
	MW_RS14225	MW2624		11,4
	MW_RS14230	MW2625		25,0
	MW_RS14235	MW2626		59,3
	MW_RS14350	MW0052b		7,6
	MW_RS14355	N/A		10,5
	MW_RS14905	MW2120	<i>lacB</i>	6,5
<i>phoP*</i>	MW_RS00050	MW0010		-6,1
	MW_RS00055	MW0011		-5,4
	MW_RS00060	MW0012	<i>metX</i>	-2,2
	MW_RS00120	MW0022	<i>walJ</i>	2,2
	MW_RS00125	MW0023	<i>adsA</i>	6,5
	MW_RS00420	MW0080	<i>nptA</i>	12,0
	MW_RS00430	MW0082		4,1
	MW_RS00435	MW0083	<i>lctP</i>	-3,9
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-2,6
	MW_RS00600	MW0114	<i>phnE1</i>	126,0
	MW_RS00605	MW0115	<i>phnE2</i>	115,6
	MW_RS00610	MW0116	<i>phnC</i>	135,6
	MW_RS00615	MW0117	<i>phnD</i>	197,7
	MW_RS00620	MW0118		201,0
	MW_RS00625	MW0119		56,7
	MW_RS00630	N/A		111,2
	MW_RS00755	MW0143		4,6
	MW_RS00760	MW0144		3,4
	MW_RS00765	MW0145		-7,2
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-10,2
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-8,0
	MW_RS00780	MW0148	<i>ssuC</i>	-5,6
	MW_RS00785	MW0149		-4,4
	MW_RS00815	MW0155		6,5
	MW_RS00840	MW0160	<i>brnQ1</i>	-2,7
	MW_RS00845	MW0161		2,1
	MW_RS00860	MW0163	<i>glcA</i>	3,0
	MW_RS00875	MW0166	<i>murP</i>	3,5
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-3,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>				
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-4,3
	MW_RS00955	MW0183		-4,2
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-4,0
	MW_RS00965	MW0185		-2,4
	MW_RS01060	MW0204	<i>glpQ1</i>	-3,5
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	21,8
	MW_RS01305	MW0246	<i>rbsU</i>	2,6
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	3,1
	MW_RS01355	MW0256		-2,4
	MW_RS01485	MW0282		13,1
	MW_RS01495	MW0284		-2,6
	MW_RS01505	MW0285		2,3
	MW_RS01515	MW0287		-2,4
	MW_RS01545	MW0293	<i>nanK</i>	-2,5
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	4,9
	MW_RS01585	MW0300		2,3
	MW_RS01590	MW0301		2,9
	MW_RS01595	MW0302		3,1
	MW_RS01600	MW0303		2,5
	MW_RS01605	MW0304		2,8
	MW_RS01675	MW0318		-6,1
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-5,1
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-2,7
	MW_RS01740	MW0330		2,5
	MW_RS01745	MW0331	<i>mdh</i>	-2,1
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-3,9
	MW_RS01755	MW0333	<i>metF</i>	-4,9
	MW_RS01760	MW0334	<i>metC</i>	-4,3
	MW_RS01765	MW0335	<i>metI</i>	-4,4
	MW_RS01795	MW0341	<i>rpsF</i>	3,0
	MW_RS01800	MW0342		3,2
	MW_RS01805	MW0343	<i>rpsR</i>	2,9
	MW_RS01885	MW0359		-3,1
	MW_RS01905	MW0363		4,1
	MW_RS01910	MW0364	<i>xpt</i>	-4,0
	MW_RS01915	MW0365	<i>pbuX</i>	-3,2
	MW_RS01995	MW0379	<i>pcp</i>	-3,1
	MW_RS02095	MW0396		-3,0
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,0
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,5
	MW_RS02165	MW0409		2,5
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-14,0
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-9,0
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-7,5
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-5,5
	MW_RS02260	MW0427	<i>gltD</i>	-3,2
	MW_RS02270	MW0428	<i>treP</i>	2,1
	MW_RS02450	MW0456	<i>rplY</i>	3,0
	MW_RS02515	MW0469	<i>folP</i>	-2,2
	MW_RS02530	N/A		2,7
	MW_RS02720	MW0492	<i>rplK</i>	2,9
	MW_RS02725	MW0493	<i>rplI</i>	3,7
	MW_RS02730	MW0494	<i>rplJ</i>	3,4
	MW_RS02735	MW0495	<i>rplL</i>	3,9
	MW_RS02740	MW0496		2,5
	MW_RS02755	MW0499		3,0
	MW_RS02760	MW0500	<i>rpsL</i>	3,3
	MW_RS02765	MW0501	<i>rpsG</i>	3,6
	MW_RS02770	MW0502	<i>fusA</i>	3,6
	MW_RS02775	MW0503	<i>tuf</i>	2,8
	MW_RS02895	MW0527		-2,5
	MW_RS03055	MW0558		3,9
	MW_RS03070	MW0561		3,4
	MW_RS03080	MW0562		2,5
	MW_RS03095	MW0565		-2,2
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	2,4
	MW_RS03120	MW0570		-2,9
	MW_RS03135	MW0573		-2,8
	MW_RS03155	MW0577		3,7
	MW_RS03355	MW0617		-2,5
	MW_RS03490	MW0641		2,3
	MW_RS03540	MW0651		2,7
	MW_RS03585	MW0660	<i>fruR</i>	3,1
	MW_RS03590	MW0661	<i>fruB</i>	3,2
	MW_RS03595	MW0662	<i>fruA</i>	3,2
	MW_RS03645	MW0671		2,5
	MW_RS03650	MW0672	<i>queE</i>	2,1
	MW_RS03655	MW0673	<i>queD</i>	2,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>				
	MW_RS03725	MW0686	<i>hisC</i>	-2,5
	MW_RS03855	MW0708		2,3
	MW_RS03895	N/A		22,1
	MW_RS03915	MW0718		-2,4
	MW_RS03970	MW0728		2,6
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	3,4
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,7
	MW_RS04010	MW0735	<i>pgk</i>	2,1
	MW_RS04015	MW0736	<i>tpiA</i>	2,0
	MW_RS04155	MW0764	<i>clfA</i>	2,5
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i>	112,5
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	2,3
	MW_RS04185	MW0771		3,4
	MW_RS04190	MW0772		3,2
	MW_RS04215	MW0777		3,6
	MW_RS04225	MW0779		-3,4
	MW_RS04245	MW0783		-2,2
	MW_RS04275	MW0788		11,8
	MW_RS04280	MW0789		13,7
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-3,9
	MW_RS04290	MW0791	<i>metP1</i>	-4,2
	MW_RS04295	MW0792	<i>metQ1</i>	-4,0
	MW_RS04530	MW0838		-3,6
	MW_RS04545	MW0841	<i>glpQ</i>	10,2
	MW_RS04565	MW0845		4,1
	MW_RS04570	MW0846	<i>spsA</i>	2,6
	MW_RS04575	MW0847	<i>spsB</i>	2,9
	MW_RS04660	MW0865	<i>fabH</i>	2,5
	MW_RS04665	MW0866	<i>fabF</i>	2,3
	MW_RS04675	MW0868	<i>oppB</i>	-8,4
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-7,7
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-8,0
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-8,0
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-7,3
	MW_RS04765	MW0886		-2,4
	MW_RS04805	MW0894		-2,0
	MW_RS05010	MW0933	<i>patA</i>	-2,9
	MW_RS05035	MW0937		-3,4
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>	-5,3
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-6,2
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-5,2
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-4,9
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-4,9
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-6,2
	MW_RS05120	MW0953	<i>purF</i>	-6,5
	MW_RS05125	MW0954	<i>purM</i>	-5,9
	MW_RS05130	MW0955	<i>purN</i>	-5,4
	MW_RS05135	MW0956	<i>purH</i>	-4,7
	MW_RS05140	MW0957	<i>purD</i>	-4,0
	MW_RS05195	MW0967		-2,7
	MW_RS05290	MW0985	<i>potD</i>	2,7
	MW_RS05325	MW0992	<i>typA</i>	2,3
	MW_RS05415	MW1009		2,4
	MW_RS05420	N/A		3,6
	MW_RS05425	MW1010		2,5
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-2,4
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	4,1
	MW_RS05535	MW1031	<i>sdhA</i>	2,6
	MW_RS05540	MW1032	<i>sdhB</i>	2,0
	MW_RS05580	MW1039		3,7
	MW_RS05805	MW1079	<i>ispA</i>	2,1
	MW_RS05810	MW1080		2,1
	MW_RS05835	MW1085	<i>carA</i>	-2,6
	MW_RS05965	MW1111	<i>fapR</i>	4,6
	MW_RS05970	MW1112	<i>plsX</i>	4,4
	MW_RS05975	MW1113	<i>fabD</i>	4,7
	MW_RS05980	MW1114	<i>fabG</i>	4,2
	MW_RS05985	N/A		2,8
	MW_RS06035	MW1124	<i>rplS</i>	2,8
	MW_RS06120	MW1139	<i>rpsB</i>	2,5
	MW_RS06125	N/A		3,4
	MW_RS06130	MW1140	<i>tsf</i>	2,3
	MW_RS06200	MW1154	<i>truB</i>	2,3
	MW_RS06210	MW1156	<i>rpsO</i>	2,7
	MW_RS06300	MW1174		-2,4
	MW_RS06335	MW1182	<i>glpF</i>	-2,0
	MW_RS06510	MW1213		2,7
	MW_RS06520	MW1215	<i>dhoM</i>	-5,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>				
	MW_RS06525	MW1216	<i>thrC</i>	-4,2
	MW_RS06530	MW1217	<i>thrB</i>	-4,0
	MW_RS06550	MW1220		-2,0
	MW_RS06555	MW1221	<i>kata</i>	-2,4
	MW_RS06635	MW1236	<i>opuD</i>	2,3
	MW_RS06785	MW1265		-2,1
	MW_RS06830	MW1273	<i>phoU</i>	729,0
	MW_RS06835	MW1274	<i>pstB</i>	1350,8
	MW_RS06840	MW1275	<i>pstA</i>	1810,6
	MW_RS06845	MW1276	<i>pstC</i>	2170,3
	MW_RS06850	MW1277	<i>pstS</i>	6281,4
	MW_RS06880	MW1282	<i>asd</i>	-3,1
	MW_RS06885	MW1283	<i>dapA</i>	-3,6
	MW_RS06890	MW1284	<i>dapB</i>	-3,4
	MW_RS06895	MW1285	<i>dapH</i>	-3,7
	MW_RS06900	MW1286	<i>dapI</i>	-2,9
	MW_RS06905	MW1287	<i>alr2</i>	-2,9
	MW_RS07120	MW1325	<i>norB</i>	3,5
	MW_RS07125	MW1326		9,0
	MW_RS07130	MW1327	<i>tdcB</i>	13,0
	MW_RS07135	MW1328	<i>ald1</i>	17,7
	MW_RS07165	MW1332		2,1
	MW_RS07195	MW1339	<i>recU</i>	2,4
	MW_RS07280	MW1356	<i>aroC</i>	-2,3
	MW_RS07345	MW1367	<i>ansA</i>	-2,0
	MW_RS07720	MW1443		2,2
	MW_RS07730	MW1444		2,7
	MW_RS07795	MW1457	<i>proC</i>	-2,2
	MW_RS07880	MW1472	<i>recN</i>	2,1
	MW_RS07885	MW1473	<i>argR</i>	2,5
	MW_RS08210	MW1537	<i>rpsT</i>	2,3
	MW_RS08305	MW1555	<i>pxpA</i>	-2,5
	MW_RS08480	MW1589	<i>tgt</i>	2,5
	MW_RS08510	MW1595	<i>rpmA</i>	2,6
	MW_RS08515	N/A		2,8
	MW_RS08520	MW1597	<i>rplU</i>	2,5
	MW_RS08535	MW1600		-2,6
	MW_RS08580	MW1609		2,8
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	2,1
	MW_RS08720	N/A		2,5
	MW_RS08730	MW1637	<i>phoP</i>	1218,5
	MW_RS08875	MW1662	<i>rpsD</i>	2,7
	MW_RS08895	MW1665		-5,7
	MW_RS08900	MW1666	<i>serA</i>	-4,2
	MW_RS08905	N/A		-3,0
	MW_RS08930	MW1671	<i>tyrS</i>	2,2
	MW_RS08975	MW1679	<i>ccpA</i>	-2,0
	MW_RS08985	MW1680	<i>aroA2</i>	-2,7
	MW_RS09035	MW1689		2,2
	MW_RS09085	MW1699	<i>sacC</i>	4,2
	MW_RS09145	MW1710	<i>ribB</i>	-2,4
	MW_RS09150	MW1711	<i>ribD</i>	-2,8
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	6,6
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	9,0
	MW_RS09400	MW1761	<i>bsaP</i>	6,8
	MW_RS09405	MW1762	<i>bsaD</i>	13,8
	MW_RS09410	MW1763	<i>bsaC</i>	7,7
	MW_RS09415	MW1764	<i>bsaB</i>	10,5
	MW_RS09420	MW1765	<i>bsaA2</i>	49,3
	MW_RS09425	MW1766	<i>bsaA1</i>	27,2
	MW_RS09445	MW1770		2,4
	MW_RS09615	N/A		-3,6
	MW_RS09845	MW1808		-2,3
	MW_RS09850	MW1809		2,3
	MW_RS09860	MW1810		2,1
	MW_RS10150	MW1861	<i>aldH</i>	-2,4
	MW_RS10165	MW1865		3,1
	MW_RS10170	MW1866		-2,4
	MW_RS10190	MW1870		-4,1
	MW_RS10705	MW1968		-3,3
	MW_RS10710	MW1969		-4,4
	MW_RS10760	MW1977	<i>ilvD</i>	-5,2
	MW_RS10950	MW2008		6,1
	MW_RS11035	MW2025		3,2
	MW_RS11170	MW2051	<i>pyrG</i>	2,6
	MW_RS11195	MW2056		-2,0
	MW_RS11200	MW2057	<i>hmrA</i>	-2,9
	MW_RS11215	MW2060	<i>pdp</i>	2,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>	MW_RS11220	N/A		3,2
	MW_RS11225	MW2061	<i>deoC2</i>	2,9
	MW_RS11250	MW2066		2,7
	MW_RS11255	MW2067	<i>manA</i>	2,4
	MW_RS11265	MW2069	<i>czrA</i>	-2,7
	MW_RS11295	MW2080	<i>glmS</i>	2,6
	MW_RS11435	MW2100		2,4
	MW_RS11465	MW2105		2,0
	MW_RS11600	MW2131		4,6
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	5,2
	MW_RS11615	MW2136	<i>rpsI</i>	2,4
	MW_RS11635	MW2140	<i>ecfA2</i>	-2,0
	MW_RS11640	MW2141	<i>ecfA1</i>	-2,6
	MW_RS11645	MW2142	<i>rplQ</i>	3,2
	MW_RS11650	MW2143	<i>rpoA</i>	3,1
	MW_RS11655	MW2144	<i>rpsK</i>	2,9
	MW_RS11660	MW2145	<i>rpsM</i>	2,9
	MW_RS11665	MW2146	<i>rpmJ</i>	2,8
	MW_RS11670	MW2147	<i>infA</i>	3,7
	MW_RS11675	MW2148	<i>adk</i>	3,1
	MW_RS11680	MW2149	<i>secY</i>	3,5
	MW_RS11685	MW2150	<i>rplO</i>	3,7
	MW_RS11690	MW2151	<i>rpmD</i>	4,0
	MW_RS11695	MW2152	<i>rpsE</i>	3,7
	MW_RS11700	MW2153	<i>rplR</i>	3,8
	MW_RS11705	MW2154	<i>rplF</i>	3,5
	MW_RS11710	MW2155	<i>rpsH</i>	4,1
	MW_RS11715	MW2156	<i>rpsZ</i>	3,6
	MW_RS11720	MW2157	<i>rplE</i>	3,6
	MW_RS11725	MW2158	<i>rplX</i>	3,2
	MW_RS11730	MW2159	<i>rplN</i>	3,5
	MW_RS11735	MW2160	<i>rpsQ</i>	3,4
	MW_RS11740	MW2161	<i>rpmC</i>	2,9
	MW_RS11745	MW2162	<i>rplP</i>	3,4
	MW_RS11750	MW2163	<i>rpsC</i>	3,4
	MW_RS11755	MW2164	<i>rplV</i>	3,3
	MW_RS11760	MW2165	<i>rpsS</i>	3,2
	MW_RS11765	MW2166	<i>rplB</i>	3,5
	MW_RS11770	MW2167	<i>rplW</i>	3,0
	MW_RS11775	MW2168	<i>rplD</i>	3,0
	MW_RS11780	MW2169	<i>rplC</i>	2,5
	MW_RS11785	MW2170	<i>rpsJ</i>	2,4
	MW_RS11820	N/A		2,2
	MW_RS11855	MW2182		-2,1
	MW_RS11960	MW2201		-2,5
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-3,2
	MW_RS12045	MW2218		4,3
	MW_RS12110	MW2231		2,1
	MW_RS12165	MW2242		-2,7
	MW_RS12190	MW2247		-2,3
	MW_RS12205	MW2250		-3,0
	MW_RS12265	MW2261		-2,8
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	5,3
	MW_RS12405	MW2289		4,3
	MW_RS12465	MW2299	<i>scrA</i>	2,3
	MW_RS12500	MW2306	<i>sarZ</i>	-2,4
	MW_RS12560	MW2320	<i>nasF</i>	2,6
	MW_RS12565	MW2321	<i>nasE</i>	3,3
	MW_RS12570	MW2322	<i>nasD</i>	3,0
	MW_RS12595	MW2327		-3,4
	MW_RS12645	MW2336	<i>tcyA</i>	-2,2
	MW_RS12655	N/A		6,2
	MW_RS12660	MW2338		3,7
	MW_RS12765	MW2355		3,7
	MW_RS12845	MW2368		-2,1
	MW_RS12905	MW2378		3,7
	MW_RS12990	MW2395		4,2
	MW_RS12995	MW2396		2,5
	MW_RS13000	MW2397		-2,7
	MW_RS13045	N/A		2,2
	MW_RS13050	MW2405		2,4
	MW_RS13195	MW2433		-2,2
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	4,3
	MW_RS13275	MW2449		-2,3
	MW_RS13280	MW2450		-3,9
	MW_RS13290	MW2451	<i>sdaAA</i>	2,5
	MW_RS13295	MW2452	<i>sdaAB</i>	2,7
	MW_RS13305	MW2454		198,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>				
	MW_RS13310	MW2455		2,0
	MW_RS13320	MW2457		-2,2
	MW_RS13325	MW2458		-2,1
	MW_RS13335	MW2460	<i>cidC</i>	3,8
	MW_RS13340	MW2461	<i>cidB</i>	3,4
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	3,5
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-2,2
	MW_RS13365	MW2466	<i>mvaA</i>	2,1
	MW_RS13375	MW2468	<i>adaB</i>	2,5
	MW_RS13465	MW2485	<i>crtP</i>	3,5
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	7,4
	MW_RS13480	MW2488	<i>oatA</i>	2,4
	MW_RS13495	MW2491		-4,5
	MW_RS13645	MW2518	<i>panB</i>	-2,2
	MW_RS13670	MW2522		-2,6
	MW_RS13680	MW2524		6,5
	MW_RS13695	N/A		2,7
	MW_RS13705	MW2529		8,7
	MW_RS13730	MW2533		-2,1
	MW_RS13825	MW2546		3,1
	MW_RS13835	MW2547	<i>phoB</i>	435,2
	MW_RS13850	MW2551	<i>clfB</i>	2,1
	MW_RS13855	MW2552	<i>arcR</i>	2,0
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	2,1
	MW_RS13900	MW2560		-2,7
	MW_RS13925	MW2565		5,3
	MW_RS14115	MW2601		-3,4
	MW_RS14120	MW2602		-2,6
	MW_RS14125	MW2603		-3,3
	MW_RS14130	MW2604		-4,1
	MW_RS14135	MW2605		-4,5
	MW_RS14160	MW2610	<i>pcp</i>	-2,1
	MW_RS14200	MW2619		4,9
	MW_RS14265	MW2632	<i>rpmH</i>	2,7
	MW_RS14305	MW1758	<i>bsaG</i>	6,8
	MW_RS14365	N/A		2,6
	MW_RS14400	N/A		3,3
	MW_RS14445	N/A		-4,9
	MW_RS14480	N/A		-2,9
	MW_RS14515	N/A		4,2
	MW_RS14665	N/A		2,1
	MW_RS14865	N/A		-2,0
	MW_RS14995	N/A		-3,8
	MW_RS15000	N/A		-4,6
	MW_RS15020	N/A		2,7
<i>airR*</i>				
	MW_RS00050	MW0010		-2,1
	MW_RS00055	MW0011		-2,4
	MW_RS00125	MW0023	<i>adsA</i>	-2,1
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-2,6
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-3,5
	MW_RS00815	MW0155		4,6
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-2,2
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-2,5
	MW_RS00955	MW0183		-2,1
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-2,4
	MW_RS00965	MW0185		-2,2
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	8,6
	MW_RS01355	MW0256		-2,1
	MW_RS01485	MW0282		7,4
	MW_RS01495	MW0284		-2,4
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	-2,9
	MW_RS01775	MW0337		4,6
	MW_RS01780	MW0338		3,4
	MW_RS01785	MW0339	<i>ychF</i>	2,8
	MW_RS01995	MW0379	<i>pcp</i>	-2,2
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,3
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	2,5
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,7
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-3,3
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,7
	MW_RS02220	MW0419	<i>sle</i>	-2,4
	MW_RS02240	MW0423		2,2
	MW_RS02825	MW0513	<i>tadA</i>	-2,4
	MW_RS02830	MW0514		35,7
	MW_RS02835	MW0515	<i>azo1</i>	34,5
	MW_RS02845	MW0517	<i>sdrD</i>	-3,2
	MW_RS02925	MW0534	<i>vraX</i>	93,6

