



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

SCUOLA DI SCIENZE  
MATEMATICHE, FISICHE E  
NATURALI

Corso di laurea in Biologia (CLASSE LM-6)

**Predizione dell'effetto di delezioni  
geniche sulla produzione di  
esopolisaccaridi in *Pseudomonas  
aeruginosa***

**Predicting the effect of genetic  
deletions on exopolysaccharide  
production in *Pseudomonas aeruginosa***

**Relatore:**

Dott. Marco Fondi

**Co-relatore:**

Prof. Francesco Imperi

**Candidato:**

Marco De Luca

Anno accademico: 2017/2018



<b>1. Introduzione</b>	4
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2 Biofilm	4
1.2.1 Alginato, PEL e PSL	7
1.3 Genome-scale metabolic models (GEMs)	10
1.4 Flux balance analysis (FBA)	12
1.5 Flux variability analysis (FVA)	14
<b>2. Scopo del lavoro</b>	16
<b>3. Materiali e metodi</b>	17
3.1 Principali software e tool utilizzati	17
3.1.1 MATLAB	17
3.1.2 COBRA toolbox	17
3.1.3 Tn-core	18
3.1.4 TIGER toolbox	18
3.1.5 MADE	19
3.1.6 KEGG	20
3.1.7 ModelSEED	20
3.2 Scelta del modello	20
3.3 Dati sperimentali	21
<b>4. Risultati e discussione</b>	22
4.1 Inclusione dei pathways biosintetici di PEL e PSL nel modello	22
4.2 Formulazione della funzione obiettivo (Objective Function)	27
4.3 Formulazione dei media di crescita in silico	28
4.4 Realizzazione dei mutanti	31
4.5 Integrazione dei dati di espressione e analisi dei ceppi mutanti	32
4.5.1 Utilizzando Tn-core	32
4.5.2 Utilizzando MADE	37
4.5.3 Confronto tra le reazioni predette con Tn-core e MADE	42
<b>5. Conclusioni</b>	46
<b>6. Prospettive future</b>	49
Biografia	50
Materiali supplementari	54