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>airR*</i>			
	MW_RS02995	MW0548	-2,1
	MW_RS03000	MW0549	7,2
	MW_RS03155	MW0577	2,6
	MW_RS03255	MW0597	4,0
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>
	MW_RS03510	MW0645	<i>uppP</i>
	MW_RS03790	MW0695	<i>sstA</i>
	MW_RS03895	N/A	25,2
	MW_RS03910	MW0717	-3,2
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>
	MW_RS04430	MW0818	13,6
	MW_RS04565	MW0845	23,9
	MW_RS04570	MW0846	<i>spsA</i>
	MW_RS04575	MW0847	<i>spsB</i>
	MW_RS05020	MW0935	-2,1
	MW_RS05080	MW0945	17,2
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>
	MW_RS05170	MW0962	7,5
	MW_RS05270	MW0981	-2,7
	MW_RS05275	MW0982	<i>potA</i>
	MW_RS05435	MW1012	<i>isdA</i>
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>
	MW_RS05450	MW1015	<i>isdE</i>
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>
	MW_RS05600	N/A	-2,5
	MW_RS06290	MW1172	13,1
	MW_RS06295	MW1173	12,5
	MW_RS06300	MW1174	2,4
	MW_RS06470	MW1205	<i>cls1</i>
	MW_RS06505	MW1212	2,1
	MW_RS06570	MW1224	<i>guaC</i>
	MW_RS06575	N/A	7,0
	MW_RS06580	MW1225	3,7
	MW_RS06645	MW1237	<i>acnA</i>
	MW_RS06710	MW1249	<i>msrR</i>
	MW_RS06935	MW1292	<i>acyP</i>
	MW_RS06940	MW1293	<i>xpaC</i>
	MW_RS06945	MW1294	2,2
	MW_RS07025	MW1309	<i>tnp</i>
	MW_RS07030	MW1310	<i>ctpA</i>
	MW_RS07040	MW1311	5,3
	MW_RS07045	MW1312	<i>crr</i>
	MW_RS07050	MW1313	<i>msrB</i>
	MW_RS07055	MW1314	<i>msrA2</i>
	MW_RS07115	MW1324	<i>ebh</i>
	MW_RS07195	MW1339	<i>recU</i>
	MW_RS07200	MW1340	<i>pbp2</i>
	MW_RS07340	MW1366	<i>cmk</i>
	MW_RS07375	MW1372	<i>fer</i>
	MW_RS07885	MW1473	<i>argR</i>
	MW_RS08040	MW1503	<i>rpmG</i>
	MW_RS08050	MW1505	<i>sodA</i>
	MW_RS08535	MW1600	4,0
	MW_RS08540	MW1601	23,1
	MW_RS08925	MW1670	<i>hrtA1</i>
	MW_RS09315	MW1745	<i>tnp</i>
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>
	MW_RS09550	MW1782	<i>prsA</i>
	MW_RS09590	MW1789	<i>airR</i>
	MW_RS09825	MW1805	8,2
	MW_RS09845	MW1808	-2,3
	MW_RS09880	MW1814	<i>mgt</i>
	MW_RS09910	MW1820	2,0
	MW_RS10010	MW1837	2,9
	MW_RS10015	MW1838	<i>rumA</i>
	MW_RS10045	MW1843	<i>putP</i>
	MW_RS10705	MW1968	-2,1
	MW_RS10710	MW1969	-2,2
	MW_RS11085	MW2034	<i>atpI</i>
	MW_RS11090	MW2035	<i>mnaA</i>
	MW_RS11095	MW2036	<i>upp</i>
	MW_RS11100	MW2037	<i>glyA</i>

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>airR*</i>	MW_RS11105	MW2038		2,3
	MW_RS11215	MW2060	<i>pdp</i>	2,0
	MW_RS11225	MW2061	<i>deoC2</i>	2,1
	MW_RS11295	MW2080	<i>glmS</i>	2,3
	MW_RS11320	MW2086	<i>fmtB</i>	-2,9
	MW_RS11400	MW2093	<i>lmrS</i>	2,2
	MW_RS11405	MW2094	<i>sepA</i>	4,5
	MW_RS11410	MW2095	<i>sdrM</i>	7,0
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-2,0
	MW_RS11575	MW2127		2,2
	MW_RS11795	MW2172	<i>pbuG</i>	-2,0
	MW_RS11870	MW2185	<i>sarV</i>	-2,1
	MW_RS12000	MW2210	<i>ureF</i>	2,1
	MW_RS12010	MW2212	<i>ureD</i>	2,1
	MW_RS12030	MW2215	<i>sarY</i>	-3,5
	MW_RS12035	MW2216		-4,3
	MW_RS12105	MW2230		4,8
	MW_RS12170	MW2243		36,2
	MW_RS12340	MW2277	<i>tcaA</i>	9,1
	MW_RS12345	N/A		7,9
	MW_RS12505	MW2307		2,2
	MW_RS12510	MW2308	<i>narT</i>	3,6
	MW_RS12655	N/A		3,9
	MW_RS12770	MW2356	<i>glxK</i>	19,0
	MW_RS12775	MW2357		32,8
	MW_RS13165	MW2426		2,1
	MW_RS13170	MW2427		2,1
	MW_RS13195	MW2433		-4,8
	MW_RS13200	MW2434		-2,9
	MW_RS13425	MW2477		52,3
	MW_RS13705	MW2529		5,8
	MW_RS13770	MW2539	<i>cysG</i>	81,9
	MW_RS13775	MW2540	<i>cysJ</i>	72,0
	MW_RS13790	N/A		2,5
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	2,5
	MW_RS14020	MW2583	<i>capB</i>	-2,5
	MW_RS14155	MW2609		81,3
	MW_RS14480	N/A		-2,3
	MW_RS14510	MW0529b		56,0
	MW_RS14865	N/A		-2,2
<i>vraR*</i>	MW_RS00305	MW0058	<i>sqr</i>	3,5
	MW_RS00430	MW0082		4,8
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-2,9
	MW_RS00755	MW0143		4,1
	MW_RS00815	MW0155		4,6
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	14,5
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	3,4
	MW_RS01485	MW0282		12,6
	MW_RS01505	MW0285		2,7
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,6
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,1
	MW_RS02165	MW0409		2,1
	MW_RS02195	MW0414	<i>cysM</i>	-2,0
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-2,6
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,2
	MW_RS02925	MW0534	<i>vraX</i>	4,5
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	2,3
	MW_RS03155	MW0577		3,3
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-3,0
	MW_RS03320	MW0610	<i>fhuB</i>	-2,0
	MW_RS03410	MW0627		-2,2
	MW_RS03490	MW0641		2,7
	MW_RS03740	MW0688		3,4
	MW_RS03790	MW0695	<i>sstA</i>	-4,6
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	2,5
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,1
	MW_RS04110	MW0756		2,2
	MW_RS04185	MW0771		4,0
	MW_RS04190	MW0772		3,5
	MW_RS04245	MW0783		-2,4
	MW_RS04345	MW0802		2,3
	MW_RS04550	MW0842	<i>argH</i>	2,8
	MW_RS04565	MW0845		2,8
	MW_RS05080	MW0945		3,6
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-2,5
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-2,6
	MW_RS05180	MW0964		2,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>vraR*</i>				
	MW_RS05270	MW0981		-2,4
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	-3,8
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-3,6
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	2,9
	MW_RS06200	MW1154	<i>truB</i>	2,4
	MW_RS07720	MW1443		2,8
	MW_RS07730	MW1444		3,5
	MW_RS07885	MW1473	<i>argR</i>	2,2
	MW_RS08040	MW1503	<i>rpmG</i>	-2,2
	MW_RS08535	MW1600		2,1
	MW_RS08540	MW1601		12,8
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	2,4
	MW_RS08925	MW1670	<i>hrtA1</i>	2,0
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	5,0
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	6,8
	MW_RS09540	MW1779		3,4
	MW_RS09550	MW1782	<i>prsA</i>	4,2
	MW_RS09640	MW1798	<i>glnQ</i>	4,0
	MW_RS09645	MW1799		4,1
	MW_RS09880	MW1814	<i>mgt</i>	2,8
	MW_RS09930	MW1824	<i>vraR</i>	1703,2
	MW_RS09990	MW1834	<i>ftnA</i>	2,7
	MW_RS10130	MW1858		3,2
	MW_RS11035	MW2025		3,3
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-2,2
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-2,9
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	2,9
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-2,7
	MW_RS12040	MW2217	<i>ssaA2</i>	-2,2
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-4,1
	MW_RS12110	MW2231		2,1
	MW_RS12170	MW2243		6,5
	MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	-2,1
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	4,9
	MW_RS12655	N/A		7,2
	MW_RS12660	MW2338		3,7
	MW_RS12765	MW2355		5,9
	MW_RS12770	MW2356	<i>glxK</i>	2,5
	MW_RS12775	MW2357		3,8
	MW_RS12905	MW2378		4,0
	MW_RS13050	MW2405		2,9
	MW_RS13170	MW2427		2,1
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-2,9
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	5,2
	MW_RS13490	MW2490	<i>isaA</i>	-2,4
	MW_RS13705	MW2529		7,3
	MW_RS13730	MW2533		-2,0
	MW_RS13995	MW2578		3,5
	MW_RS14400	N/A		3,7
	MW_RS14795	MW1780		3,7
<i>agrA*</i>				
	MW_RS00305	MW0058	<i>sqr</i>	4,1
	MW_RS00430	MW0082		6,2
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-3,0
	MW_RS00755	MW0143		5,6
	MW_RS00760	MW0144		4,8
	MW_RS00815	MW0155		5,5
	MW_RS00845	MW0161		2,3
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-2,4
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-2,4
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	25,1
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	4,0
	MW_RS01480	MW0281		2,2
	MW_RS01485	MW0282		25,9
	MW_RS01505	MW0285		3,6
	MW_RS01510	MW0286		2,7
	MW_RS01545	MW0293	<i>nanK</i>	-2,4
	MW_RS01675	MW0318		-2,5
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-2,4
	MW_RS01905	MW0363		3,6
	MW_RS01910	MW0364	<i>xpt</i>	-2,1
	MW_RS01935	MW0370		2,4
	MW_RS01940	MW0372		4,5
	MW_RS01945	N/A		12,5
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,5
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	2,8
	MW_RS02195	MW0414	<i>cysM</i>	-2,3
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>agrA*</i>				
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,7
	MW_RS02220	MW0419	<i>sle</i>	-2,3
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	2,8
	MW_RS03155	MW0577		4,5
	MW_RS03295	MW0605	<i>abcA</i>	2,0
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-2,3
	MW_RS03410	MW0627		-2,4
	MW_RS03490	MW0641		3,2
	MW_RS03505	MW0644		3,7
	MW_RS03575	MW0658		-2,7
	MW_RS03615	MW0665		3,1
	MW_RS03740	MW0688		4,2
	MW_RS03970	MW0728		3,0
	MW_RS03975	MW0729	<i>whiA</i>	2,1
	MW_RS03990	MW0731		3,6
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	3,0
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,4
	MW_RS04010	MW0735	<i>pgk</i>	2,1
	MW_RS04155	MW0764	<i>clfA</i>	4,0
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	2,9
	MW_RS04185	MW0771		4,7
	MW_RS04190	MW0772		4,5
	MW_RS04205	MW0775		2,6
	MW_RS04215	MW0777		4,3
	MW_RS04245	MW0783		-2,1
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,1
	MW_RS04345	MW0802		2,6
	MW_RS04955	MW0922		6,2
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-2,9
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-2,7
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-3,0
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2,4
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2,3
	MW_RS05180	MW0964		2,6
	MW_RS05270	MW0981		-2,6
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	-3,0
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-2,7
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	3,2
	MW_RS05690	MW1056	<i>psmβ1</i>	104,7
	MW_RS05695	MW1057	<i>psmβ2</i>	214,0
	MW_RS05895	MW1097		3,4
	MW_RS06200	MW1154	<i>truB</i>	2,9
	MW_RS07345	MW1367	<i>ansA</i>	-2,1
	MW_RS07720	MW1443		3,3
	MW_RS07730	MW1444		4,0
	MW_RS07885	MW1473	<i>argR</i>	2,2
	MW_RS08275	MW1550	<i>mtnN</i>	-2,0
	MW_RS08535	MW1600		-4,2
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	2,6
	MW_RS09170	MW1715		-2,0
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	6,8
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	8,7
	MW_RS09400	MW1761	<i>bsaP</i>	3,7
	MW_RS09540	MW1779		4,3
	MW_RS10130	MW1858		3,2
	MW_RS10165	MW1865		2,9
	MW_RS10640	MW1956		-2,1
	MW_RS10655	MW1959	<i>hld</i>	125,1
	MW_RS10675	MW1963	<i>agrA</i>	1470,6
	MW_RS10680	N/A		4,1
	MW_RS10705	MW1968		-2,3
	MW_RS10710	MW1969		-2,6
	MW_RS10950	MW2008		3,2
	MW_RS11010	MW2020	<i>sceD</i>	-2,4
	MW_RS11035	MW2025		4,5
	MW_RS11145	MW2046	<i>aldH</i>	3,5
	MW_RS11265	MW2069	<i>czrA</i>	-2,6
	MW_RS11310	MW2084	<i>mtlF</i>	2,5
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-2,6
	MW_RS11465	MW2105		2,5
	MW_RS11495	MW2111	<i>opuD2</i>	2,4
	MW_RS11600	MW2131		2,9
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	3,6
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-2,5
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-6,2
	MW_RS12110	MW2231		2,5
	MW_RS12135	MW2236		3,1
	MW_RS12225	MW2254	<i>hutG</i>	3,7

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>agrA*</i>				
	MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	-2,4
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	5,5
	MW_RS12480	MW2302		3,7
	MW_RS12655	N/A		7,6
	MW_RS12660	MW2338		3,8
	MW_RS12765	MW2355		7,1
	MW_RS12890	MW2375	<i>pnbA</i>	3,6
	MW_RS12900	MW2377		4,8
	MW_RS12905	MW2378		5,9
	MW_RS12990	MW2395		4,5
	MW_RS12995	MW2396		3,3
	MW_RS13050	MW2405		3,2
	MW_RS13235	MW2441		2,7
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	3,7
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	3,3
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-3,5
	MW_RS13465	MW2485	<i>crtP</i>	4,4
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	7,6
	MW_RS13490	MW2490	<i>isaA</i>	-2,6
	MW_RS13680	MW2524		6,7
	MW_RS13705	MW2529		9,0
	MW_RS13730	MW2533		-2,4
	MW_RS13995	MW2578		4,5
	MW_RS14185	MW2616		4,3
	MW_RS14200	MW2619		7,5
	MW_RS14305	MW1758	<i>bsaG</i>	6,0
	MW_RS14400	N/A		5,2
	MW_RS14485	N/A		64,9
	MW_RS14515	N/A		6,8
	MW_RS14795	MW1780		4,6
<i>kpdE*</i>				
	MW_RS00050	MW0010		-2,3
	MW_RS00055	MW0011		-2,1
	MW_RS00060	MW0012	<i>metX</i>	-2,4
	MW_RS00305	MW0058	<i>sqr</i>	4,0
	MW_RS00385	MW0073		2,3
	MW_RS00390	MW0074		2,6
	MW_RS00395	MW0075		3,2
	MW_RS00400	MW0076		2,2
	MW_RS00410	MW0078		4,2
	MW_RS00415	MW0079		3,3
	MW_RS00430	MW0082		6,2
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-2,4
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-4,5
	MW_RS00525	MW0100	<i>butA</i>	2,7
	MW_RS00615	MW0117	<i>phnD</i>	2,8
	MW_RS00660	MW0124	<i>cap8A</i>	31,0
	MW_RS00665	MW0125	<i>cap8B</i>	16,8
	MW_RS00670	MW0126	<i>cap8C</i>	26,2
	MW_RS00675	MW0127	<i>cap8D</i>	19,6
	MW_RS00680	MW0128	<i>cap8E</i>	13,8
	MW_RS00695	MW0131	<i>cap8H</i>	9,5
	MW_RS00700	MW0132	<i>cap8I</i>	6,3
	MW_RS00705	MW0133	<i>cap8J</i>	4,3
	MW_RS00710	MW0134	<i>cap8K</i>	4,7
	MW_RS00715	MW0135	<i>cap8L</i>	3,5
	MW_RS00720	MW0136	<i>cap8M</i>	3,0
	MW_RS00725	MW0137	<i>cap8N</i>	2,8
	MW_RS00730	MW0138	<i>cap8O</i>	3,1
	MW_RS00755	MW0143		5,5
	MW_RS00760	MW0144		5,1
	MW_RS00765	MW0145		-3,5
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-5,3
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-4,9
	MW_RS00780	MW0148	<i>ssuC</i>	-4,1
	MW_RS00785	MW0149		-3,6
	MW_RS00805	MW0153		2,2
	MW_RS00815	MW0155		6,4
	MW_RS00845	MW0161		2,2
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-3,2
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-2,8
	MW_RS00955	MW0183		-2,5
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-2,7
	MW_RS00965	MW0185		-2,0
	MW_RS00995	MW0191		4,9
	MW_RS01000	MW0192		9,4
	MW_RS01040	MW0200	<i>hptA</i>	3,6
	MW_RS01060	MW0204	<i>glpQ1</i>	-4,4

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>	MW_RS01105	MW0211		2,6
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	33,6
	MW_RS01240	MW0235	<i>scdA</i>	2,3
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	4,2
	MW_RS01335	MW0252	<i>lytM</i>	-2,0
	MW_RS01460	MW0277		3,1
	MW_RS01465	MW0278		3,2
	MW_RS01470	MW0279		3,2
	MW_RS01475	MW0280		2,7
	MW_RS01480	MW0281		3,0
	MW_RS01485	MW0282		26,2
	MW_RS01505	MW0285		4,0
	MW_RS01510	MW0286		3,2
	MW_RS01535	MW0291		2,6
	MW_RS01540	MW0292		2,5
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	182,8
	MW_RS01570	MW0298		5,0
	MW_RS01575	MW0299		8,1
	MW_RS01580	N/A		35,2
	MW_RS01585	MW0300		10,0
	MW_RS01590	MW0301		8,9
	MW_RS01595	MW0302		11,9
	MW_RS01600	MW0303		9,2
	MW_RS01605	MW0304		9,3
	MW_RS01610	MW0305		2,4
	MW_RS01655	MW0314		2,3
	MW_RS01660	MW0315		2,1
	MW_RS01675	MW0318		-4,3
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-4,4
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-3,4
	MW_RS01690	MW0321	<i>efeU</i>	-2,9
	MW_RS01885	MW0359		-2,7
	MW_RS01905	MW0363		4,8
	MW_RS01910	MW0364	<i>xpt</i>	-2,2
	MW_RS01915	MW0365	<i>pbuX</i>	-2,0
	MW_RS01960	MW0374		-2,2
	MW_RS02065	MW0391	<i>set25</i>	4,1
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,6
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,2
	MW_RS02165	MW0409		2,1
	MW_RS02195	MW0414	<i>cysM</i>	-2,5
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,9
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-3,1
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,3
	MW_RS02420	MW0452	<i>yabJ</i>	2,9
	MW_RS02790	MW0506	<i>hchA</i>	2,1
	MW_RS02900	MW0528	<i>proP</i>	2,0
	MW_RS02995	MW0548		-2,1
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	2,5
	MW_RS03120	MW0570		-2,5
	MW_RS03155	MW0577		4,1
	MW_RS03165	MW0579		2,8
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-2,6
	MW_RS03355	MW0617		-2,1
	MW_RS03410	MW0627		-2,6
	MW_RS03490	MW0641		3,0
	MW_RS03505	MW0644		3,7
	MW_RS03575	MW0658		-3,0
	MW_RS03595	MW0662	<i>fruA</i>	2,1
	MW_RS03615	MW0665		3,4
	MW_RS03620	MW0666		2,9
	MW_RS03715	MW0684	<i>opuBA</i>	2,0
	MW_RS03740	MW0688		3,8
	MW_RS03790	MW0695	<i>sstA</i>	-3,6
	MW_RS03910	MW0717		-2,7
	MW_RS03935	MW0722	<i>hprK</i>	2,6
	MW_RS03940	MW0723	<i>lgt</i>	2,6
	MW_RS03945	MW0724		2,4
	MW_RS03950	MW0725		2,1
	MW_RS03970	MW0728		2,7
	MW_RS03990	MW0731		3,7
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	3,0
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,7
	MW_RS04010	MW0735	<i>pgk</i>	2,4
	MW_RS04015	MW0736	<i>tpiA</i>	2,1
	MW_RS04155	MW0764	<i>clfA</i>	4,7
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i>	43,4
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	2,4

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>			
	MW_RS04185	MW0771	4,9
	MW_RS04190	MW0772	4,9
	MW_RS04215	MW0777	4,4
	MW_RS04245	MW0783	-2,4
	MW_RS04275	MW0788	3,0
	MW_RS04280	MW0789	3,4
	MW_RS04285	MW0790	-2,1
	MW_RS04345	MW0802	2,7
	MW_RS04350	MW0803	2,1
	MW_RS04725	MW0878	-2,1
	MW_RS04730	MW0879	2,4
	MW_RS04880	MW0907	2,3
	MW_RS04935	MW0918	-2,9
	MW_RS04940	MW0919	-2,4
	MW_RS04955	MW0922	6,8
	MW_RS04995	MW0930	5,0
	MW_RS05000	MW0931	4,4
	MW_RS05005	MW0932	3,3
	MW_RS05090	MW0947	-3,6
	MW_RS05095	MW0948	-4,8
	MW_RS05100	MW0949	-4,6
	MW_RS05105	MW0950	-4,7
	MW_RS05110	MW0951	-4,3
	MW_RS05115	MW0952	-4,6
	MW_RS05120	MW0953	-4,2
	MW_RS05125	MW0954	-4,3
	MW_RS05130	MW0955	-4,4
	MW_RS05135	MW0956	-3,2
	MW_RS05140	MW0957	-2,9
	MW_RS05165	MW0961	3,4
	MW_RS05180	MW0964	2,3
	MW_RS05270	MW0981	-2,8
	MW_RS05275	MW0982	-2,3
	MW_RS05440	MW1013	-2,7
	MW_RS05445	MW1014	-2,6
	MW_RS05530	MW1030	4,0
	MW_RS05535	MW1031	2,5
	MW_RS05540	MW1032	2,1
	MW_RS05565	MW1037	4,2
	MW_RS05585	MW1040	18,2
	MW_RS05590	MW1041	22,3
	MW_RS05600	N/A	-2,1
	MW_RS05650	MW1049	13,5
	MW_RS05655	MW1050	10,7
	MW_RS05660	MW1051	11,5
	MW_RS05665	MW1052	4,5
	MW_RS05895	MW1097	3,5
	MW_RS05900	MW1098	-2,6
	MW_RS06070	MW1130	2,5
	MW_RS06075	MW1131	2,7
	MW_RS06200	MW1154	2,2
	MW_RS06410	N/A	-3,4
	MW_RS06585	MW1226	2,0
	MW_RS06710	MW1249	-3,1
	MW_RS06875	MW1281	2,0
	MW_RS06940	MW1293	2,1
	MW_RS07020	MW1308	-2,2
	MW_RS07095	MW1321	-2,2
	MW_RS07125	MW1326	7,4
	MW_RS07130	MW1327	12,5
	MW_RS07135	MW1328	17,2
	MW_RS07330	MW1365	2,4
	MW_RS07345	MW1367	-2,5
	MW_RS07720	MW1443	3,3
	MW_RS07730	MW1444	4,6
	MW_RS07885	MW1473	2,5
	MW_RS07920	MW1480	-2,0
	MW_RS08040	MW1503	-2,4
	MW_RS08275	MW1550	-2,4
	MW_RS08350	MW1564	-2,4
	MW_RS08415	MW1576	4,2
	MW_RS08535	MW1600	-3,4
	MW_RS08670	MW1625	2,6
	MW_RS08755	MW1641	2,0
	MW_RS08805	MW1650	2,7
	MW_RS08965	MW1677	2,3
	MW_RS08970	MW1678	2,2
	MW_RS09000	MW1682	2,3

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>	MW_RS09055	MW1693	<i>dat</i>	2,7
	MW_RS09060	MW1694		2,8
	MW_RS09105	MW1703		-2,1
	MW_RS09135	MW1708	<i>ribH</i>	-2,2
	MW_RS09140	MW1709	<i>ribBA</i>	-2,3
	MW_RS09145	MW1710	<i>ribB</i>	-3,3
	MW_RS09150	MW1711	<i>ribD</i>	-2,8
	MW_RS09155	MW1712		2,7
	MW_RS09170	MW1715		-2,1
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	6,8
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	9,6
	MW_RS09400	MW1761	<i>bsaP</i>	4,0
	MW_RS09535	MW1778	<i>hit</i>	2,6
	MW_RS09540	MW1779		5,1
	MW_RS09585	MW1788		-3,5
	MW_RS09625	MW1795		2,2
	MW_RS09845	MW1808		-2,3
	MW_RS09885	MW1815		2,3
	MW_RS09990	MW1834	<i>ftnA</i>	3,1
	MW_RS10075	MW1849	<i>purB</i>	-2,1
	MW_RS10130	MW1858		3,2
	MW_RS10165	MW1865		2,9
	MW_RS10265	MW1884	<i>scn</i>	3,0
	MW_RS10515	MW1930		2,4
	MW_RS10530	MW1933		2,2
	MW_RS10705	MW1968		-3,0
	MW_RS10710	MW1969		-3,5
	MW_RS10880	MW1995	<i>acpS</i>	2,0
	MW_RS10885	MW1996		2,0
	MW_RS10890	MW1997		2,1
	MW_RS10895	MW1998		3,0
	MW_RS10900	MW1999	<i>kdpC</i>	119,1
	MW_RS10905	MW2000	<i>kdpB</i>	323,1
	MW_RS10910	MW2001	<i>kdpA</i>	1009,7
	MW_RS10925	MW2003	<i>kdpE</i>	861,9
	MW_RS10950	MW2008		3,5
	MW_RS11010	MW2020	<i>sceD</i>	-3,3
	MW_RS11035	MW2025		3,3
	MW_RS11130	MW2043	<i>tdk</i>	-2,2
	MW_RS11145	MW2046	<i>aldH</i>	4,2
	MW_RS11175	MW2052	<i>rpoE</i>	-2,0
	MW_RS11240	MW2064		2,5
	MW_RS11260	MW2068		2,3
	MW_RS11265	MW2069	<i>cztA</i>	-2,2
	MW_RS11275	MW2071		7,8
	MW_RS11310	MW2084	<i>mtlF</i>	2,5
	MW_RS11370	MWtRNA60		-30,2
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-2,2
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-3,0
	MW_RS11465	MW2105		2,7
	MW_RS11490	MW2110		2,9
	MW_RS11495	MW2111	<i>opuD2</i>	2,5
	MW_RS11600	MW2131		3,4
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	3,8
	MW_RS11795	MW2172	<i>pbuG</i>	-2,7
	MW_RS11960	MW2201		-2,3
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-3,5
	MW_RS12040	MW2217	<i>ssaA2</i>	-3,0
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-6,4
	MW_RS12085	MW2226		-2,1
	MW_RS12110	MW2231		2,5
	MW_RS12200	MW2249		4,0
	MW_RS12225	MW2254	<i>hutG</i>	3,9
	MW_RS12280	MW2266	<i>gltS</i>	-2,0
	MW_RS12350	MW2278	<i>tcaR</i>	2,5
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	4,7
	MW_RS12405	MW2289		2,9
	MW_RS12480	MW2302		3,9
	MW_RS12500	MW2306	<i>sarZ</i>	-2,3
	MW_RS12510	MW2308	<i>narT</i>	3,3
	MW_RS12555	MW2319	<i>narG</i>	6,1
	MW_RS12560	MW2320	<i>nasF</i>	2,4
	MW_RS12570	MW2322	<i>nasD</i>	3,0
	MW_RS12575	MW2323	<i>nirR</i>	3,7
	MW_RS12655	N/A		6,7
	MW_RS12660	MW2338		4,3
	MW_RS12765	MW2355		5,7
	MW_RS12890	MW2375	<i>pnbA</i>	3,8

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>				
	MW_RS12900	MW2377		4,1
	MW_RS12905	MW2378		4,9
	MW_RS12990	MW2395		4,2
	MW_RS12995	MW2396		3,2
	MW_RS13050	MW2405		2,7
	MW_RS13165	MW2426		22,8
	MW_RS13170	MW2427		23,7
	MW_RS13175	MW2428		3,6
	MW_RS13195	MW2433		-2,1
	MW_RS13235	MW2441		3,4
	MW_RS13240	MW2442		2,5
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	4,4
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	2,9
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-3,0
	MW_RS13460	MW2484	<i>ctrQ</i>	3,4
	MW_RS13465	MW2485	<i>crtP</i>	4,9
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	8,3
	MW_RS13490	MW2490	<i>isaA</i>	-2,5
	MW_RS13495	MW2491		-2,3
	MW_RS13590	MW2508		3,4
	MW_RS13680	MW2524		7,5
	MW_RS13695	N/A		2,5
	MW_RS13705	MW2529		8,8
	MW_RS13730	MW2533		-2,3
	MW_RS13785	MW2541	<i>gpxA2</i>	2,8
	MW_RS13790	N/A		3,5
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	2,1
	MW_RS13900	MW2560		-2,3
	MW_RS13935	MW2567		2,3
	MW_RS13995	MW2578		4,5
	MW_RS14000	MW2579		2,1
	MW_RS14005	MW2580		2,4
	MW_RS14185	MW2616		4,1
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	2,5
	MW_RS14200	MW2619		6,8
	MW_RS14305	MW1758	<i>bsaG</i>	5,6
	MW_RS14400	N/A		5,1
	MW_RS14480	N/A		-2,5
	MW_RS14515	N/A		4,7
	MW_RS14540	N/A		2,3
	MW_RS14615	MW0917b		-3,2
	MW_RS14795	MW1780		5,2
	MW_RS14845	MW1888a		2,2
	MW_RS15020	N/A		4,2
<i>hssR*</i>				
	MW_RS00305	MW0058	<i>sqr</i>	4,8
	MW_RS00430	MW0082		7,3
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-2,2
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-3,8
	MW_RS00565	MW0108		3,0
	MW_RS00755	MW0143		5,7
	MW_RS00760	MW0144		5,0
	MW_RS00765	MW0145		-2,7
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-3,3
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-3,1
	MW_RS00815	MW0155		6,0
	MW_RS00845	MW0161		2,6
	MW_RS00875	MW0166	<i>murP</i>	3,8
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-2,5
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-2,8
	MW_RS00955	MW0183		-2,5
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-2,1
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	22,8
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	4,7
	MW_RS01485	MW0282		19,8
	MW_RS01495	MW0284		-2,3
	MW_RS01505	MW0285		4,1
	MW_RS01510	MW0286		3,1
	MW_RS01545	MW0293	<i>nanK</i>	-2,0
	MW_RS01655	MW0314		2,5
	MW_RS01660	MW0315		2,1
	MW_RS01675	MW0318		-2,4
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-2,7
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-2,1
	MW_RS01905	MW0363		4,4
	MW_RS01910	MW0364	<i>xpt</i>	-2,3
	MW_RS01915	MW0365	<i>pbuX</i>	-2,0
	MW_RS01960	MW0374		-2,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>hssR*</i>				
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	3,7
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,1
	MW_RS02165	MW0409		2,3
	MW_RS02195	MW0414	<i>cysM</i>	-2,4
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,8
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,9
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,0
	MW_RS02220	MW0419	<i>sle</i>	-2,4
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-2,2
	MW_RS02420	MW0452	<i>yabJ</i>	3,1
	MW_RS02990	MW0547	<i>mvaK2</i>	2,1
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	2,9
	MW_RS03120	MW0570		-2,2
	MW_RS03155	MW0577		4,9
	MW_RS03160	MW0578		2,3
	MW_RS03165	MW0579		3,5
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-2,7
	MW_RS03355	MW0617		-2,1
	MW_RS03410	MW0627		-2,4
	MW_RS03485	MW0640		2,8
	MW_RS03490	MW0641		3,4
	MW_RS03505	MW0644		4,5
	MW_RS03550	MW0653		2,3
	MW_RS03575	MW0658		-2,6
	MW_RS03615	MW0665		3,7
	MW_RS03620	MW0666		3,2
	MW_RS03715	MW0684	<i>opuBA</i>	2,1
	MW_RS03740	MW0688		4,8
	MW_RS03970	MW0728		3,2
	MW_RS03975	MW0729	<i>whiA</i>	2,4
	MW_RS03990	MW0731		4,1
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	3,1
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,5
	MW_RS04010	MW0735	<i>pgk</i>	2,1
	MW_RS04145	MW0762		2,3
	MW_RS04155	MW0764	<i>clfA</i>	4,2
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	2,9
	MW_RS04185	MW0771		5,9
	MW_RS04190	MW0772		5,0
	MW_RS04210	MW0776		4,0
	MW_RS04215	MW0777		5,0
	MW_RS04245	MW0783		-2,1
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,3
	MW_RS04345	MW0802		3,0
	MW_RS04350	MW0803		2,5
	MW_RS04380	MW0809		-2,0
	MW_RS04955	MW0922		7,0
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-2,5
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-2,3
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-2,6
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2,5
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2,4
	MW_RS05165	MW0961		4,2
	MW_RS05180	MW0964		3,0
	MW_RS05270	MW0981		-2,7
	MW_RS05275	MW0982	<i>potA</i>	-2,2
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	-3,0
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-3,2
	MW_RS05450	MW1015	<i>isdE</i>	-2,5
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	3,9
	MW_RS05535	MW1031	<i>sdhA</i>	2,6
	MW_RS05540	MW1032	<i>sdhB</i>	2,3
	MW_RS05895	MW1097		3,8
	MW_RS06200	MW1154	<i>truB</i>	3,0
	MW_RS06410	N/A		-4,3
	MW_RS06585	MW1226	<i>lexA</i>	2,1
	MW_RS06970	MW1299		-2,1
	MW_RS07720	MW1443		3,4
	MW_RS07730	MW1444		4,3
	MW_RS07885	MW1473	<i>argR</i>	2,2
	MW_RS08275	MW1550	<i>mtnN</i>	-2,1
	MW_RS08405	MW1574		3,9
	MW_RS08410	MW1575		2,8
	MW_RS08535	MW1600		-3,5
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	3,0
	MW_RS08805	MW1650		3,2
	MW_RS08895	MW1665		-2,0
	MW_RS08965	MW1677	<i>acuA</i>	2,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>hssR*</i>	MW_RS09000	MW1682		2,7
	MW_RS09110	MW1704		-2,0
	MW_RS09145	MW1710	<i>ribB</i>	-2,1
	MW_RS09155	MW1712		3,1
	MW_RS09170	MW1715		-2,0
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	7,7
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	9,6
	MW_RS09400	MW1761	<i>bsaP</i>	4,3
	MW_RS09540	MW1779		5,2
	MW_RS09585	MW1788		-2,0
	MW_RS09620	MW1794		2,3
	MW_RS09625	MW1795		2,5
	MW_RS09845	MW1808		-2,0
	MW_RS09885	MW1815		2,5
	MW_RS09915	MW1821	<i>ptpA</i>	2,5
	MW_RS09990	MW1834	<i>ftnA</i>	3,2
	MW_RS10130	MW1858		3,8
	MW_RS10165	MW1865		3,1
	MW_RS10640	MW1956		-2,1
	MW_RS10705	MW1968		-2,4
	MW_RS10710	MW1969		-2,8
	MW_RS10950	MW2008		4,1
	MW_RS11010	MW2020	<i>sceD</i>	-2,7
	MW_RS11030	MW2024	<i>mueA1</i>	2,1
	MW_RS11035	MW2025		4,5
	MW_RS11145	MW2046	<i>aldH</i>	4,0
	MW_RS11210	MW2059		2,0
	MW_RS11240	MW2064		2,7
	MW_RS11265	MW2069	<i>czrA</i>	-2,5
	MW_RS11305	MW2083	<i>mtlR</i>	2,7
	MW_RS11310	MW2084	<i>mtlF</i>	2,6
	MW_RS11315	MW2085	<i>mtlD</i>	2,4
	MW_RS11425	MW2098		2,0
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-2,0
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-2,8
	MW_RS11465	MW2105		2,8
	MW_RS11495	MW2111	<i>opuD2</i>	2,8
	MW_RS11600	MW2131		3,1
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	3,8
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-2,9
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-7,7
	MW_RS12105	MW2230		2,1
	MW_RS12110	MW2231		2,8
	MW_RS12135	MW2236		2,1
	MW_RS12200	MW2249		3,6
	MW_RS12225	MW2254	<i>hutG</i>	4,2
	MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	-2,5
	MW_RS12355	MW2279		2,2
	MW_RS12360	MW2280	<i>hrtA</i>	105,9
	MW_RS12365	MW2281	<i>hrtB</i>	143,5
	MW_RS12370	MW2282	<i>hssR</i>	2044,3
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	6,8
	MW_RS12480	MW2302		4,6
	MW_RS12655	N/A		8,6
	MW_RS12660	MW2338		3,9
	MW_RS12765	MW2355		8,1
	MW_RS12890	MW2375	<i>pnbA</i>	4,2
	MW_RS12900	MW2377		5,4
	MW_RS12905	MW2378		6,3
	MW_RS12990	MW2395		4,7
	MW_RS12995	MW2396		3,8
	MW_RS13045	N/A		2,1
	MW_RS13050	MW2405		3,8
	MW_RS13175	MW2428		2,7
	MW_RS13235	MW2441		3,2
	MW_RS13240	MW2442		2,4
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	4,1
	MW_RS13340	MW2461	<i>cidB</i>	2,9
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	3,3
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-4,0
	MW_RS13460	MW2484	<i>ctrQ</i>	3,4
	MW_RS13465	MW2485	<i>crtP</i>	5,1
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	8,1
	MW_RS13490	MW2490	<i>isaA</i>	-2,7
	MW_RS13590	MW2508		3,8
	MW_RS13680	MW2524		7,5
	MW_RS13700	MW2528		2,1
	MW_RS13705	MW2529		10,0