## 1. Introduzione

### 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

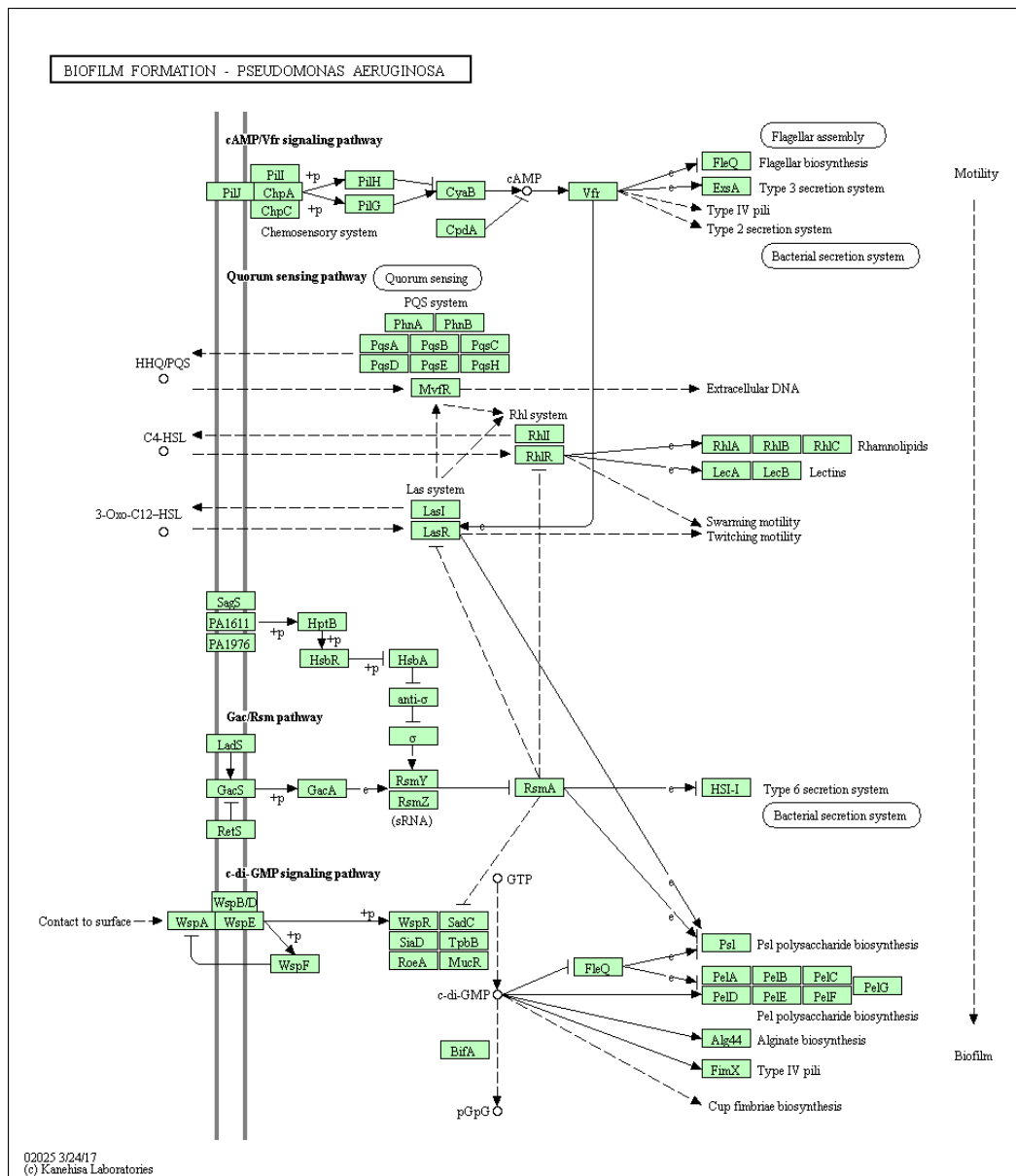
I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono bacilli asporigeni, negativi alla colorazione di Gram, con morfologia a bastoncello, di lunghezza variabile da 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  e larghezza compresa tra 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$ , genericamente appaiati o singoli. Per quanto concerne la diffusione, *P. aeruginosa*, è dotata di spiccata ubiquitarietà grazie ad un elevato grado di versatilità che va a sommarsi ad esigue esigenze nutrizionali<sup>[7]</sup>. Può essere ritrovata sia in forma planctonica, come singole cellule mobili, grazie alla presenza di flagelli polari, che in forma aggregata ad alcune superfici o substrati<sup>[10]</sup>. Il microrganismo popola così nicchie ecologiche naturali come suolo e acqua, viene ritrovato come contaminante di alimenti ed è spesso ritrovato negli ambienti ospedalieri<sup>[7]</sup>. Ceppi di *P. aeruginosa* sono patogeni opportunisti per piante, animali e per l'uomo: in quest'ultimo è imputabile di infezioni sia acute che croniche a livello polmonare soprattutto negli individui debilitati affetti da fibrosi cistica (CF)<sup>[4]</sup>, a livello cutaneo in individui con ferite da ustione e a livello sistemico in individui immunocompromessi<sup>[5]</sup>. Sono inoltre in grado di produrre una lunga lista di fattori di virulenza e sviluppare resistenza nei confronti di molti antibiotici e trattamenti disinfettanti grazie alla capacità di alcuni ceppi di costituire biofilm o produrre uno spesso strato di esopolisaccaride (EPS) mucoide come protezione<sup>[3;4]</sup>.