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>hssR*</i>				
	MW_RS13730	MW2533		-2,2
	MW_RS13995	MW2578		5,3
	MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	2,1
	MW_RS14140	MW2606		2,2
	MW_RS14185	MW2616		5,0
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	2,9
	MW_RS14200	MW2619		8,5
	MW_RS14305	MW1758	<i>bsaG</i>	7,1
	MW_RS14400	N/A		5,1
	MW_RS14515	N/A		6,3
	MW_RS14760	N/A		2,4
	MW_RS14795	MW1780		5,6
	MW_RS14845	MW1888a		2,0
<i>nreC*</i>				
	MW_RS00305	MW0058	<i>sqr</i>	4,5
	MW_RS00430	MW0082		6,5
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-2,6
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-4,1
	MW_RS00525	MW0100	<i>butA</i>	2,0
	MW_RS00565	MW0108		3,1
	MW_RS00755	MW0143		5,0
	MW_RS00760	MW0144		4,3
	MW_RS00765	MW0145		-2,8
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-4,2
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-3,8
	MW_RS00815	MW0155		6,8
	MW_RS00845	MW0161		2,3
	MW_RS00945	MW0181	<i>oppF</i>	-2,4
	MW_RS00950	MW0182	<i>oppB</i>	-2,8
	MW_RS00955	MW0183		-2,3
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-2,3
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	26,6
	MW_RS01240	MW0235	<i>scdA</i>	2,2
	MW_RS01310	MW0247	<i>rbsR</i>	4,7
	MW_RS01480	MW0281		2,0
	MW_RS01485	MW0282		23,0
	MW_RS01495	MW0284		-2,3
	MW_RS01505	MW0285		3,9
	MW_RS01510	MW0286		3,4
	MW_RS01545	MW0293	<i>nanK</i>	-2,5
	MW_RS01655	MW0314		2,2
	MW_RS01660	MW0315		2,0
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-3,2
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-2,7
	MW_RS01690	MW0321	<i>efeU</i>	-2,1
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-2,2
	MW_RS01840	MW0349		2,8
	MW_RS01905	MW0363		3,9
	MW_RS01910	MW0364	<i>xpt</i>	-2,4
	MW_RS01915	MW0365	<i>pbuX</i>	-2,2
	MW_RS01960	MW0374		-2,3
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	4,2
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,4
	MW_RS02165	MW0409		2,6
	MW_RS02195	MW0414	<i>cysM</i>	-2,3
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-4,1
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-3,1
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2,1
	MW_RS02220	MW0419	<i>sle</i>	-2,3
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-2,3
	MW_RS02375	MW0444	<i>rsmI</i>	-2,1
	MW_RS02420	MW0452	<i>yabJ</i>	3,4
	MW_RS02425	MW0453	<i>spoVG</i>	2,9
	MW_RS02745	MW0497	<i>rpoB</i>	-2,1
	MW_RS02790	MW0506	<i>hchA</i>	2,1
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	3,2
	MW_RS03120	MW0570		-2,3
	MW_RS03155	MW0577		5,4
	MW_RS03160	MW0578		2,5
	MW_RS03165	MW0579		3,0
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-2,8
	MW_RS03355	MW0617		-2,1
	MW_RS03410	MW0627		-2,2
	MW_RS03485	MW0640		2,5
	MW_RS03490	MW0641		3,2
	MW_RS03505	MW0644		4,2
	MW_RS03575	MW0658		-2,4
	MW_RS03615	MW0665		3,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>nreC*</i>	MW_RS03620	MW0666		3,0
	MW_RS03740	MW0688		4,5
	MW_RS03790	MW0695	<i>sstA</i>	-3,4
	MW_RS03970	MW0728		3,0
	MW_RS03975	MW0729	<i>whiA</i>	2,3
	MW_RS03990	MW0731		4,0
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	3,2
	MW_RS04005	MW0734	<i>gapA1</i>	2,6
	MW_RS04030	MW0739		2,1
	MW_RS04110	MW0756		2,1
	MW_RS04155	MW0764	<i>clfA</i>	3,5
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	3,9
	MW_RS04185	MW0771		4,8
	MW_RS04190	MW0772		4,5
	MW_RS04210	MW0776		3,7
	MW_RS04215	MW0777		4,7
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,2
	MW_RS04300	MW0793		3,1
	MW_RS04345	MW0802		2,7
	MW_RS04350	MW0803		2,1
	MW_RS04730	MW0879	<i>spxA</i>	2,1
	MW_RS04955	MW0922		7,5
	MW_RS05035	MW0937		-2,2
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>	-2,4
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-2,5
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-2,7
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-2,6
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2,4
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2,6
	MW_RS05120	MW0953	<i>purF</i>	-2,6
	MW_RS05125	MW0954	<i>purM</i>	-2,8
	MW_RS05130	MW0955	<i>purN</i>	-2,5
	MW_RS05135	MW0956	<i>purH</i>	-2,0
	MW_RS05180	MW0964		2,9
	MW_RS05270	MW0981		-2,8
	MW_RS05275	MW0982	<i>potA</i>	-2,3
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	-3,6
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-4,0
	MW_RS05450	MW1015	<i>isdE</i>	-3,8
	MW_RS05465	MW1018	<i>isdG</i>	-2,4
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	4,2
	MW_RS05535	MW1031	<i>sdhA</i>	2,7
	MW_RS05540	MW1032	<i>sdhB</i>	2,3
	MW_RS05895	MW1097		3,9
	MW_RS06200	MW1154	<i>truB</i>	2,7
	MW_RS06235	MW1161		-2,3
	MW_RS06585	MW1226	<i>lexA</i>	2,5
	MW_RS06660	MW1240	<i>plsY</i>	2,1
	MW_RS06920	MW1290	<i>cspA</i>	2,0
	MW_RS06970	MW1299		-2,6
	MW_RS07345	MW1367	<i>ansA</i>	-2,3
	MW_RS07720	MW1443		3,3
	MW_RS07730	MW1444		4,4
	MW_RS08040	MW1503	<i>rpmG</i>	-2,1
	MW_RS08270	MW1549		-2,2
	MW_RS08275	MW1550	<i>mtnN</i>	-2,5
	MW_RS08350	MW1564		-2,2
	MW_RS08405	MW1574		4,1
	MW_RS08410	MW1575		2,9
	MW_RS08440	MW1581	<i>hisS</i>	-2,0
	MW_RS08535	MW1600		-2,4
	MW_RS08580	MW1609		2,5
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	3,1
	MW_RS08805	MW1650		2,9
	MW_RS08895	MW1665		-2,1
	MW_RS08965	MW1677	<i>acuA</i>	2,2
	MW_RS08970	MW1678	<i>acuC</i>	2,1
	MW_RS09000	MW1682		2,8
	MW_RS09035	MW1689		2,3
	MW_RS09110	MW1704		-2,1
	MW_RS09145	MW1710	<i>ribB</i>	-2,1
	MW_RS09150	MW1711	<i>ribD</i>	-2,1
	MW_RS09155	MW1712		2,6
	MW_RS09390	MW1759	<i>bsaE</i>	6,5
	MW_RS09395	MW1760	<i>bsaF</i>	8,1
	MW_RS09400	MW1761	<i>bsaP</i>	3,3
	MW_RS09540	MW1779		5,1
	MW_RS09620	MW1794		2,3

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>nreC*</i>	MW_RS09625	MW1795		2,5
	MW_RS09845	MW1808		-2,0
	MW_RS09850	MW1809		2,2
	MW_RS09915	MW1821	<i>ptpA</i>	2,4
	MW_RS09920	MW1822		2,0
	MW_RS09990	MW1834	<i>ftnA</i>	4,5
	MW_RS10130	MW1858		3,2
	MW_RS10165	MW1865		2,7
	MW_RS10640	MW1956		-2,1
	MW_RS10705	MW1968		-2,3
	MW_RS10710	MW1969		-2,8
	MW_RS10950	MW2008		3,7
	MW_RS11010	MW2020	<i>sceD</i>	-2,8
	MW_RS11035	MW2025		3,9
	MW_RS11145	MW2046	<i>aldH</i>	3,5
	MW_RS11210	MW2059		2,1
	MW_RS11240	MW2064		2,3
	MW_RS11265	MW2069	<i>czrA</i>	-2,1
	MW_RS11295	MW2080	<i>glmS</i>	2,3
	MW_RS11310	MW2084	<i>mtlF</i>	2,7
	MW_RS11315	MW2085	<i>mtlD</i>	2,3
	MW_RS11370	MWtRNA60		-30,2
	MW_RS11425	MW2098		2,1
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-2,3
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-3,3
	MW_RS11465	MW2105		2,4
	MW_RS11495	MW2111	<i>opuD2</i>	2,8
	MW_RS11600	MW2131		3,1
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	3,7
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-3,1
	MW_RS12045	MW2218		4,2
	MW_RS12065	MW2222	<i>ssaA</i>	-5,7
	MW_RS12110	MW2231		2,6
	MW_RS12135	MW2236		2,3
	MW_RS12200	MW2249		3,7
	MW_RS12225	MW2254	<i>hutG</i>	3,9
	MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	-2,1
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	7,6
	MW_RS12480	MW2302		4,1
	MW_RS12510	MW2308	<i>narT</i>	82,1
	MW_RS12525	MW2313	<i>nreC</i>	1781,8
	MW_RS12535	MW2315	<i>nreA</i>	7,9
	MW_RS12540	MW2316	<i>narI</i>	26,8
	MW_RS12545	MW2317	<i>narJ</i>	111,6
	MW_RS12550	MW2318	<i>narH</i>	164,4
	MW_RS12555	MW2319	<i>narG</i>	320,1
	MW_RS12560	MW2320	<i>nasF</i>	98,6
	MW_RS12565	MW2321	<i>nasE</i>	121,7
	MW_RS12570	MW2322	<i>nasD</i>	121,4
	MW_RS12575	MW2323	<i>nirR</i>	179,0
	MW_RS12655	N/A		9,1
	MW_RS12660	MW2338		3,3
	MW_RS12765	MW2355		6,4
	MW_RS12830	MW2366		-2,1
	MW_RS12890	MW2375	<i>pnbA</i>	3,4
	MW_RS12900	MW2377		5,3
	MW_RS12905	MW2378		5,9
	MW_RS12990	MW2395		4,4
	MW_RS12995	MW2396		3,6
	MW_RS13045	N/A		2,2
	MW_RS13050	MW2405		4,9
	MW_RS13175	MW2428		3,0
	MW_RS13235	MW2441		3,3
	MW_RS13240	MW2442		2,8
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	4,7
	MW_RS13335	MW2460	<i>cidC</i>	3,1
	MW_RS13340	MW2461	<i>cidB</i>	3,1
	MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	3,8
	MW_RS13360	MW2465	<i>ssaA like</i>	-3,7
	MW_RS13460	MW2484	<i>ctrQ</i>	3,1
	MW_RS13465	MW2485	<i>crtP</i>	4,2
	MW_RS13470	MW2486	<i>crtO</i>	6,7
	MW_RS13490	MW2490	<i>isaA</i>	-2,3
	MW_RS13590	MW2508		3,3
	MW_RS13680	MW2524		6,1
	MW_RS13705	MW2529		8,4
	MW_RS13710	MW2530		2,1
	MW_RS13730	MW2533		-2,2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>nreC*</i>				
	MW_RS13995	MW2578		5,1
	MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	2,4
	MW_RS14185	MW2616		4,6
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	3,0
	MW_RS14200	MW2619		7,4
	MW_RS14305	MW1758	<i>bsaG</i>	5,8
	MW_RS14400	N/A		4,6
	MW_RS14500	N/A		-2,0
	MW_RS14515	N/A		6,5
	MW_RS14540	N/A		2,6
	MW_RS14620	MW0926		-7,3
	MW_RS14760	N/A		2,5
	MW_RS14765	N/A		2,3
	MW_RS14795	MW1780		5,4
	MW_RS14845	MW1888a		2,4
	MW_RS14910	N/A		-5,3
<i>braR*</i>				
	MW_RS00125	MW0023	<i>adsA</i>	-2,2
	MW_RS00245	MW0047		2,4
	MW_RS00250	MW0048		2,2
	MW_RS00385	MW0073		-2,4
	MW_RS00390	MW0074		-2,5
	MW_RS00455	MW0087	<i>sirB</i>	-3,4
	MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	-5,0
	MW_RS00565	MW0108		2,3
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-3,3
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-3,7
	MW_RS00815	MW0155		4,4
	MW_RS00955	MW0183		-2,8
	MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	-3,6
	MW_RS00965	MW0185		-3,0
	MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i>	13,2
	MW_RS01270	MW0241		-3,0
	MW_RS01410	MW0267		-4,5
	MW_RS01485	MW0282		9,4
	MW_RS01510	MW0286		2,1
	MW_RS01545	MW0293	<i>nanK</i>	-3,1
	MW_RS01645	MW0312		2,1
	MW_RS01680	MW0319	<i>efeO</i>	-3,3
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	-3,3
	MW_RS01690	MW0321	<i>efeU</i>	-2,4
	MW_RS01730	MW0329		2,3
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-2,4
	MW_RS01755	MW0333	<i>metF</i>	-2,7
	MW_RS01760	MW0334	<i>metC</i>	-3,2
	MW_RS01825	MW0346		965,6
	MW_RS01915	MW0365	<i>pbuX</i>	-2,0
	MW_RS01920	MW0366	<i>guaB</i>	-2,4
	MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i>	5,6
	MW_RS02160	MW0408	<i>mpsB</i>	3,3
	MW_RS02165	MW0409		2,5
	MW_RS02180	MW0411		2,1
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3,0
	MW_RS02210	MW0417	<i>metP2</i>	-2,7
	MW_RS02240	MW0423		2,6
	MW_RS02245	MW0424		2,0
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-3,5
	MW_RS02260	MW0427	<i>gltD</i>	-2,2
	MW_RS02435	MW0454	<i>glmU</i>	-2,2
	MW_RS02640	MW0477	<i>ctsR</i>	2,0
	MW_RS02690	MW0486	<i>mrnC</i>	-2,4
	MW_RS02695	MW0487		-2,0
	MW_RS02745	MW0497	<i>rpoB</i>	-2,8
	MW_RS02750	MW0498	<i>rpoC</i>	-2,6
	MW_RS03155	MW0577		3,6
	MW_RS03160	MW0578		3,0
	MW_RS03270	MW0600	<i>tagG</i>	2,1
	MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	-3,3
	MW_RS03320	MW0610	<i>fhuB</i>	-2,6
	MW_RS03345	MW0615		2,1
	MW_RS03370	MW0619		2,2
	MW_RS03490	MW0641		2,6
	MW_RS03555	MW0654		2,2
	MW_RS03560	MW0655		2,0
	MW_RS03565	MW0656		2,0
	MW_RS03645	MW0671		2,8
	MW_RS03690	MW0680		-2,1
	MW_RS03740	MW0688		2,6

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>braR*</i>				
	MW_RS03790	MW0695	<i>sstA</i>	-3,4
	MW_RS03860	MW0709	<i>llm</i>	2,3
	MW_RS03985	MW0730	<i>clpP</i>	2,3
	MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i>	2,2
	MW_RS04030	MW0739		2,2
	MW_RS04110	MW0756		2,8
	MW_RS04120	MW0758	<i>ear</i>	2,1
	MW_RS04125	MW0759	<i>sec4</i>	2,4
	MW_RS04130	MW0760	<i>sel2</i>	2,8
	MW_RS04180	MW0770	<i>cspC</i>	5,6
	MW_RS04185	MW0771		3,1
	MW_RS04205	MW0775		2,4
	MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	-2,4
	MW_RS04290	MW0791	<i>metP1</i>	-2,1
	MW_RS04405	MW0813	<i>dltX</i>	4,4
	MW_RS04410	MW0814	<i>dltA</i>	3,3
	MW_RS04415	MW0815	<i>dltB</i>	4,3
	MW_RS04420	MW0816	<i>dltC</i>	4,1
	MW_RS04425	MW0817	<i>dltD</i>	3,8
	MW_RS04480	MW0828	<i>mnhG1</i>	2,0
	MW_RS04485	MW0829	<i>mnhF1</i>	2,1
	MW_RS04545	MW0841	<i>glpQ</i>	5,6
	MW_RS04585	MW0849	<i>addA</i>	-2,0
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-2,3
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-2,3
	MW_RS04895	MW0910		2,0
	MW_RS04955	MW0922		5,2
	MW_RS05090	MW0947	<i>purE</i>	-3,4
	MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	-5,4
	MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	-5,0
	MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	-7,0
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-5,0
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-5,3
	MW_RS05120	MW0953	<i>purF</i>	-5,5
	MW_RS05125	MW0954	<i>purM</i>	-6,8
	MW_RS05130	MW0955	<i>purN</i>	-6,4
	MW_RS05135	MW0956	<i>purH</i>	-4,7
	MW_RS05140	MW0957	<i>purD</i>	-3,2
	MW_RS05170	MW0962		2,1
	MW_RS05270	MW0981		-2,8
	MW_RS05275	MW0982	<i>potA</i>	-2,7
	MW_RS05345	MW0996	<i>ftsW</i>	2,2
	MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	-5,1
	MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	-5,9
	MW_RS05450	MW1015	<i>isdE</i>	-5,0
	MW_RS05455	MW1016	<i>isdF</i>	-2,7
	MW_RS05460	MW1017	<i>srtB</i>	-3,1
	MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i>	3,5
	MW_RS05535	MW1031	<i>sdhA</i>	2,3
	MW_RS05540	MW1032	<i>sdhB</i>	2,3
	MW_RS05870	MW1092	<i>gmk</i>	2,6
	MW_RS05875	MW1093	<i>rpoZ</i>	2,7
	MW_RS05895	MW1097		3,0
	MW_RS06085	MW1133	<i>topA</i>	-2,3
	MW_RS06135	MW1141	<i>pyrH</i>	-2,5
	MW_RS06175	MW1149	<i>nusA</i>	-2,1
	MW_RS06180	MW1150		-2,4
	MW_RS06185	MW1151		-2,8
	MW_RS06245	MW1163		-2,0
	MW_RS06290	MW1172		-2,1
	MW_RS06470	MW1205	<i>cls1</i>	2,3
	MW_RS06505	MW1212		2,3
	MW_RS06510	MW1213		3,2
	MW_RS06520	MW1215	<i>dhoM</i>	-3,1
	MW_RS06525	MW1216	<i>thrC</i>	-2,8
	MW_RS06530	MW1217	<i>thrB</i>	-2,3
	MW_RS06585	MW1226	<i>lexA</i>	2,3
	MW_RS06700	MW1247	<i>mprF</i>	9,8
	MW_RS06865	MW1279	<i>cvfB</i>	2,5
	MW_RS06875	MW1281	<i>lysc</i>	2,6
	MW_RS06920	MW1290	<i>cspA</i>	2,4
	MW_RS06930	MW1291		2,2
	MW_RS06965	MW1298		-2,2
	MW_RS06970	MW1299		-2,4
	MW_RS06985	MW1302	<i>odhB</i>	-2,1
	MW_RS06990	MW1303	<i>odhA</i>	-2,5
	MW_RS07115	MW1324	<i>ebh</i>	-3,8
	MW_RS07250	MW1350		2,1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>braR*</i>	MW_RS07280	MW1356	<i>aroC</i>	-2,1
	MW_RS07675	MW1433		2,1
	MW_RS07830	MW1463		2,0
	MW_RS07895	MW1475	<i>xseB</i>	-2,3
	MW_RS07935	MW1483		2,3
	MW_RS07960	MW1488	<i>gcvPA</i>	-2,1
	MW_RS08250	MW1545	<i>nadD</i>	-2,6
	MW_RS08255	MW1546		-2,4
	MW_RS08260	MW1547	<i>aroE</i>	-2,3
	MW_RS08265	MW1548		-2,5
	MW_RS08270	MW1549		-2,2
	MW_RS08305	MW1555	<i>pxpA</i>	-2,9
	MW_RS08310	MW1556		-3,5
	MW_RS08340	MW1562		-2,3
	MW_RS08345	MW1563		-2,2
	MW_RS08370	MW1568	<i>alaS</i>	-2,4
	MW_RS08440	MW1581	<i>hisS</i>	-2,0
	MW_RS08470	MW1587	<i>secF</i>	2,2
	MW_RS08485	MW1590	<i>queA</i>	-2,0
	MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i>	2,7
	MW_RS08895	MW1665		-2,1
	MW_RS08945	MW1674	<i>isdH</i>	-3,5
	MW_RS09010	MW1684		-2,3
	MW_RS09035	MW1689		2,8
	MW_RS09135	MW1708	<i>ribH</i>	-2,0
	MW_RS09140	MW1709	<i>ribBA</i>	-2,3
	MW_RS09145	MW1710	<i>ribB</i>	-3,7
	MW_RS09150	MW1711	<i>ribD</i>	-2,4
	MW_RS09190	MW1719		2,3
	MW_RS09205	MW1722		2,4
	MW_RS09240	MW1731		-2,0
	MW_RS09245	MW1732		-2,2
	MW_RS09540	MW1779		2,8
	MW_RS09640	MW1798	<i>glnQ</i>	3,5
	MW_RS09645	MW1799		3,7
	MW_RS09650	MW1800		2,0
	MW_RS09990	MW1834	<i>ftnA</i>	6,1
	MW_RS10055	MW1845	<i>ligA</i>	-2,3
	MW_RS10060	MW1846	<i>pcrA</i>	-2,1
	MW_RS10635	MW1955		2,0
	MW_RS10950	MW2008		2,9
	MW_RS11035	MW2025		2,4
	MW_RS11055	MW2028	<i>atpG</i>	-2,2
	MW_RS11060	MW2029	<i>atpA</i>	-2,3
	MW_RS11065	MW2030	<i>atpH</i>	-2,3
	MW_RS11070	MW2031	<i>atpF</i>	-2,1
	MW_RS11145	MW2046	<i>aldH</i>	2,8
	MW_RS11230	MW2062	<i>deoD</i>	2,0
	MW_RS11320	MW2086	<i>fmtB</i>	-4,1
	MW_RS11425	MW2098		2,0
	MW_RS11435	MW2100		4,0
	MW_RS11445	MW2102	<i>htsB</i>	-2,8
	MW_RS11450	MW2103	<i>htsA</i>	-3,5
	MW_RS11605	MW2132	<i>alsS</i>	2,5
	MW_RS11665	MW2146	<i>rpmJ</i>	-2,2
	MW_RS11695	MW2152	<i>rpsE</i>	-2,1
	MW_RS11700	MW2153	<i>rplR</i>	-2,2
	MW_RS11705	MW2154	<i>rplF</i>	-2,4
	MW_RS11710	MW2155	<i>rpsH</i>	-2,3
	MW_RS11715	MW2156	<i>rpsZ</i>	-2,5
	MW_RS11720	MW2157	<i>rplE</i>	-2,5
	MW_RS11725	MW2158	<i>rplX</i>	-3,0
	MW_RS11730	MW2159	<i>rplN</i>	-2,4
	MW_RS11735	MW2160	<i>rpsQ</i>	-2,8
	MW_RS11740	MW2161	<i>rpmC</i>	-2,5
	MW_RS11745	MW2162	<i>rplP</i>	-2,4
	MW_RS11750	MW2163	<i>rpsC</i>	-2,3
	MW_RS11755	MW2164	<i>rplV</i>	-2,0
	MW_RS11760	MW2165	<i>rpsS</i>	-2,2
	MW_RS11905	MW2190	<i>mobB</i>	-2,5
	MW_RS11910	MW2191	<i>moeA</i>	-2,6
	MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	-2,6
	MW_RS11980	MW2206	<i>ureA</i>	-2,0
	MW_RS11985	MW2207	<i>ureB</i>	-2,1
	MW_RS11990	MW2208	<i>ureC</i>	-2,0
	MW_RS12135	MW2236		2,3
	MW_RS12145	MW2238		2,0
	MW_RS12170	MW2243		2,3