### 1.2 Biofilm

I biofilm sono comunità di microrganismi che si sostentano a vicenda e coabitano in una matrice di biopolimeri (DNA, proteine, polisaccaridi, ecc.) che loro stessi producono e riversano nell'ambiente circostante. Questa convivenza conferisce

molteplici vantaggi ai microrganismi che ne prendono parte tra cui la potenzialità di sopravvivere a circostanze altrimenti non compatibili con la vita, di scambiarsi nutrienti e adattarsi a cambiamenti inattesi del microhabitat. In queste circostanze i microrganismi sono meno suscettibili alle risposte infiammatoria e immunitaria scatenate dall'ospite e più resistenti a trattamenti antibiotici e chemioterapici <sup>[1,3]</sup>. Di conseguenza i microrganismi dotati di questa capacità risultano più difficili da eradicare. *P. aeruginosa* è spesso causa di infezioni multiresistenti (MDR) in pazienti immunocompromessi e/o ospedalizzati<sup>[5]</sup>. Nel caso specifico di *P. aeruginosa* il biofilm è composto principalmente da polisaccaridi secreti all'esterno della cellula (EPS) <sup>[14]</sup> e la capacità di produrre ciascuno di questi varia da ceppo a ceppo e in base alle condizioni dell'habitat (figura 1) <sup>[2]</sup>.

I tre esopolisaccaridi principalmente prodotti da *P. aeruginosa* sono: alginato, PSL (*Polysaccharide Synthesis Locus*) e PEL (*PELLicle polysaccharides*)<sup>[4]</sup>. Grazie alla distinta capacità di produrre diversi EPS è possibile fare una divisione tra ceppi che producono principalmente alginato (mucoidi) e ceppi che producono PEL e/o PSL (non mucoidi). I ceppi non mucoidi maggiormente studiati sono PAO1 e PA14 <sup>[3]</sup>. Ciascun tipo di EPS conferisce peculiari proprietà chimico-fisiche alla cellula e alla matrice del biofilm<sup>[9]</sup>. In genere gli individui appartenenti a differenti ceppi ne producono solo un particolare tipo a seconda del contesto in cui si trovano<sup>[4]</sup>. Tuttavia, i ceppi che sono stati sequenziati hanno la capacità, in termini genetici, di produrre tutti i tipi di EPS e quindi di passare da un fenotipo all'altro all'occorrenza<sup>[5]</sup>.



**Figura 1.** Rappresentazione schematica delle vie metaboliche coinvolte in *Pseudomonas aeruginosa* nella formazione di biofilm.

Ad esempio, ceppi isolati da individui affetti da CF sono caratterizzati da un profilo di overproduzione di alginato o di PEL e PSL contemporaneamente mentre ceppi ambientali ne secernono principalmente solo uno come componente predominante del biofilm [4]. Grazie alla sua possibilità di adattamento e resistenza dovuta anche alla caratteristica di produrre biofilm [5;9], *P. aeruginosa*, negli ultimi

decenni è tornata al centro di molti studi<sup>[10]</sup> e ricerche come organismo modello<sup>[14]</sup> per lo studio della patogenicità e dello sviluppo di biofilm<sup>[6]</sup>. Ceppo di riferimento per gli studi su *P. aeruginosa* è il PAO1<sup>[7]</sup> il cui genoma è stato completamente sequenziato nel 2000<sup>[8]</sup>.