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>braR*</i>	MW_RS12295	MW2269		2,1
	MW_RS12300	MW2270		2,1
	MW_RS12315	MW2273		2,2
	MW_RS12320	MW2274		2,4
	MW_RS12325	MW2275		4,3
	MW_RS12380	MW2284		2,5
	MW_RS12385	MW2285		2,2
	MW_RS12395	MW2287	<i>lctP2</i>	6,0
	MW_RS12505	MW2307		2,1
	MW_RS12655	N/A		5,2
	MW_RS12660	MW2338		3,3
	MW_RS12790	MW2360		2,0
	MW_RS12865	MW2372	<i>opuCA</i>	-2,1
	MW_RS12880	MW2373		2,0
	MW_RS12900	MW2377		3,1
	MW_RS12940	MW2384		2,0
	MW_RS13045	N/A		2,2
	MW_RS13050	MW2405		3,6
	MW_RS13115	MW2417		2,6
	MW_RS13190	MW2432		2,9
	MW_RS13240	MW2442		2,1
	MW_RS13250	MW2444	<i>ldhD</i>	3,3
	MW_RS13610	MW2512		2,2
	MW_RS13645	MW2518	<i>panB</i>	-2,1
	MW_RS13805	MW2542		19,5
	MW_RS13810	MW2543		16,1
	MW_RS13820	MW2545	<i>braR</i>	3260,5
	MW_RS13825	MW2546		2,1
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	2,2
	MW_RS13955	MW2571	<i>asp3</i>	-2,6
	MW_RS13960	MW2572	<i>asp2</i>	-2,2
	MW_RS13965	MW2573	<i>asp1</i>	-2,2
	MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	2,7
	MW_RS14075	MW2593	<i>hisA</i>	-3,7
	MW_RS14125	MW2603		-2,3
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	3,7
	MW_RS14200	MW2619		5,1
	MW_RS14205	MW2620	<i>vraD</i>	1781,8
	MW_RS14210	MW2621	<i>vraE</i>	3183,4
	MW_RS14215	MW2622		4856,1
	MW_RS14240	MW2627	<i>noc</i>	-2,2
	MW_RS14245	MW2628		-2,0
	MW_RS14500	N/A		-2,1
	MW_RS14515	N/A		3,8
	MW_RS14795	MW1780		3,1
	MW_RS14845	MW1888a		2,1
	MW_RS14910	N/A		-4,3

Tabla 3. Genes y proteínas afectados de diferencialmente por múltiples TCSs.

Genes diferencialmente expresados seleccionados ($p < 0.05$ and fold change > 2) cuya expresión está afectada de forma diferente en función del RR* expresado. Para cada gen se muestran los sistemas que activan o inhiben su expresión Las columnas denominadas Locus Tag muestran versiones diferentes de la anotación del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2.

	Locus tag	Gene name	Up-regulated in TCS	Down-regulated in TCS
Genes				
	MW_RS00125	MW0023	PhoP	AirR, BraR
	MW_RS00385	MW0073	KdpE	BraR
	MW_RS00390	MW0074	KdpE	BraR
	MW_RS00565	MW0108	HssR, NreC, BraR	WalR
	MW_RS01335	MW0252	lytM	KdpE
	MW_RS01495	MW0284	SrrA	PhoP, AirR, HssR, NreC
	MW_RS01565	MW0297	lip2 geh	SrrA, AirR,
	MW_RS02095	MW0396	SaeR	PhoP
	MW_RS02220	MW0419	sle1 aaa	AirR, AgrA, HssR, NreC
	MW_RS02750	MW0498	rpoC	BraR
	MW_RS02845	MW0517	sdrD	AirR
	MW_RS03410	MW0627	WalR	VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC
	MW_RS03910	MW0717	WalR	ArlR, AirR, KdpE
	MW_RS06070	MW1130	lytN	ArlR
	MW_RS06075	MW1131	fmhC	ArlR
	MW_RS06280	MW1170	SaeR	WalR
	MW_RS06290	MW1172	AirR	BraR
	MW_RS06300	MW1174	AirR	PhoP
	MW_RS06710	MW1249	msrR	KdpE
	MW_RS06875	MW1281	lysC	SrrA
	MW_RS08040	MW1503	rpmG1	AirR, VraR, KdpE, NreC
	MW_RS08535	MW1600	AirR, VraR	PhoP, AgrA, KdpE, HssR, NreC
	MW_RS09085	MW1699	WalR, PhoP	ArlR
	MW_RS09550	MW1782	prsA	WalR
	MW_RS10640	MW1956	WalR	AgrA, HssR, NreC
	MW_RS11055	MW2028	atpG	BraR
	MW_RS11060	MW2029	atpA	BraR
	MW_RS11065	MW2030	atpH	BraR
	MW_RS11070	MW2031	atpF	BraR
	MW_RS11320	MW2086	truncated fntB	ArlR, AirR, BraR
	MW_RS11665	MW2146	rpmJ	BraR
	MW_RS11695	MW2152	rpsE	BraR
	MW_RS11700	MW2153	rplR	BraR
	MW_RS11705	MW2154	rplF	BraR
	MW_RS11710	MW2155	rpsH	BraR
	MW_RS11715	MW2156	rpsZ rpsN1	BraR
	MW_RS11720	MW2157	rplE	BraR
	MW_RS11725	MW2158	rplX	BraR
	MW_RS11730	MW2159	rplN	BraR
	MW_RS11735	MW2160	rpsQ	BraR
	MW_RS11740	MW2161	rpmC	BraR
	MW_RS11745	MW2162	rplP	BraR
	MW_RS11750	MW2163	rpsC	BraR
	MW_RS11755	MW2164	rplV	BraR
	MW_RS11760	MW2165	rpsS	BraR
	MW_RS12000	MW2210	ureF	WalR, ArlR
	MW_RS12010	MW2212	ureD	WalR, ArlR
	MW_RS12040	MW2217	ssaA2	VraR, KdpE
	MW_RS12065	MW2222	ssaA	TCS7, SrrA, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC

Locus tag		Gene name	Up-regulated in TCS	Down-regulated in TCS
MW_RS12230	MW2255	<i>lyrA</i>	WalR	VraR, AgrA, HssR, NreC
MW_RS13195	MW2433		ArlR	PhoP, AirR, KdpE
MW_RS13200	MW2434		ArlR	AirR
MW_RS13345	MW2462	<i>cidA</i>	SaeR, PhoP, AgrA, KdpE, HssR, NreC	SrrA
MW_RS13360	MW2465		WalR	SaeR, TCS7, PhoP, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC
MW_RS14030	MW2585	<i>icaR</i>	ArlR, HssR, NreC, BraR	WalR
MW_RS14245	MW2628	<i>rsmG</i>	WalR	BraR
MW_RS14865	N/A	N/A	WalR	PhoP, AirR
Proteins				
MW_RS01495	MW0284		SrrA	AirR
MW_RS04430	MW0818		AirR	WalR
MW_RS07055	MW1314	<i>msrA2 msrA</i>	AirR	SrrA,
MW_RS11320	MW2086	truncated <i>fmtB</i>	WalR	ArlR

Tabla 4. Regulones específicos de cada uno de los TCSs de *S. aureus*.

Genes regulados específicamente por cada uno de los TCSs. Las columnas denominadas Locus Tag muestran versiones diferentes de la anotación del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2. Los genes que forman el regulón están divididos en genes activados y genes inhibidos por cada RR*. Los *loci* marcados con un corchete son genes que forman parte de un mismo operón.

Up-regulated genes				
Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR</i> *	MW_RS00100	MW0018	<i>walR</i>	62.0
	[MW_RS01710	MW0325		2.4
	[MW_RS01715	MW0326		2.2
	MW_RS02190	MW0413		4.2
	MW_RS02665	MW0481	<i>radA</i>	2.9
	MW_RS02840	MW0516	<i>sdrC</i>	4.1
	MW_RS03005	MW0550		16.0
	MW_RS03870	MW0711		2.4
	MW_RS04845	MW0902		2.4
	MW_RS04900	MW0911		3.3
	MW_RS05030	MW0936	<i>atl</i>	5.4
	MW_RS05945	MW1107	<i>rpmB</i>	2.2
	[MW_RS06020	MW1121	<i>rpsP</i>	2.6
	[MW_RS06030	MW1123	<i>trmD</i>	2.0
	MW_RS06705	MW1248	<i>msrA1</i>	2.9
	MW_RS08160	MW1527	<i>rpsU</i>	2.8
	[MW_RS08655	MW1622	<i>rplT</i>	2.9
	[MW_RS08660	MW1623	<i>rpml</i>	2.7
	[MW_RS08665	MW1624	<i>infC</i>	2.9
	MW_RS09265	MW1736		8.3
	MW_RS10350	MW1898		3.6
	MW_RS10455	MW1918		2.9
	MW_RS11135	MW2044	<i>rmpE2</i>	2.6
	MW_RS11280	MW2072		2.5
	MW_RS11620	MW2137	<i>rplM</i>	2.3
	MW_RS13355	MW2464		4.2
	MW_RS13475	MW2487	<i>ssaA</i>	10.0
	MW_RS14035	MW2586	<i>icaA</i>	5.6
	[MW_RS14250	MW2629	<i>mnmG</i>	2.2
	[MW_RS14255	MW2630	<i>mnmE</i>	2.5
	[MW_RS14260	MW2631	<i>rnpA</i>	3.9
	MW_RS14380			3.3
	MW_RS14385			2.1
	MW_RS14600			2.1
	MW_RS14720	MW1322a		2.0
	MW_RS14820	MW1864a		2.4
<i>hptR</i> *	MW_RS01030	MW0198	<i>hptR</i>	1292
	MW_RS01025	MW0197	<i>uhpR</i>	25
<i>lytR</i> *	MW_RS01250	MW0237	<i>lytR</i>	947.9
<i>graR</i> *	MW_RS03380	MW0621	<i>graR</i>	1356.3
	MW_RS14195	MW2618		6.7
<i>saeR</i> *	MW_RS00560	MW0107	<i>sodM</i>	2.2
	MW_RS01020	MW0196		53.3
	MW_RS01065	MW0205		15.4
	MW_RS01070	MW0206	<i>coa</i>	13.2
	MW_RS01075			12.3
	MW_RS01820	MW0345		39.6
	[MW_RS02010	MW0382	<i>set16</i>	3.9
	[MW_RS02015	MW0383	<i>set17</i>	10.2
	[MW_RS02035	MW0386	<i>set20</i>	6.9
	[MW_RS02045	MW0387	<i>set21</i>	7.2
	[MW_RS02050	MW0388	<i>set22</i>	7.1
	[MW_RS03630	MW0668	<i>saeR</i>	1307.8
	[MW_RS03635	MW0669	<i>saeQ</i>	136.2
	[MW_RS03640	MW0670	<i>saeP</i>	824.3
	[MW_RS03720	MW0685	<i>opuBB</i>	2.4
	MW_RS04160			12.4
	MW_RS04165	MW0767	<i>emp</i>	22.5
	MW_RS04170	MW0768		30.3
	MW_RS04945	MW0920		9.9

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>saeR*</i>	MW_RS05565	MW1037	<i>efb</i> ^t	658.5
	MW_RS05570			8.2
	MW_RS05575	MW1038	<i>flr</i>	17.0
	MW_RS05625	MW1044	<i>hla</i>	11.0
	[MW_RS07410	MW1378	<i>lukF</i>	3.8
	[MW_RS07415	MW1379	<i>lukS</i>	4.1
	[MW_RS10235	MW1879	<i>map-W</i>	281.1
	[MW_RS10240	MW1880		392.7
	[MW_RS10245	MW1881	<i>hlb</i>	40.3
	[MW_RS10250	MW1882		6.1
	[MW_RS10570	MW1941	<i>lukG</i>	104.2
	[MW_RS10575	MW1942	<i>lukH</i>	108.9
	MW_RS12680	MW2341	<i>sbi</i>	511.0
	MW_RS12685			847.2
	MW_RS12690	MW2342	<i>hlgA</i>	5.5
	[MW_RS12695	MW2343	<i>hlgC</i>	54.5
	[MW_RS12700	MW2344	<i>hlgB</i>	24.5
	MW_RS13130	MW2420	<i>fnbB</i>	13.2
	MW_RS13135	MW2421	<i>fnbA</i>	134.6
	MW_RS14840			2.2
<i>tcs7R*</i>	[MW_RS06475	MW1206		1013.2
	[MW_RS06480	MW1207		671.3
	[MW_RS06490	MW1209	<i>tcs7R</i>	1034.1
	MW_RS06495	MW1210		35.8
	MW_RS06500	MW1211	<i>nuc</i>	6.7
<i>arlR*</i>	[MW_RS00330	MW0062		10.6
	[MW_RS00335	MW0063		13.9
	[MW_RS03515	MW0646		20.0
	[MW_RS03520	MW0647		18.1
	MW_RS03525	MW0648	<i>mgrA</i>	8.2
	MW_RS04150	MW0763		6.9
	MW_RS07000	MW1305	<i>arlR</i>	1526.0
	MW_RS13090	MW2412		27.7
	MW_RS13095	MW2413		23.6
	MW_RS14170	MW2612		4.4
<i>srrA*</i>	MW_RS00265	MW0051	<i>entH</i>	27.2
	MW_RS00270	MW0053		6.4
	MW_RS00370	MW0070	<i>plc</i>	5.3
	MW_RS00425	MW0081		14.2
	MW_RS00655	MW0123	<i>adhE</i>	3.2
	[MW_RS00820	MW0156	<i>argB</i>	2.2
	[MW_RS00825	MW0157	<i>argJ</i>	2.1
	[MW_RS00830	MW0158	<i>argC</i>	2.1
	[MW_RS00835	MW0159	<i>rocD1</i>	2.1
	[MW_RS01045	MW0201	<i>pflB</i>	85.4
	[MW_RS01050	MW0202	<i>pflA</i>	70.1
	[MW_RS01055	MW0203		11.8
	[MW_RS01115	MW0213		17.9
	[MW_RS01120	MW0214		36.6
	[MW_RS01125	MW0215		57.7
	[MW_RS01130	MW0216		43.2
	MW_RS01150	MW0218		2.3
	MW_RS01285	MW0243		3.2
	[MW_RS02275	MW0429		4.0
	[MW_RS02280	MW0430		2.9
	[MW_RS03530	MW0649		3.7
	MW_RS03535	MW0650		2.1
	MW_RS03545	MW0652		2.9
	MW_RS03660	MW0674	<i>queC</i>	2.7
	MW_RS04230	MW0780		2.3
	MW_RS04465	MW0825		3.1
	MW_RS04555	MW0843	<i>argG</i>	6.5
	[MW_RS05060	MW0942	<i>qoxC</i>	7.2
	[MW_RS05065	MW0943	<i>qoxB</i>	7.1
	[MW_RS05200	MW0968		22.1
	[MW_RS05205	MW0969		23.6
	MW_RS05210	MW0970		2.0
	[MW_RS05360	MW0999	<i>ctaB</i>	3.3

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>srrA*</i>				
	[MW_RS05365	MW1000		4.2
	MW_RS06565	MW1223	<i>rpsN</i>	4.0
	MW_RS07740	MW1446	<i>srrA</i>	915.9
	MW_RS08465	MW1586		2.0
	[MW_RS08600	MW1613	<i>hemD</i>	2.3
	[MW_RS08605	MW1614	<i>hemC</i>	2.3
	[MW_RS08610	MW1615	<i>hemX</i>	2.7
	[MW_RS08615	MW1616	<i>hemA</i>	2.3
	MW_RS08830	MW1654	<i>ackA</i>	3.7
	MW_RS09495			3.3
	[MW_RS09500	MW1772	<i>hemY</i>	2.8
	[MW_RS09505	MW1773	<i>hemH</i>	2.9
	[MW_RS09510	MW1774	<i>hemE</i>	2.8
	MW_RS09525	MW1776		2.1
	MW_RS10280	MW1885	<i>sak</i>	4.7
	[MW_RS11045	MW2026	<i>atpC</i>	2.4
	[MW_RS11050	MW2027	<i>atpD</i>	2.3
	[MW_RS11075	MW2032	<i>atpE</i>	2.0
	[MW_RS11080	MW2033	<i>atpB</i>	2.4
	MW_RS11185	MW2054	<i>coaW</i>	2.1
	MW_RS11270	MW2070	<i>czrB</i>	2.0
	MW_RS11535	MW2119	<i>lacC</i>	4.5
	MW_RS11970	MW2203		2.4
	MW_RS12440	MW2295		10.2
	[MW_RS12490	MW2304	<i>gltT</i>	2.3
	[MW_RS12495	MW2305		8.0
	MW_RS13380	MW2469	<i>clpL</i>	7.8
	[MW_RS13595	MW2509	<i>pyrD</i>	9.7
	[MW_RS13600	MW2510		3.9
	[MW_RS13755	MW2536	<i>nrdG</i>	18.8
	[MW_RS13760	MW2537	<i>nrdD</i>	17.4
	[MW_RS14225	MW2624		11.4
	[MW_RS14230	MW2625		25.0
	[MW_RS14235	MW2626		59.3
	MW_RS14350	MW0052b		7.6
	MW_RS14355			10.5
	MW_RS14905	MW2120	<i>lacB</i>	6.5
<i>phoP*</i>				
	MW_RS00120	MW0022	<i>walJ</i>	2.2
	[MW_RS00600	MW0114	<i>phnE1</i>	126.0
	[MW_RS00605	MW0115	<i>phnE2</i>	115.6
	[MW_RS00610	MW0116	<i>phnC</i>	135.6
	MW_RS00620	MW0118		201.0
	MW_RS00625	MW0119		56.7
	MW_RS00630			111.2
	MW_RS01305	MW0246	<i>rbsU</i>	2.6
	MW_RS01740	MW0330		2.5
	MW_RS02530			2.7
	MW_RS03055	MW0558		3.9
	MW_RS03070	MW0561		3.4
	MW_RS03080	MW0562		2.5
	MW_RS03540	MW0651		2.7
	MW_RS03855	MW0708		2.3
	[MW_RS04660	MW0865	<i>fabH</i>	2.5
	[MW_RS04665	MW0866	<i>fabF</i>	2.3
	MW_RS05290	MW0985	<i>potD</i>	2.7
	[MW_RS05805	MW1079	<i>lspA</i>	2.1
	[MW_RS05810	MW1080	<i>lspA</i>	2.1
	[MW_RS05965	MW1111	<i>fapR</i>	4.6
	[MW_RS05970	MW1112	<i>plsX</i>	4.4
	[MW_RS05975	MW1113	<i>fabD</i>	4.7
	[MW_RS05980	MW1114	<i>fabG</i>	4.2
	MW_RS05985			2.8
	[MW_RS06830	MW1273	<i>phoU</i>	729.0
	[MW_RS06835	MW1274	<i>pstB</i>	1350.8
	[MW_RS06840	MW1275	<i>pstA</i>	1810.6
	[MW_RS06845	MW1276	<i>pstC</i>	2170.3
	[MW_RS06850	MW1277	<i>pstS</i>	6281.4
	MW_RS07165	MW1332		2.1
	MW_RS07880	MW1472	<i>recN</i>	2.1
	MW_RS08720			2.5
	MW_RS08730	MW1637	<i>phoP</i>	1218.5
	MW_RS08930	MW1671	<i>tyrS</i>	2.2
	MW_RS09405	MW1762	<i>bsaD</i>	13.8
	MW_RS09410	MW1763	<i>bsaC</i>	7.7
	MW_RS09425	MW1766	<i>bsaA1</i>	27.2

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>			
	MW_RS09445	MW1770	2.4
	MW_RS09860	MW1810	2.1
	MW_RS11220		3.2
	MW_RS11255	MW2067	2.4
	MW_RS12465	MW2299	<i>scrA</i> 2.3
	[MW_RS13290	MW2451	<i>sdaAA</i> 2.5
	[MW_RS13295	MW2452	<i>sdaAB</i> 2.7
	MW_RS13305	MW2454	198.2
	MW_RS13310	MW2455	2.0
	MW_RS13365	MW2466	<i>mvaA</i> 2.1
	MW_RS13375	MW2468	<i>adaB</i> 2.5
	MW_RS13480	MW2488	<i>oatA</i> 2.4
	MW_RS13835	MW2547	<i>phoB</i> 435.2
	MW_RS13855	MW2552	<i>arcR</i> 2.0
	MW_RS13925	MW2565	5.3
	MW_RS14365		2.6
	MW_RS14665		2.1
<i>airR*</i>			
	[MW_RS01775	MW0337	4.6
	[MW_RS01780	MW0338	3.4
	[MW_RS01785	MW0339	<i>ychF</i> 2.8
	[MW_RS02830	MW0514	35.7
	[MW_RS02835	MW0515	<i>azo1</i> 34.5
	MW_RS03255	MW0597	4.0
	MW_RS03510	MW0645	<i>uppP</i> 2.8
	MW_RS04430	MW0818	13.6
	MW_RS06295	MW1173	12.5
	MW_RS06570	MW1224	<i>guaC</i> 8.7
	MW_RS06575		7.0
	MW_RS06580	MW1225	3.7
	MW_RS06645	MW1237	<i>acnA</i> 2.4
	MW_RS06945	MW1294	2.2
	MW_RS07025	MW1309	<i>tnp</i> 2.5
	MW_RS07030	MW1310	<i>ctpA</i> 2.3
	[MW_RS07040	MW1311	5.3
	[MW_RS07045	MW1312	<i>crr</i> 5.7
	[MW_RS07050	MW1313	<i>msrB</i> 5.8
	[MW_RS07055	MW1314	<i>msrA2</i> 4.7
	MW_RS07200	MW1340	<i>pbp2</i> 2.5
	MW_RS07340	MW1366	<i>cmk</i> 2.5
	MW_RS07375	MW1372	<i>fer</i> 11.1
	MW_RS08050	MW1505	<i>sodA</i> 5.1
	MW_RS09315	MW1745	<i>tnp</i> 2.9
	MW_RS09590	MW1789	<i>AirR</i> 1230.4
	MW_RS09825	MW1805	8.2
	MW_RS09910	MW1820	2.0
	MW_RS10015	MW1838	<i>rumA</i> 7.0
	MW_RS10045	MW1843	<i>putP</i> 5.1
	[MW_RS11090	MW2035	<i>mnaA</i> 2.3
	[MW_RS11095	MW2036	<i>upp</i> 2.4
	[MW_RS11100	MW2037	<i>glyA</i> 2.4
	[MW_RS11105	MW2038	2.3
	[MW_RS11400	MW2093	<i>lmrS</i> 2.2
	[MW_RS11405	MW2094	<i>sepA</i> 4.5
	[MW_RS11410	MW2095	<i>sdrM</i> 7.0
	MW_RS11575	MW2127	<i>pbuG</i> 2.2
	MW_RS12340	MW2277	<i>tcaA</i> 9.1
	MW_RS12345		7.9
	MW_RS13425	MW2477	52.3
	[MW_RS13770	MW2539	<i>cysG</i> 81.9
	[MW_RS13775	MW2540	<i>cysJ</i> 72.0
	MW_RS14155	MW2609	81.3
	MW_RS14510	MW0529b	56.0
<i>vraR*</i>			
	MW_RS09930	MW1824	<i>vraR</i> 1703.2
<i>agrA*</i>			
	MW_RS01935	MW0370	2.4
	MW_RS01940	MW0372	4.5
	MW_RS01945		12.5
	MW_RS03295	MW0605	<i>abcA</i> 2.0
	[MW_RS05690	MW1056	<i>psmβ1</i> 104.7
	[MW_RS05695	MW1057	<i>psmβ2</i> 214.0
	MW_RS10675	MW1963	<i>agrA</i> 1470.6
	MW_RS10680		4.1
	MW_RS14485		64.9

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>				
	MW_RS00395	MW0075		3.2
	MW_RS00400	MW0076		2.2
	[MW_RS00410	MW0078		4.2
	[MW_RS00415	MW0079		3.3
	[MW_RS00660	MW0124	<i>cap8A</i>	31.0
	[MW_RS00665	MW0125	<i>cap8B</i>	16.8
	[MW_RS00670	MW0126	<i>cap8C</i>	26.2
	[MW_RS00675	MW0127	<i>cap8D</i>	19.6
	[MW_RS00680	MW0128	<i>cap8E</i>	13.8
	[MW_RS00685	MW0129	<i>cap8F</i>	12.1
	[MW_RS00690	MW0130	<i>cap8G</i>	10.5
	[MW_RS00695	MW0131	<i>cap8H</i>	9.5
	[MW_RS00700	MW0132	<i>cap8I</i>	6.3
	[MW_RS00705	MW0133	<i>cap8J</i>	4.3
	[MW_RS00710	MW0134	<i>cap8K</i>	4.7
	[MW_RS00715	MW0135	<i>cap8L</i>	3.5
	[MW_RS00720	MW0136	<i>cap8M</i>	3.0
	[MW_RS00725	MW0137	<i>cap8N</i>	2.8
	[MW_RS00730	MW0138	<i>cap8O</i>	3.1
	MW_RS00805	MW0153		2.2
	MW_RS00995	MW0191		4.9
	MW_RS01105	MW0211		2.6
	[MW_RS01460	MW0277		3.1
	[MW_RS01465	MW0278		3.2
	[MW_RS01470	MW0279		3.2
	MW_RS01475	MW0280		2.7
	[MW_RS01535	MW0291		2.6
	[MW_RS01540	MW0292	<i>nanA</i>	2.5
	[MW_RS01570	MW0298		5.0
	[MW_RS01575	MW0299		8.1
	MW_RS01580			35.2
	MW_RS01610	MW0305		2.4
	MW_RS02900	MW0528	<i>proP</i>	2.0
	[MW_RS03935	MW0722	<i>hprK</i>	2.6
	[MW_RS03940	MW0723	<i>lgt</i>	2.6
	[MW_RS03945	MW0724		2.4
	[MW_RS03950	MW0725		2.1
	MW_RS04880	MW0907		2.3
	[MW_RS04995	MW0930	<i>sspC</i>	5.0
	[MW_RS05000	MW0931	<i>sspB</i>	4.4
	[MW_RS05005	MW0932	<i>sspA</i>	3.3
	[MW_RS05655	MW1050	<i>argF</i>	10.7
	[MW_RS05660	MW1051	<i>arcC1</i>	11.5
	[MW_RS05665	MW1052		4.5
	MW_RS07330	MW1365	<i>rpsA</i>	2.4
	[MW_RS09055	MW1693	<i>dat</i>	2.7
	[MW_RS09060	MW1694		2.8
	MW_RS09535	MW1778	<i>hit</i>	2.6
	MW_RS10515	MW1930		2.4
	MW_RS10530	MW1933		2.2
	[MW_RS10880	MW1995	<i>acpS</i>	2.0
	[MW_RS10885	MW1996		2.0
	[MW_RS10890	MW1997		2.1
	[MW_RS10895	MW1998		3.0
	[MW_RS10900	MW1999	<i>kdpC</i>	119.1
	[MW_RS10905	MW2000	<i>kdpB</i>	323.1
	[MW_RS10910	MW2001	<i>kdpA</i>	1009.7
	MW_RS10925	MW2003	<i>kdpE</i>	861.9
	MW_RS11260	MW2068		2.3
	MW_RS11490	MW2110		2.9
	MW_RS13785	MW2541	<i>gpxA2</i>	2.8
	MW_RS13935	MW2567		2.3
	MW_RS14000	MW2579		2.1
	MW_RS14005	MW2580		2.4
<i>hssR*</i>				
	MW_RS02990	MW0547	<i>mvaK2</i>	2.1
	MW_RS03550	MW0653		2.3
	MW_RS04145	MW0762		2.3
	MW_RS11030	MW2024	<i>murA1</i>	2.1
	MW_RS11305	MW2083	<i>mtlR</i>	2.7
	MW_RS12370	MW2282	<i>hssR</i>	2044.3
	MW_RS13700	MW2528		2.1
	MW_RS14140	MW2606		2.2
<i>nreC*</i>				
	MW_RS01840	MW0349		2.8
	MW_RS02425	MW0453	<i>spoVG</i>	2.9

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>nreC*</i>				
	MW_RS04300	MW0793		3.1
	MW_RS06660	MW1240	<i>plsY</i>	2.1
	MW_RS09920	MW1822		2.0
	[MW_RS12525	MW2313	<i>nreC</i>	1781.8
	[MW_RS12535	MW2315	<i>nreA</i>	7.9
	[MW_RS12540	MW2316	<i>narI</i>	26.8
	[MW_RS12545	MW2317	<i>narJ</i>	111.6
	[MW_RS12550	MW2318	<i>narH</i>	164.4
	MW_RS14765			2.3
<i>braR*</i>				
	MW_RS00245	MW0047		2.4
	MW_RS00250	MW0048		2.2
	MW_RS01645	MW0312		2.1
	MW_RS01730	MW0329		2.3
	MW_RS02180	MW0411		2.1
	MW_RS02245	MW0424		2.0
	MW_RS02640	MW0477	<i>ctsR</i>	2.0
	MW_RS03270	MW0600	<i>tagG</i>	2.1
	MW_RS03345	MW0615		2.1
	MW_RS03370	MW0619		2.2
	[MW_RS03555	MW0654		2.2
	[MW_RS03560	MW0655		2.0
	[MW_RS03565	MW0656		2.0
	MW_RS03860	MW0709	<i>llm</i>	2.3
	MW_RS03985	MW0730	<i>clpP</i>	2.3
	[MW_RS04480	MW0828	<i>mnhG1</i>	2.0
	[MW_RS04485	MW0829	<i>mnhF1</i>	2.1
	MW_RS04895	MW0910		2.0
	MW_RS05345	MW0996	<i>ftsW</i>	2.2
	MW_RS05875	MW1093	<i>rpoZ</i>	2.7
	MW_RS06865	MW1279	<i>cvfB</i>	2.5
	MW_RS06930	MW1291		2.2
	MW_RS07250	MW1350		2.1
	MW_RS07675	MW1433		2.1
	MW_RS07830	MW1463		2.0
	MW_RS07935	MW1483		2.3
	MW_RS09190	MW1719		2.3
	MW_RS09205	MW1722		2.4
	MW_RS10635	MW1955		2.0
	MW_RS11230	MW2062	<i>deoD</i>	2.0
	MW_RS12145	MW2238		2.0
	[MW_RS12295	MW2269		2.1
	[MW_RS12300	MW2270		2.1
	MW_RS12325	MW2275		4.3
	[MW_RS12380	MW2284		2.5
	[MW_RS12385	MW2285		2.2
	MW_RS12790	MW2360		2.0
	MW_RS12880	MW2373		2.0
	MW_RS13115	MW2417		2.6
	MW_RS13610	MW2512		2.2
	[MW_RS13805	MW2542		19.5
	[MW_RS13810	MW2543		16.1
	[MW_RS13820	MW2545	<i>braR</i>	3260.5
Down-regulated genes				
Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR*</i>				
	MW_RS02885	MW0525		-2.0
	[MW_RS03235	MW0593		-15.8
	[MW_RS03240	MW0594		-10.6
	[MW_RS03245	MW0595		-8.0
	MW_RS04135	MW0761		-3.4
	MW_RS04255	MW0785		-2.4
	MW_RS04745	MW0882		-2.2
	MW_RS04885	MW0908		-2.4
	MW_RS05240	MW0975		-2.6
	MW_RS06595	MW1228		-2.1
	MW_RS07360	MW1369	<i>ebpS</i>	-2.9
	MW_RS07850	MW1466		-2.2
	MW_RS08810	MW1651		-2.0
	[MW_RS09810	MW1802		-2.3
	[MW_RS09815	MW1803		-3.0
	MW_RS11165	MW2050		-2.0
	MW_RS12485	MW2303		-3.0
	MW_RS12665	MW2339	<i>gpmA</i>	-11.0
	MW_RS13035	MW2403		-2.4

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>walR*</i>	MW_RS13685	MW2525		-2.0
<i>arlR*</i>	MW_RS01320	MW0249		-2.8
	MW_RS03570	MW0657		-2.0
	MW_RS06360	MW1187	<i>hfq</i>	-2.6
	MW_RS06460	MW1203		-3.4
	MW_RS13390	MW2471	<i>feoB</i>	-3.3
	[MW_RS13580	MW2506		-4.6
	[MW_RS13585	MW2507		-5.4
	MW_RS13975	MW2575	<i>sraP</i>	-2.3
	MW_RS14015	MW2582		-4.7
	MW_RS14110	MW2600		-3.4
<i>srrA*</i>	[MW_RS00740	MW0140	<i>isdI</i>	-3.1
	[MW_RS00745	MW0141		-4.1
	MW_RS00790	MW0150		-3.9
	[MW_RS02625	MW0474	<i>pdxS</i>	-2.2
	[MW_RS02630	MW0475	<i>pdxT</i>	-2.4
	MW_RS03325	MW0611	<i>fhuG</i>	-2.3
	MW_RS03885	MW0714	<i>hpf</i>	-2.1
	[MW_RS04535	MW0839	<i>rocD2</i>	-2.4
	[MW_RS04540	MW0840	<i>gluD</i>	-2.0
	MW_RS05085	MW0946	<i>folD</i>	-2.8
	MW_RS05350	MW0997	<i>pycA</i>	-2.1
	[MW_RS07955	MW1487	<i>gcvPB</i>	-2.1
	[MW_RS07965	MW1489	<i>gcvT</i>	-2.2
	[MW_RS08740	MW1638	<i>icd</i>	-2.5
	[MW_RS08745	MW1639	<i>citZ</i>	-2.8
	MW_RS08955	MW1675	<i>fhs</i>	-2.9
	[MW_RS09255	MW1734	<i>menC</i>	-2.2
	[MW_RS09260	MW1735	<i>menE</i>	-2.4
	MW_RS11440	MW2101	<i>htsC</i>	-2.5
	MW_RS13040	MW2404		-2.2
	MW_RS13185	MW2431		-2.5
<i>phoP*</i>	MW_RS00840	MW0160	<i>brnQ1</i>	-2.7
	MW_RS01515	MW0287		-2.4
	MW_RS01745	MW0331		-2.1
	MW_RS01765	MW0335		-4.4
	MW_RS02515	MW0469	<i>folP</i>	-2.2
	MW_RS02895	MW0527		-2.5
	MW_RS03095	MW0565		-2.2
	MW_RS03135	MW0573		-2.8
	MW_RS03725	MW0686	<i>hisC</i>	-2.5
	MW_RS04225	MW0779		-3.4
	MW_RS04765	MW0886		-2.4
	MW_RS04805	MW0894		-2.0
	MW_RS05010	MW0933	<i>patA</i>	-2.9
	MW_RS05835	MW1085	<i>carA</i>	-2.6
	MW_RS06550	MW1220		-2.0
	MW_RS06785	MW1265		-2.1
	MW_RS08905			-3.0
	MW_RS08975	MW1679	<i>ccpA</i>	-2.0
	MW_RS08985	MW1680	<i>aroA2</i>	-2.7
	MW_RS09615			-3.6
	MW_RS10150	MW1861	<i>aldH</i>	-2.4
	MW_RS10170	MW1866		-2.4
	MW_RS10760	MW1977	<i>ilvD</i>	-5.2
	[MW_RS11195	MW2056		-2.0
	[MW_RS11200	MW2057	<i>hmrA</i>	-2.9
	[MW_RS11635	MW2140	<i>ecfA2</i>	-2.0
	[MW_RS11640	MW2141	<i>ecfA1</i>	-2.6
	MW_RS11855	MW2182		-2.1
	MW_RS12165	MW2242		-2.7
	MW_RS12190	MW2247		-2.3
	MW_RS12265	MW2261		-2.8
	MW_RS12595	MW2327		-3.4
	MW_RS12645	MW2336	<i>tcyA</i>	-2.2
	MW_RS12845	MW2368		-2.1
	MW_RS13000	MW2397		-2.7
	MW_RS13275	MW2449		-2.3
	MW_RS13280	MW2450		-3.9
	[MW_RS13320	MW2457		-2.2
	[MW_RS13325	MW2458		-2.1
	MW_RS13670	MW2522		-2.6
	[MW_RS14115	MW2601		-3.4

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>phoP*</i>	[MW_RS14120	MW2602		-2.6
	MW_RS14160	MW2610	<i>pcp</i>	-2.1
	MW_RS14445			-4.9
	MW_RS14995			-3.8
<i>airR*</i>	MW_RS02825	MW0513	<i>tadA</i>	-2.4
	[MW_RS12030	MW2215	<i>sarY</i>	-3.5
	[MW_RS12035	MW2216		-4.3
<i>kdpE*</i>	MW_RS04725	MW0878	<i>trpS</i>	-2.1
	MW_RS05900	MW1098		-2.6
	MW_RS07020	MW1308		-2.2
	MW_RS07095	MW1321		-2.2
	MW_RS07920	MW1480	<i>accB</i>	-2.0
	MW_RS09105	MW1703		-2.1
	MW_RS10075	MW1849	<i>purB</i>	-2.1
	MW_RS11130	MW2043	<i>tdk</i>	-2.2
	MW_RS11175	MW2052	<i>rpoE</i>	-2.0
	MW_RS12085	MW2226		-2.1
	MW_RS12280	MW2266	<i>gltS</i>	-2.0
	MW_RS14615	MW0917b		-3.2
<i>hssR*</i>	MW_RS04380	MW0809		-2.0
<i>nreC*</i>	MW_RS02375	MW0444	<i>rsml</i>	-2.1
	MW_RS06235	MW1161		-2.3
	MW_RS12830	MW2366		-2.1
	MW_RS14620	MW0926a		-7.3
<i>braR*</i>	MW_RS01270	MW0241		-3.0
	MW_RS01410	MW0267		-4.5
	MW_RS01920	MW0366	<i>guaB</i>	-2.4
	MW_RS02435	MW0454	<i>glmU</i>	-2.2
	[MW_RS02690	MW0486	<i>mrnC</i>	-2.4
	[MW_RS02695	MW0487		-2.0
	MW_RS03690	MW0680		-2.1
	MW_RS04585	MW0849	<i>addA</i>	-2.0
	MW_RS05460	MW1017	<i>srtB</i>	-3.1
	MW_RS06085	MW1133	<i>topA</i>	-2.3
	MW_RS06135	MW1141	<i>pyrH</i>	-2.5
	[MW_RS06175	MW1149	<i>nusA</i>	-2.1
	[MW_RS06180	MW1150		-2.4
	[MW_RS06185	MW1151		-2.8
	MW_RS06245	MW1163		-2.0
	MW_RS06965	MW1298		-2.2
	[MW_RS06985	MW1302	<i>odhB</i>	-2.1
	[MW_RS06990	MW1303	<i>odhA</i>	-2.5
	MW_RS07895	MW1475	<i>xseB</i>	-2.3
	[MW_RS08250	MW1545	<i>nadD</i>	-2.6
	[MW_RS08255	MW1546		-2.4
	[MW_RS08260	MW1547	<i>aroE</i>	-2.3
	[MW_RS08265	MW1548		-2.5
	[MW_RS08340	MW1562		-2.3
	[MW_RS08345	MW1563		-2.2
	MW_RS08370	MW1568	<i>alaS</i>	-2.4
	MW_RS08485	MW1590	<i>queA</i>	-2.0
	MW_RS09010	MW1684		-2.3
	[MW_RS09240	MW1731		-2.0
	[MW_RS09245	MW1732		-2.2
	[MW_RS10055	MW1845	<i>ligA</i>	-2.3
	[MW_RS10060	MW1846	<i>pcrA</i>	-2.1
	[MW_RS11905	MW2190	<i>mobB</i>	-2.5
	[MW_RS11910	MW2191	<i>moeA</i>	-2.6
	MW_RS12865	MW2372	<i>opuCA</i>	-2.1
	MW_RS14075	MW2593	<i>hisA</i>	-3.7
	MW_RS14240	MW2627	<i>noc</i>	-2.2

† Specific regulation of *efb* by *saeSR* was experimentally demonstrated.