### 1.2.1 Alginato, PEL e PSL

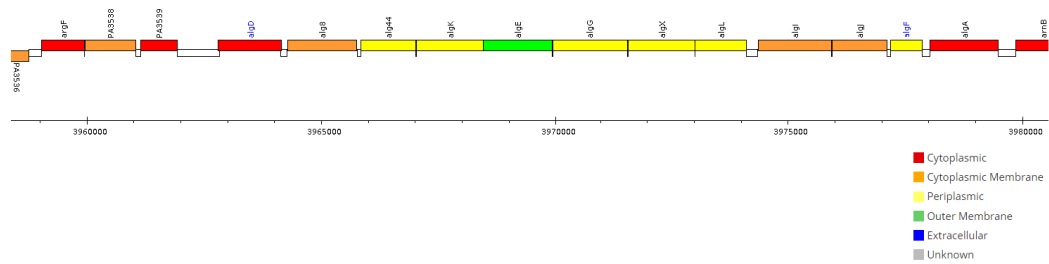
Alginato, PEL e PSL conferiscono proprietà coesive ed adesive che permettono alle cellule di formare pellicole, microcolonie e/o biofilm e di resistere a cambiamenti delle condizioni dell'habitat in cui si trovano, a situazioni di stress, a risposte difensive e a farmaci in modo migliore rispetto alla stessa cellula planctonica<sup>[4,9]</sup>. Questa resistenza è dovuta al mantenimento nel proprio corredo genico delle vie di sintesi ed esporto anche degli EPS che normalmente non produce. Attraverso il fenomeno dello *switch*-fenotipico si adatta quindi a diversi cambiamenti e situazioni iniziando a produrre sostanze fino a quel momento non necessarie e rendendo ancora più complesse e meno efficaci eventuali terapie farmacologiche<sup>[5]</sup>.

Tutto ciò porta ad un doveroso approfondimento di queste vie e delle metodiche che le regolano.

- **Alginato**

L'Alginato è un polisaccaride acido ad alto peso molecolare<sup>[14]</sup> composto da subunità non ripetute di O-acetylated D-mannuronic acid e dal suo epimero C5' L-guluronic acid<sup>[4]</sup>.

L'operone *alginato* è formato da 12 geni (da PA3540 a PA3551) nel genoma del ceppo PAO1 (figura 2). Nei ceppi mucoidi l'alginato viene secreto nel mezzo circostante e non è legato in modo covalente alla superficie cellulare<sup>[4]</sup> mentre nel ceppo PAO1 è praticamente non espresso.



**Figura 2.** Rappresentazione schematica dei geni formanti l'operone *alginate* con posizione nel genoma e distretto di localizzazione del prodotto di ciascun gene.

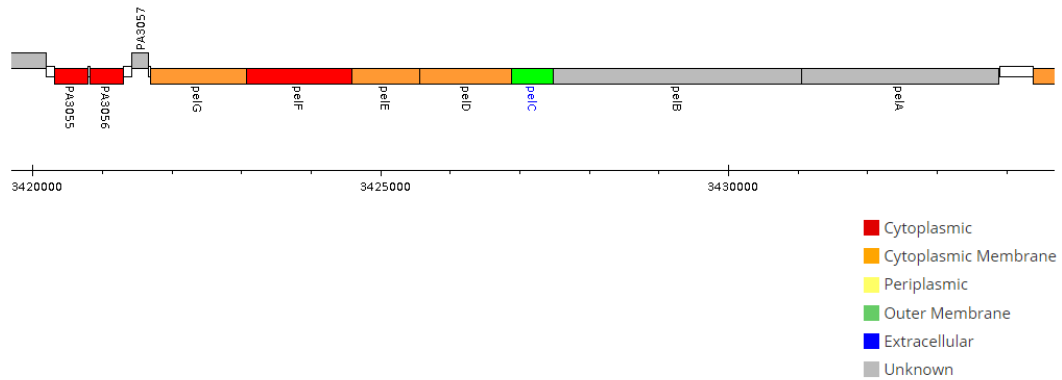
- **PEL**

L'operone *pel* è largamente diffuso tra i *proteobacteria* e in *P. aeruginosa* ceppo PAO1 è composto da 7 geni (da PA3058 a PA3064)<sup>[4]</sup> (figura 3).

Il polimero PEL è importante per la componente strutturale del biofilm: necessario per lo stabilirsi di interazioni di tipo cellula-cellula e cellula-matrice come ad esempio con eDNA<sup>[9]</sup>.