Tabla 5. Genes regulados uniformemente por múltiples TCSs

Genes cuya expresión se vio alterada en el mismo sentido (activados o inhibidos) por más de un RR*. Para cada gen se indican los RR* que afectaron su expresión ($p < 0.05$ and fold change > 2). Las columnas denominadas Locus Tag muestran versiones diferentes de la anotación del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2.

Locus tag	Gene name	Up-regulated in TCS	Down-regulated in TCS
Up-regulated genes			
MW_RS00815	MW0155	SaeR, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS01140	MW0217	<i>ldhA</i> SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS01485	MW0282	SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS02155	MW0407	<i>ndhF</i> SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS02160	MW0408	SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS03155	MW0577	PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS04000	MW0733	<i>gapR</i> SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS05530	MW1030	<i>sdhC</i> PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS07730	MW1444	SaeR, ArlR, PhoP, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC,	
MW_RS08670	MW1625	<i>lysP</i> SrrB, PhoP, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS12655	N/A	PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS12660	MW2338	WalR, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
MW_RS13050	MW2405	SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR	
Down-regulated genes			
MW_RS00460	MW0088	<i>sirA</i>	WalR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS00960	MW0184	<i>rlp</i>	ArlR, SrrB, PhoP, AirR, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS01680	MW0319		SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS02210	MW0417		SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS02215	MW0418		SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, KdpE, HssR, NreC
MW_RS03315	MW0609	<i>fhuC</i>	SrrB, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS04285	MW0790	<i>metN2</i>	SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05095	MW0948	<i>purK</i>	GraR, SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05100	MW0949	<i>purC</i>	SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05105	MW0950	<i>purS</i>	SaeR, TCS7R, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	SaeR, ArlR, SrrB, PhoP, AirR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05440	MW1013	<i>isdC</i>	SrrB, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS05445	MW1014	<i>isdD</i>	SrrB, PhoP, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS11450	MW2103		WalR, SrrB, AirR, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR
MW_RS11965	MW2202	<i>fhuD2</i>	SrrA, PhoP, VraR, AgrA, KdpE, HssR, NreC, BraR

Tabla 6. Número de proteínas reguladas por cada TCS.

Se ha analizado la expresión de las proteínas en las muestras expresando la versión fosfomimética de los RR (RR*). Las columnas indican el número de proteínas activadas o inhibidas por cada RR* considerando un cambios en los niveles de expresión de Fold-Change >2 o <-2 y un valor p corregido <0.05 .

Phosphomimetic RR*	Number of proteins detected	Number of proteins with a fold change of	
		$>2^{**}$	$<-2^{**}$
WalR	1721	9	38
HptR	1721	4	1
LytR	1721	8	5
GraR	1721	11	9
SaeR	1721	37	12
TCS7	1721	6	2
ArlR	1721	14	10
SrrA	1721	33	26
PhoP	1721	21	37
AirR	1721	29	16
VraR	1721	9	4
AgrA	1721	6	5
KdpE	1721	12	12
HssR	1721	8	4
NreC	1721	11	12
BraR	1721	13	6

Tabla 7. Proteínas reguladas por cada uno de los TCSs.

Las proteínas diferencialmente expresadas se identificaron en las cepas que expresaban cada uno de los RR*. Se establecieron como diferencialmente expresadas aquellas proteínas cuya expresión cambió al menos dos veces con un valor de p corregido <0.05. Las columnas denominadas Locus Tag muestran versiones diferentes de la anotación del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2. Los loci destacados en color rojo corresponden a proteínas cuya expresión se vio alterada también a nivel transcricional.

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>walR*</i>			
	MW_RS00100	MW0018 <i>walR</i>	20.9
	MW_RS00775	MW0147 <i>ssuA</i>	-2.1
	MW_RS01565	MW0297 <i>lip2</i>	3.8
	MW_RS01750	MW0332 <i>metE</i>	-5.1
	MW_RS01835	MW0348	-4.5
	MW_RS02005	MW0381	-4.3
	MW_RS02205	MW0416 <i>metN1</i>	-3.4
	MW_RS02340	MW0438	-7.4
	MW_RS02425	MW0453 <i>spoVG</i>	-9.6
	MW_RS03235	MW0593	-2.2
	MW_RS03245	MW0595	-2.7
	MW_RS03485	MW0640	-2.5
	MW_RS03575	MW0658	6.1
	MW_RS03915	MW0718	-3.0
	MW_RS04300	MW0793	-15.6
	MW_RS04430	MW0818	-3.2
	MW_RS04440	MW0820	-2.5
	MW_RS04530	MW0838	-2.8
	MW_RS04650	MW0863	-3.2
	MW_RS04685	MW0870 <i>oppD</i>	-2.1
	MW_RS04730	MW0879 <i>spxA</i>	-3.7
	MW_RS05030	MW0936 <i>atl</i>	4.0
	MW_RS05110	MW0951 <i>purQ</i>	-2.2
	MW_RS05435	MW1012 <i>isdA</i>	-2.3
	MW_RS06465	MW1204	-3.7
	MW_RS06525	MW1216 <i>thrC</i>	-2.3
	MW_RS06880	MW1282 <i>asd</i>	-2.8
	MW_RS06900	MW1286 <i>dapI</i>	-2.2
	MW_RS07360	MW1369 <i>ebpS</i>	-2.2
	MW_RS07375	MW1372 <i>fer</i>	2.9
	MW_RS08380	MW1570	-3.0
	MW_RS08895	MW1665	-2.4
	MW_RS08900	MW1666 <i>serA</i>	-2.7
	MW_RS08910	MW1667	-2.9
	MW_RS09085	MW1699 <i>sasC</i>	10.1
	MW_RS09395	MW1760 <i>bsaF</i>	3.3
	MW_RS09920	MW1822	-13.9
	MW_RS10580	MW1943 <i>dapE</i>	-2.5
	MW_RS11070	MW2031 <i>atpF</i>	-2.7
	MW_RS11175	MW2052 <i>rpoE</i>	-2.1
	MW_RS11320	MW2086 <i>fntB</i>	11.4
	MW_RS11465	MW2105	-2.1
	MW_RS12200	MW2249	-2.5
	MW_RS12265	MW2261	-2.2
	MW_RS12665	MW2339	-2.1
	MW_RS12845	MW2368	-2.4
	MW_RS13360	MW2465 <i>ssaA like</i>	13.6
<i>hptR*</i>			
	MW_RS01030	MW0198 <i>hptR</i>	31.2
	MW_RS07815	MW1461 <i>malA</i>	2.5
	MW_RS11165	MW2050	-2.2
	MW_RS13320	MW2457	6.4
	MW_RS13535	MW2497	3.7
<i>lytR*</i>			
	MW_RS00035	MW0007 <i>nnrD</i>	4.2
	MW_RS00360	MW0068	-2.8
	MW_RS01250	MW0237 <i>lytR</i>	280.9
	MW_RS01255	MW0238 <i>lrgA</i>	12.4
	MW_RS01260	MW0239 <i>lrgB</i>	79.4
	MW_RS01275	MW0242 <i>bglA</i>	2.3
	MW_RS03675	MW0677	-2.2
	MW_RS03915	MW0718	-4.4
	MW_RS04955	MW0922	-2.3
	MW_RS05495	MW1024	-2.3
	MW_RS09395	MW1760 <i>bsaF</i>	3.5
	MW_RS09825	MW1805	3.5
	MW_RS11110	MW2039 <i>ptpB</i>	2.1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>graR*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	4.3
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-2.2
	MW_RS02005	MW0381		-2.5
	MW_RS03380	MW0621	<i>graR</i>	717.1
	MW_RS04410	MW0814	<i>dltA</i>	8.5
	MW_RS04425	MW0817	<i>dltD</i>	15.4
	MW_RS04650	MW0863		-3.2
	MW_RS05375	MW1001		2.1
	MW_RS06195	MW1153	<i>rbfA</i>	-2.5
	MW_RS06650	MW1238		-2.1
	MW_RS06700	MW1247	<i>mprF</i>	28.5
	MW_RS09085	MW1699	<i>sasC</i>	4.5
	MW_RS11485	MW2109		-3.0
	MW_RS12000	MW2210	<i>ureF</i>	4.0
	MW_RS13965	MW2573	<i>asp1</i>	-2.8
	MW_RS14190	MW2617	<i>nixA</i>	6.3
	MW_RS14195	MW2618		14.2
	MW_RS14205	MW2620	<i>vraD</i>	9.4
	MW_RS14315	MW2548		-3.6
<i>saeR*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	14.9
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	6.6
	MW_RS00525	MW0100	<i>butA</i>	5.0
	MW_RS00560	MW0107	<i>sodM</i>	2.4
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-5.7
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-2.3
	MW_RS01070	MW0206	<i>coa</i>	219.5
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	16.6
	MW_RS01705	MW0324		4.6
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-3.3
	MW_RS01820	MW0345		48.1
	MW_RS02010	MW0382	<i>set16</i>	10.8
	MW_RS02050	MW0388	<i>set22</i>	11.7
	MW_RS02065	MW0391	<i>set25</i>	6.7
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-2.5
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-4.8
	MW_RS03630	MW0668	<i>saeR</i>	28.4
	MW_RS03640	MW0670	<i>saeP</i>	1327.3
	MW_RS03715	MW0684	<i>opuBA</i>	2.4
	MW_RS03720	MW0685	<i>opuBB</i>	2.2
	MW_RS04165	MW0767	<i>emp</i>	163.4
	MW_RS04170	MW0768		9.2
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i>	13.9
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-2.7
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-4.9
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-2.1
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-4.1
	MW_RS05575	MW1038	<i>flr</i>	23.2
	MW_RS05585	MW1040	<i>fib</i>	865.8
	MW_RS07130	MW1327	<i>tdcB</i>	27.1
	MW_RS07135	MW1328	<i>ald1</i>	29.4
	MW_RS07415	MW1379	<i>lukS</i>	5.4
	MW_RS07815	MW1461	<i>malA</i>	2.2
	MW_RS08195	MW1534	<i>hrcA</i>	2.2
	MW_RS08900	MW1666	<i>serA</i>	-2.2
	MW_RS09900	MW1818		-3.8
	MW_RS10235	MW1879		65.4
	MW_RS10240	MW1880		2703.9
	MW_RS10570	MW1941		61.9
	MW_RS10575	MW1942		196.2
	MW_RS11110	MW2039	<i>ptpB</i>	2.0
	MW_RS11255	MW2067	<i>manA</i>	-4.2
	MW_RS12055	MW2220		2.2
	MW_RS12680	MW2341	<i>sbi</i>	499.9
	MW_RS12690	MW2342	<i>hlgA</i>	2.7
	MW_RS12695	MW2343	<i>hlgC</i>	48.6
	MW_RS12700	MW2344	<i>hlgB</i>	46.6
	MW_RS13130	MW2420	<i>fnbB</i>	4.0
	MW_RS13135	MW2421	<i>fnbA</i>	113.1
<i>tcs7R*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	4.4
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	4.5
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	3.3
	MW_RS01705	MW0324		3.6
	MW_RS03730	MW0687		-3.5
	MW_RS06475	MW1206		112.9
	MW_RS06490	MW1209	<i>tcs7R</i>	60.6
	MW_RS09050	MW1692		-2.6

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>arlR*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	2.6
	MW_RS00840	MW0160	<i>brnQ1</i>	2.8
	MW_RS01320	MW0249		-2.7
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	4.5
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3.9
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-2.3
	MW_RS03515	MW0646		18.2
	MW_RS03520	MW0647		25.4
	MW_RS04150	MW0763		12.1
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-3.4
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-3.4
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-2.4
	MW_RS07000	MW1305	<i>arlR</i>	89.9
	MW_RS07115	MW1324	<i>ebh</i>	-5.1
	MW_RS07815	MW1461	<i>malA</i>	2.6
	MW_RS10015	MW1838	<i>rumA</i>	3.2
	MW_RS10110	MW1855	<i>nos</i>	8.2
	MW_RS11320	MW2086	<i>fntB</i>	-5.0
	MW_RS11990	MW2208	<i>ureC</i>	-3.2
	MW_RS12015	MW2213	<i>sarR</i>	4.0
	MW_RS12400	MW2288		2.3
	MW_RS13110	MW2416		-2.3
	MW_RS13195	MW2433		3.5
	MW_RS14170	MW2612	<i>capM</i>	10.2
<i>srrA*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	11.8
	MW_RS00105	MW0019	<i>walk</i>	-3.0
	MW_RS00425	MW0081		10.8
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-4.4
	MW_RS00785	MW0149		-2.4
	MW_RS01045	MW0201	<i>pflB</i>	174.9
	MW_RS01115	MW0213		3.9
	MW_RS01120	MW0214		8.5
	MW_RS01130	MW0216		177.3
	MW_RS01150	MW0218		3.0
	MW_RS01205	MW0229		-3.2
	MW_RS01495	MW0284		2.5
	MW_RS01705	MW0324		12.3
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-5.1
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-2.4
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2.2
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-4.7
	MW_RS03110	MW0568	<i>adh</i>	3.2
	MW_RS04440	MW0820		-3.7
	MW_RS04555	MW0843	<i>argG</i>	3.5
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-5.0
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-10.0
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-8.5
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-13.2
	MW_RS05065	MW0943	<i>qoxB</i>	3.1
	MW_RS05070	MW0944	<i>qoxA</i>	3.6
	MW_RS05350	MW0997	<i>pycA</i>	-2.0
	MW_RS06465	MW1204		-2.5
	MW_RS06505	MW1212		4.6
	MW_RS06880	MW1282	<i>asd</i>	-8.3
	MW_RS06895	MW1285	<i>dapH</i>	-3.3
	MW_RS06900	MW1286	<i>dapI</i>	-2.7
	MW_RS07055	MW1314	<i>msrA2</i>	-5.0
	MW_RS07130	MW1327	<i>tdcB</i>	27.9
	MW_RS07135	MW1328	<i>ald1</i>	34.2
	MW_RS07740	MW1446	<i>srrA</i>	107.5
	MW_RS07965	MW1489	<i>gcvT</i>	-2.1
	MW_RS08465	MW1586	<i>recJ</i>	2.1
	MW_RS08900	MW1666	<i>serA</i>	-2.0
	MW_RS08910	MW1667		-3.2
	MW_RS09500	MW1772	<i>hemY</i>	2.0
	MW_RS09505	MW1773	<i>hemH</i>	2.1
	MW_RS09605	MW1792	<i>fumC</i>	-2.0
	MW_RS10110	MW1855	<i>nos</i>	5.8
	MW_RS11235	MW2063	<i>dps</i>	11.6
	MW_RS11240	MW2064		11.7
	MW_RS11565	MW2125		2.0
	MW_RS11970	MW2203		2.7
	MW_RS12390	MW2286	<i>mgo1</i>	-2.2
	MW_RS12410	MW2290	<i>paiA</i>	-2.2
	MW_RS12585	MW2325		5.2

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>srrA*</i>				
	MW_RS12970	MW2391	<i>opp-1B</i>	2.9
	MW_RS13380	MW2469	<i>clpL</i>	6.0
	MW_RS13535	MW2497		4.3
	MW_RS13590	MW2508		2.7
	MW_RS13595	MW2509	<i>pyrD</i>	3.9
	MW_RS13660	MW2521	<i>ldhB</i>	2.0
	MW_RS13760	MW2537	<i>nrdD</i>	70.8
	MW_RS13895	MW2559	<i>isaB</i>	-3.7
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	4.9
	MW_RS00125	MW0023	<i>adsA</i>	19.9
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	7.0
	MW_RS00610	MW0116	<i>phnC</i>	60.1
	MW_RS00615	MW0117	<i>phnD</i>	181.5
	MW_RS00620	MW0118		173.3
	MW_RS00625	MW0119		16.0
	MW_RS00775	MW0147	<i>ssuA</i>	-2.9
	MW_RS00785	MW0149		-2.3
	MW_RS01205	MW0229		-2.9
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i>	9.8
	MW_RS01590	MW0301		2.1
	MW_RS01705	MW0324		6.3
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i>	-11.4
	MW_RS01830	MW0347		-2.1
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-4.7
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2.9
<i>phoP*</i>				
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-8.2
	MW_RS02340	MW0438		-6.0
	MW_RS03490	MW0641		-2.2
	MW_RS03585	MW0660	<i>fruR</i>	-2.9
	MW_RS03730	MW0687		-3.1
	MW_RS03885	MW0714	<i>hpf</i>	-2.5
	MW_RS03915	MW0718		-2.3
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i>	111.7
	MW_RS04545	MW0841	<i>glpQ</i>	16.1
	MW_RS04575	MW0847	<i>spsB</i>	2.3
	MW_RS04680	MW0869	<i>oppC</i>	-5.5
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i>	-13.6
	MW_RS04690	MW0871	<i>oppF</i>	-5.5
	MW_RS04695	MW0872	<i>oppA</i>	-7.7
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-3.1
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-4.5
	MW_RS05135	MW0956	<i>purH</i>	-2.2
	MW_RS05760	MW1070		-3.6
	MW_RS06520	MW1215	<i>dhoM</i>	-3.8
	MW_RS06525	MW1216	<i>thrC</i>	-4.0
	MW_RS06825	MW1272		-2.1
	MW_RS06830	MW1273	<i>phoU</i>	172.8
	MW_RS06835	MW1274	<i>pstB</i>	335.3
	MW_RS06850	MW1277	<i>pstS</i>	771.3
	MW_RS06880	MW1282	<i>asd</i>	-5.7
	MW_RS06895	MW1285	<i>dapH</i>	-2.5
	MW_RS06900	MW1286	<i>dapI</i>	-2.7
	MW_RS08465	MW1586	<i>recJ</i>	2.1
	MW_RS08730	MW1637	<i>PhoP</i>	324.7
	MW_RS08895	MW1665		-3.0
	MW_RS08900	MW1666	<i>serA</i>	-4.3
	MW_RS08910	MW1667		-3.5
	MW_RS08985	MW1680	<i>aroA2</i>	-2.7
	MW_RS09085	MW1699	<i>sasC</i>	9.3
	MW_RS10150	MW1861	<i>aldH</i>	-2.1
	MW_RS11165	MW2050		-2.8
	MW_RS11415	MW2096		-3.5
	MW_RS12500	MW2306	<i>sarZ</i>	-2.4
	MW_RS12845	MW2368		-2.2
	MW_RS13835	MW2547	<i>phoB</i>	146.2
	MW_RS13925	MW2565		8.2
<i>airR*</i>				
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	3.2
	MW_RS01495	MW0284		-2.3
	MW_RS01685	MW0320	<i>efeB</i>	3.3
	MW_RS01705	MW0324		5.4
	MW_RS01775	MW0337		3.9
	MW_RS01830	MW0347		-2.0
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i>	-3.5
	MW_RS02215	MW0418	<i>metQ2</i>	-2.2

Two Component System	Locus Tag	Gene	Fold Change
<i>airR*</i>			
	MW_RS02830	MW0514	21.9
	MW_RS03675	MW0677	-2.4
	MW_RS03915	MW0718	-4.1
	MW_RS04300	MW0793	-2.1
	MW_RS04430	MW0818	9.9
	MW_RS04450	MW0822	<i>sufA</i> -7.8
	MW_RS04575	MW0847	<i>spsB</i> 6.2
	MW_RS04685	MW0870	<i>oppD</i> -2.0
	MW_RS05080	MW0945	37.5
	MW_RS05375	MW1001	2.5
	MW_RS05435	MW1012	<i>isdA</i> -2.1
	MW_RS05835	MW1085	<i>carA</i> -2.2
	MW_RS05860	MW1090	-3.1
	MW_RS06290	MW1172	16.3
	MW_RS06295	MW1173	28.0
	MW_RS06300	MW1174	3.9
	MW_RS06570	MW1224	<i>guaC</i> 4.3
	MW_RS06710	MW1249	<i>msrR</i> 5.6
	MW_RS07055	MW1314	<i>msrA2</i> 10.1
	MW_RS08925	MW1670	<i>hrtA1</i> 4.1
	MW_RS08985	MW1680	<i>araA2</i> -2.1
	MW_RS09550	MW1782	<i>prsA</i> 7.5
	MW_RS09590	MW1789	<i>airR</i> 607.5
	MW_RS09875	MW1813	<i>recX</i> 2.0
	MW_RS09880	MW1814	<i>mgt</i> 50.3
	MW_RS11095	MW2036	<i>upp</i> 2.3
	MW_RS11415	MW2096	-2.7
	MW_RS12105	MW2230	5.1
	MW_RS12170	MW2243	9.2
	MW_RS12200	MW2249	-2.6
	MW_RS12265	MW2261	-2.3
	MW_RS12340	MW2277	<i>tcaA</i> 7.4
	MW_RS12775	MW2357	42.8
	MW_RS13770	MW2539	<i>cysG</i> 48.4
	MW_RS13775	MW2540	<i>cysJ</i> 125.3
	MW_RS14155	MW2609	83.9
	MW_RS14195	MW2618	6.5
<i>vraR*</i>			
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i> 4.2
	MW_RS00105	MW0019	<i>walk</i> -2.1
	MW_RS00840	MW0160	<i>brnQ1</i> 3.4
	MW_RS03995	MW0732	-2.4
	MW_RS04555	MW0843	<i>argG</i> 2.3
	MW_RS05080	MW0945	6.6
	MW_RS05375	MW1001	2.5
	MW_RS05715	MW1061	<i>mraZ</i> 3.7
	MW_RS09550	MW1782	<i>prsA</i> 2.5
	MW_RS09930	MW1824	<i>vraR</i> 213.8
	MW_RS11165	MW2050	-2.8
	MW_RS12775	MW2357	3.5
	MW_RS12815	MW2364	<i>kimA</i> -2.7
<i>agrA*</i>			
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i> 3.6
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i> 3.3
	MW_RS00880	MW0167	<i>murR</i> 6.8
	MW_RS03585	MW0660	<i>fruR</i> -2.6
	MW_RS03675	MW0677	-2.5
	MW_RS04555	MW0843	<i>argG</i> 2.0
	MW_RS10675	MW1963	<i>agrA</i> 84.5
	MW_RS11165	MW2050	-3.7
	MW_RS11435	MW2100	-2.1
	MW_RS12135	MW2236	6.8
	MW_RS12410	MW2290	<i>paiA</i> -2.1
<i>kdpE*</i>			
	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i> 4.2
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i> -3.4
	MW_RS01215	MW0230	<i>tarF</i> -2.3
	MW_RS01540	MW0292	3.1
	MW_RS01565	MW0297	<i>lip2</i> 551.7
	MW_RS01590	MW0301	9.0
	MW_RS01750	MW0332	<i>metE</i> -2.1
	MW_RS02205	MW0416	<i>metN1</i> -3.0
	MW_RS02765	MW0501	<i>rpsG</i> 10.5
	MW_RS03145	MW0575	-2.4
	MW_RS03675	MW0677	-2.7
	MW_RS04175	MW0769	<i>nuc</i> 36.1

Two Component System	Locus Tag		Gene	Fold Change
<i>kdpE*</i>	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2.2
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2.5
	MW_RS05270	MW0981		3.5
	MW_RS05635	MW1046		-3.3
	MW_RS08465	MW1586	<i>recJ</i>	2.1
	MW_RS10905	MW2000	<i>kdpB</i>	40.6
	MW_RS10925	MW2003	<i>kdpE</i>	77.9
	MW_RS11165	MW2050		-2.1
	MW_RS12095	MW2228		-2.6
	MW_RS12610	MW2330		2.0
	MW_RS12845	MW2368		-4.1
	MW_RS13170	MW2427		7.2
<i>hssR*</i>	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	4.0
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	4.4
	MW_RS01705	MW0324		5.7
	MW_RS02820	MW0512	<i>dgk</i>	-3.1
	MW_RS03585	MW0660	<i>fruR</i>	-2.0
	MW_RS04420	MW0816	<i>dltC</i>	4.3
	MW_RS09530	MW1777	<i>escA</i>	2.7
	MW_RS11020	MW2022		-4.2
	MW_RS12180	MW2245		-3.3
	MW_RS12360	MW2280	<i>hrtA</i>	121.6
	MW_RS12365	MW2281	<i>hrtB</i>	36.2
	MW_RS14195	MW2618		4.4
<i>nreC*</i>	MW_RS00035	MW0007	<i>nnrD</i>	3.4
	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	5.3
	MW_RS00770	MW0146	<i>ssuB</i>	-4.7
	MW_RS01705	MW0324		4.0
	MW_RS02005	MW0381		-2.9
	MW_RS02395	MW0447	<i>rmnV</i>	-2.8
	MW_RS03580	MW0659		-2.4
	MW_RS03675	MW0677		-2.3
	MW_RS03915	MW0718		-2.4
	MW_RS04450	MW0822	<i>sufA</i>	-9.5
	MW_RS07675	MW1433		-2.6
	MW_RS08040	MW1503	<i>rpmG</i>	8.0
	MW_RS11165	MW2050		-3.4
	MW_RS12095	MW2228		-3.4
	MW_RS12410	MW2290	<i>paiA</i>	-2.0
	MW_RS12525	MW2313	<i>nreC</i>	176.0
	MW_RS12550	MW2318	<i>narH</i>	5.4
	MW_RS12555	MW2319	<i>narG</i>	45.5
	MW_RS12565	MW2321	<i>nasE</i>	29.2
	MW_RS12570	MW2322	<i>nasD</i>	81.2
	MW_RS12610	MW2330		2.6
	MW_RS12845	MW2368		-2.9
	MW_RS13535	MW2497		3.0
<i>braR*</i>	MW_RS00445	MW0085	<i>sarS</i>	4.7
	MW_RS01705	MW0324		6.0
	MW_RS01825	MW0346		11.9
	MW_RS02005	MW0381		-3.0
	MW_RS02255	MW0426	<i>gltB</i>	-2.7
	MW_RS02640	MW0477	<i>ctsR</i>	4.0
	MW_RS02650	MW0479	<i>mcsB</i>	2.5
	MW_RS02765	MW0501	<i>rpsG</i>	9.4
	MW_RS04410	MW0814	<i>dltA</i>	2.5
	MW_RS04425	MW0817	<i>dltD</i>	2.5
	MW_RS04545	MW0841	<i>glpQ</i>	6.1
	MW_RS04620	MW0857	<i>clpB</i>	2.2
	MW_RS04650	MW0863		-8.2
	MW_RS05110	MW0951	<i>purQ</i>	-2.9
	MW_RS05115	MW0952	<i>purL</i>	-2.3
	MW_RS05635	MW1046		-2.4
	MW_RS06700	MW1247	<i>mprF</i>	4.2
	MW_RS14205	MW2620	<i>vraD</i>	828.9
	MW_RS14210	MW2621	<i>vraE</i>	111.7

Tabla 8. Análisis de enriquecimiento de Gene Ontoly

El análisis de enriquecimiento de Gene Ontoly se realizó usando PantherDB para identificar las proteínas y rutas enriquecidas en los regulones de genes obtenidos para cada RR*. Se realizó un test de exacta de Fisher y los grupos de genes que presentaron una significancia estadística ($p < 0.05$) después de aplicar la corrección de tasa de falso descubrimiento se muestran en los grupos jerárquicos de niveles superior.

Up-regulated genes ^a			
WalR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	translation	13.24	2.17E-39
>4-fold	defence response to bacterium	51.59	5.04E-02
	cell wall organization	12.00	1.62E-02
	GO molecular function complete		
	structural constituent of ribosome	21.65	4.71E-43
	rRNA binding	18.56	5.67E-26
>2-fold	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity	12.74	1.69E-02
	translation factor activity, RNA binding	10.42	2.95E-02
	tRNA binding	8.03	9.69E-03
>4-fold	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity	57.32	6.15E-05
	GO cellular component complete		
>2-fold	small ribosomal subunit	22.93	4.61E-06
	large ribosomal subunit	22.93	7.13E-07
	PANTHER Protein Class		
	ribosomal protein	20.96	5.60E-26
	RNA binding protein	12.45	1.39E-25
>2-fold	nucleic acid binding	7.04	3.54E-19
	translation elongation factor	10.19	3.26E-02
	translation factor	7.17	3.67E-02
	translation initiation factor	9.17	3.68E-02
LytR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	programmed cell death	> 100	1.13E-02
GraR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	lipoteichoic acid biosynthetic process	> 100	1.99E-04
SaeR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	hemolysis in other organism	25.4	7.06E-03
	pathogenesis	10.26	2.62E-12
	GO molecular function complete		
>4-fold	toxin activity	34.39	2.22E-02
	GO cellular component complete		
>2-fold	extracellular region	12.7	3.34E-1
ArIR*	GO cellular component complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	integral component of membrane	2.44	1.80E-01
SrrA*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	ATP synthesis coupled proton transport	22.05	3.83E-05
	protoporphyrinogen IX biosynthetic process	13.78	3.89E-03
	arginine biosynthetic process	10.02	1.01E-02
	anion transport	4.1	2.87E-02
	oxidation-reduction process	2.93	1.45E-04
>4-fold	electron transport chain	14.33	4.23E-02
	GO molecular function complete		
>2-fold	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	22.05	3.78E-05
	oxidoreductase activity	3.03	1.41E-04
>4-fold	cytochrome-c oxidase activity	51.59	4.86E-02
	oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	51.59	3.64E-02

SrrA*	GO cellular component complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	22.05	1.32E-02
	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	22.05	4.44E-04
	plasma membrane	1.84	3.25E-02
	integral component of membrane	1.51	1.87E-02
>4-fold	respirasome	51.59	6.14E-02
	integral component of membrane	1.8	5.35E-02
SrrA*	PANTHER Pathways	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	ATP synthesis	22.05	3.19E-02
	Heme biosynthesis	11.03	4.74E-03
PhoP*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	phosphate ion transport	11.36	7.34E-03
	translation	6.56	9.41E-19
>4-fold	phosphate ion transport	41.97	6.01E-05
	organic phosphonate transport	>100	4.65E-04
>100-fold	phosphate ion transmembrane transport	>100	2.25E-02
	GO molecular function complete		
>2-fold	structural constituent of ribosome	10.55	1.34E-22
	rRNA binding	10.41	4.79E-17
>100-fold	organic phosphonate transmembrane transporter activity	> 100	2.06E-03
	inorganic phosphate transmembrane transporter activity	> 100	1.80E-03
	GO cellular component complete		
>2-fold	small ribosomal subunit	13.25	1.55E-04
	large ribosomal subunit	13.25	4.01E-05
>100-fold	integral component of plasma membrane	12.38	5.35E-02
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	ribosomal protein	10.6	6.92E-15
KdpE*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>100-fold	potassium ion transport	> 100	4.66E-04
	GO molecular function complete		
>10-fold	potassium transmembrane transporter activity, phosphorylative mechanism	83.34	2.51E-02
>100-fold	potassium ion transport	> 100	4.66E-04
	GO cellular component complete		
>100-fold	integral component of plasma membrane	34.67	6.67E-03
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	oxidoreductase	2.74	7.39E-04
>10-fold	epimerase/racemase	14.82	2.02E-02
HssR*	PANTHER Protein Class	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	dehydrogenase	3.4	2.36E-02
NreC*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	secondary alcohol metabolic process	14.43	4.15E-02
	oxidation-reduction process	2.68	1.28E-02
>4-fold	nitrate metabolic process	57.78	7.77E-03
	oxidation-reduction process	3.83	1.45E-02
NreC*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>20-fold	nitrate assimilation	> 100	3.69E-02
	oxidation-reduction process	8.6	2.28E-03
	GO molecular function complete		
>2-fold	oxidoreductase activity	2.89	2.74E-03
>4-fold	nitrate reductase activity	57.78	3.47E-02
>20-fold	nitrite reductase [NAD(P)H] activity	> 100	2.18E-02
	nitrate reductase activity	> 100	6.26E-04
	GO molecular function complete		
>20-fold	iron-sulfur cluster binding	22.57	4.78E-02
	GO cellular component complete		
>4-fold	nitrate reductase complex	57.78	1.06E-02
>20-fold	nitrate reductase complex	> 100	1.27E-04
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	reductase	3.96	1.58E-02
	dehydrogenase	3.8	6.89E-04
>4-fold	dehydrogenase	4.76	4.09E-02
	dehydrogenase	11.33	1.19E-02

BraR*	GO cellular component complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	integral component of membrane	1.87	2.68E-04
Down-regulated genes^b			
WalR*	GO molecular function complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	nickel cation binding	47.52	3.91E-04
SaeR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	de novo IMP biosynthetic process	82.76	7.80E-14
	purine nucleobase biosynthetic process	60.19	3.73E-02
	amino acid transmembrane transport	18.06	3.27E-02
	GO molecular function complete		
>2-fold	phosphoribosylformylglycinamide synthase activity	90.28	9.07E-03
	ATP binding	3.62	3.64E-02
	PANTHER Pathways		
>2-fold	<i>de novo</i> purine biosynthesis	38.01	1.03E-08
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	ligase	9.5	2.43E-03
	ATP-binding cassette (ABC) transporter	6.94	2.19E-02
TCS7R*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	de novo IMP biosynthetic process	>100	3.51E-03
ArlR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	urea catabolic process	50.68	1.48E-02
	de novo IMP biosynthetic process	25.34	9.80E-04
	peptide transport	10.14	1.67E-02
>4-fold	urea catabolic process	>100	1.73E-03
	GO molecular function complete		
>2-fold	urease activity	50.68	5.12E-02
	phosphoribosylformylglycinamide synthase activity	50.68	3.84E-02
	nickel cation binding	38.01	1.25E-04
>4-fold	urease activity	>100	1.92E-03
	nickel cation binding	84.97	4.49E-04
SrrA*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	iron import into cell	28.6	1.88E-02
	diaminopimelate biosynthetic process	28.6	3.04E-03
	threonine biosynthetic process	23.84	9.48E-04
	methionine biosynthetic process	23.84	9.13E-04
	cofactor catabolic process	22.88	4.64E-03
	lysine biosynthetic process via diaminopimelate	20.43	1.21E-03
	glycine decarboxylation via glycine cleavage system	17.16	4.10E-02
	de novo IMP biosynthetic process	16.69	1.29E-04
SrrA*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	cellular aldehyde metabolic process	14.3	5.20E-02
	carboxylic acid transmembrane transport	7.53	2.53E-02
	glutamine family amino acid metabolic process	5.27	1.84E-02
	oxidation-reduction process	3.5	1.75E-05
	nitrogen compound transport	3.48	3.86E-02
>4-fold	nitrogen compound transport	14.64	3.65E-03
	organic substance transport	9.85	6.47E-03
	GO molecular function complete		
>2-fold	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	15.89	1.21E-02
	heme binding	12.26	9.83E-03
	GO cellular component complete		
>2-fold	plasma membrane	2.19	3.75E-02
>4-fold	plasma membrane	4.39	3.12E-02
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	Threonine biosynthesis	23.84	1.03E-03
>4-fold	transporter	4.01	2.55E-06
	ATP-binding cassette (ABC) transporter	13.89	1.31E-03
PhoP*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	diaminopimelate biosynthetic process	20.49	7.38E-03
	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	18.78	1.98E-06
>4-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	52.34	9.38E-11
	sulfur amino acid metabolic process	16.75	7.14E-03

PhoP*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>4-fold	alpha-amino acid biosynthetic process	5.46	3.24E-02
	transmembrane transport	2.91	3.65E-02
	GO molecular function complete		
>2-fold	catalytic activity	1.47	4.73E-02
>4-fold	phosphoribosylformylglycinamide synthase activity	62.8	4.06E-02
	PANTHER Pathways		
>2-fold	Threonine biosynthesis	13.66	1.67E-02
	<i>de novo</i> purine biosynthesis	8.63	6.23E-04
>4-fold	<i>de novo</i> purine biosynthesis	23.14	5.03E-06
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	ATP-binding cassette (ABC) transporter	4.1	1.57E-03
	hydrolase	2.13	4.95E-02
>4-fold	ATP-binding cassette (ABC) transporter	5.8	2.47E-02
	Lyase	5.46	2.49E-02
AirR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	29.48	3.95E-04
	nitrogen compound transport	5.58	2.91E-02
	GO cellular component complete		
>2-fold	cell wall	14.74	1.61E-02
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	transporter	3.95	1.03E-02
AgrA*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	30.09	6.34E-04
	GO molecular function complete		
>2-fold	phosphoribosylformylglycinamide synthase activity	72.23	1.78E-02
	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides	16.05	4.33E-03
KdpE*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	30.09	1.89E-09
	purine nucleobase metabolic process	22.57	3.59E-02
	riboflavin biosynthetic process	22.57	3.30E-02
	amino acid transmembrane transport	10.03	1.47E-02
	GO molecular function complete		
>2-fold	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides	8.92	5.72E-03
	PANTHER Pathways		
>2-fold	flavin biosynthesis	24.07	3.69E-03
	<i>de novo</i> purine biosynthesis	14.25	6.95E-06
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	transporter	3.12	4.54E-03
HssR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	19.42	5.58E-03
	PANTHER Protein Class		
>2-fold	transporter	3.41	2.28E-02
NreC*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	31.27	6.08E-08
	iron ion transport	17.05	2.27E-03
	PANTHER Pathways		
>2-fold	<i>de novo</i> purine biosynthesis	13.82	1.76E-04
BraR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	urea catabolic process	21.72	2.97E-02
	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	19.91	7.71E-08
	riboflavin biosynthetic process	16.29	4.33E-02
	ATP synthesis coupled proton transport	10.86	2.72E-02
	aspartate family amino acid biosynthetic process	7.76	2.24E-02
	translation	3.81	1.73E-04
	nitrogen compound transport	3.52	6.84E-03
	organic substance transport	2.57	4.43E-02

BraR*	GO biological process complete	Fold Enrichment	FDR
>4-fold	<i>de novo</i> IMP biosynthetic process	> 100	2.28E-14
	heme transport	> 100	6.74E-03
	glutamine metabolic process	37.52	4.94E-02
BraR*	GO molecular function complete	Fold Enrichment	FDR
>2-fold	rRNA binding	7.24	1.20E-05
	structural constituent of ribosome	6.03	2.22E-05
	ATP binding	2.3	2.29E-03
	metal ion binding	2.03	3.79E-02
	hydrolase activity	1.86	3.68E-02
>4-fold	phosphoribosylformylglycinamide synthase activity	> 100	6.88E-04
GO cellular component complete			
>2-fold	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	13.03	2.93E-02
	ribosomal subunit	7.24	1.37E-02
PANTHER Pathways			
>2-fold	Flavin biosynthesis	17.38	8.37E-03
	<i>de novo</i> purine biosynthesis	10.29	1.06E-04
>4-fold	<i>de novo</i> purine biosynthesis	65.17	4.06E-08
PANTHER Protein Class			
>2-fold	ribosomal protein	8.07	1.76E-06
	transporter	2.52	1.07E-02
>4-fold	ligase	18.1	6.85E-04

^aNo se encontraron categorías de GO enriquecidas entre los genes activados por : HptR*, TCS7R*, AirR*, VraR* and AgrA*

^bNo se encontraron categorías de GO enriquecidas entre los genes inhibidos por: HptR*, LytR* GraR* and VraR*