A livello strutturale è ricco in *N*-acetilglucosammina (GlcNAc) and *N*-acetilgalattosammina (GalNAc)<sup>[9]</sup>. Studi recenti sostengono l'esistenza di due tipi di PEL ad alto (>80kDa) e a basso (0,5kDa) peso molecolare: quello a basso peso (LWPEL) viene secreto all'esterno e partecipa alla formazione del biofilm mentre quello ad alto peso (HWPEL) sembra svolgere un ruolo intracellulare. La produzione di PEL gioca inoltre un ruolo centrale nella tolleranza da parte di *P. aeruginosa* nei confronti di antibiotici aminoglicosidici<sup>[9]</sup>.

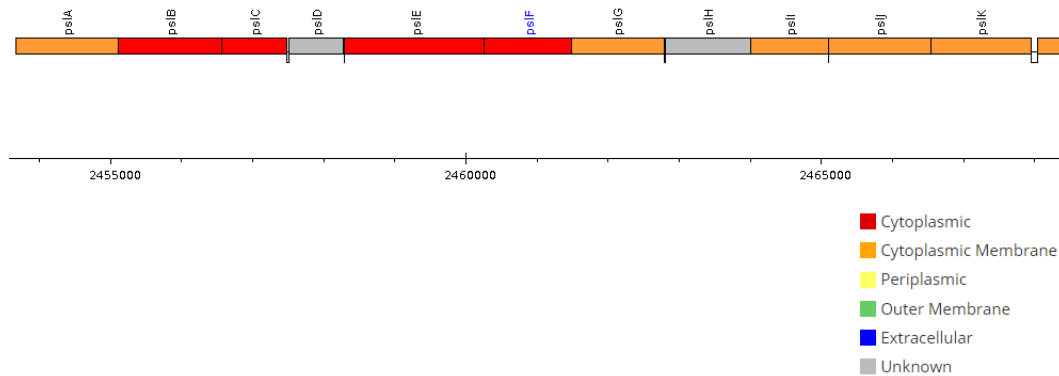




**Figura 3.** Rappresentazione schematica dei geni formanti l'operone *pel* con posizione nel genoma e distretto di localizzazione del prodotto di ciascun gene.

- **PSL**

L'operone *psl* è largamente diffuso tra i diversi ceppi di *P. aeruginosa* ed è composto, nel ceppo PAO1, da 12 geni (da PA2231 a PA2242)<sup>[4]</sup> (figura 4). Il polimero PSL è composto da subunità pentameriche ripetute contenenti D-mannosio, L-ramnosio e D-glucosio con rapporto 3:1:1. A livello strutturale e tridimensionale, PSL, forma una distribuzione elicoidale che ricopre la superficie della cellula di *P. aeruginosa* importante per il processo di formazione del biofilm. Anche questa componente è necessaria per lo stabilirsi di interazioni di tipo cellula-cellula e cellula-matrice<sup>[9]</sup>.

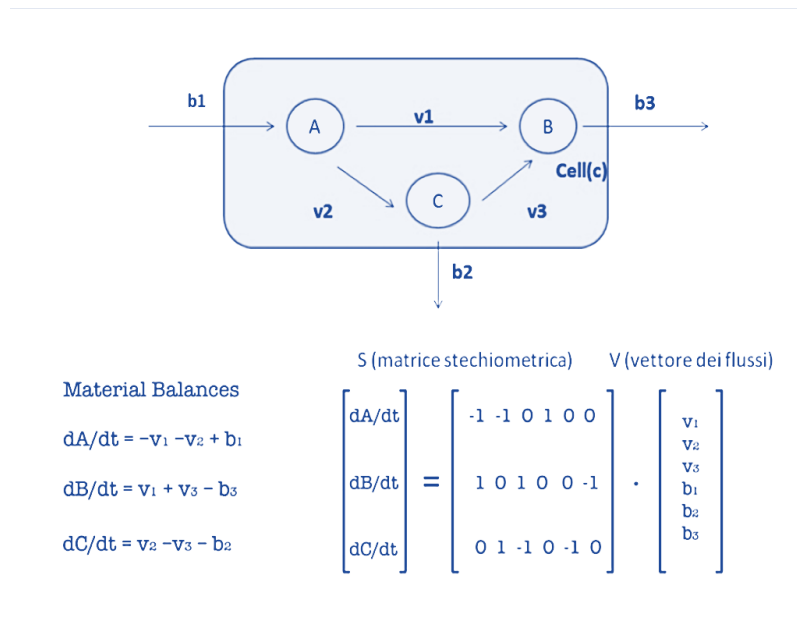


**Figura 4.** Rappresentazione schematica dei geni formanti l'operone *psl* con posizione nel genoma e distretto di localizzazione del prodotto di ciascun gene.

### 1.3 Genome-scale metabolic models (GEMs)

Con la progressione delle discipline di carattere -omico e con la concomitante disponibilità di una gran mole di dati da queste generate, nell'ultimo decennio, una parte della ricerca si è incentrata sullo sviluppo di metodi per simulare e studiare il metabolismo di un organismo *in silico*<sup>[25]</sup>. Questi metodi permettono di utilizzare *dataset* molto ampi (*genome-scale*) e di effettuare numerosi test e simulazioni<sup>[28]</sup>. La tempistica abbastanza contenuta richiesta da questi metodi li rende complementari e di supporto alla parte sperimentale *in vivo*. Tutto ciò permette di sfruttare i dati e le previsioni ottenute per guidare la parte in laboratorio consentendo così di focalizzarsi su particolari aspetti metabolici diminuendo i costi e i tempi di esecuzione degli esperimenti. Sono state, quindi, sviluppate delle tecniche bioinformatiche che permettono la simulazione della crescita di un organismo e la predizione del suo fenotipo sulla base della sua ricostruzione metabolica, ovvero della lista delle reazioni ipoteticamente codificate dal genoma dell'organismo. Il punto di partenza per poter rappresentare un modello metabolico *in silico* è l'individuazione nel genoma

annotato di un organismo dei geni metabolici. Successivamente è necessario ottenere una rappresentazione delle interazioni metaboliche per mezzo di un grafo bipartito, provvisto di due tipi di nodi, in cui uno corrisponde ai metaboliti e l'altro agli enzimi che intervengono. Questo tipo di grafo prende il nome di network metabolico che non è altro che la rappresentazione statica di tutte le reazioni che avvengono all'interno della cellula e che ne compongono il metabolismo. Il network metabolico, benché includa tutte le vie metaboliche proprie della cellula, non permette di studiare le modificazioni metaboliche in modo dinamico e/o quantitativo. Per farlo il modello viene convertito in una sua rappresentazione matematica: le reazioni metaboliche, componenti un network, vengono rappresentate attraverso una matrice. Tale matrice è composta da  $m$  righe, ciascuna delle quali rappresenta un unico composto, e  $n$  colonne, ciascuna delle quali rappresenta una reazione. I valori inseriti in ogni colonna rappresentano i coefficienti stechiometrici dei metaboliti che prendono parte ad una reazione: valori negativi indicano che il metabolita viene consumato, valori positivi indicano che un metabolita viene prodotto e gli zeri indicano che un particolare metabolita non partecipa ad una determinata reazione. Questa matrice di dimensioni  $m \times n$  è chiamata matrice stechiometrica (**S**) e può essere definita anche con un sistema di equazioni lineari risolvibili con l'impiego di programmi specifici, chiamati *solvers*, che utilizzano un approccio di *linear programming* (figura 5).



**Figura 5.** Rappresentazione schematica di un modello metabolico costituito da 3 metaboliti (A,B,C) e 6 reazioni con sotto le equazioni di bilanciamento della massa descritte dalla matrice stechiometrica e dal vettore dei flussi dei tre nodi.

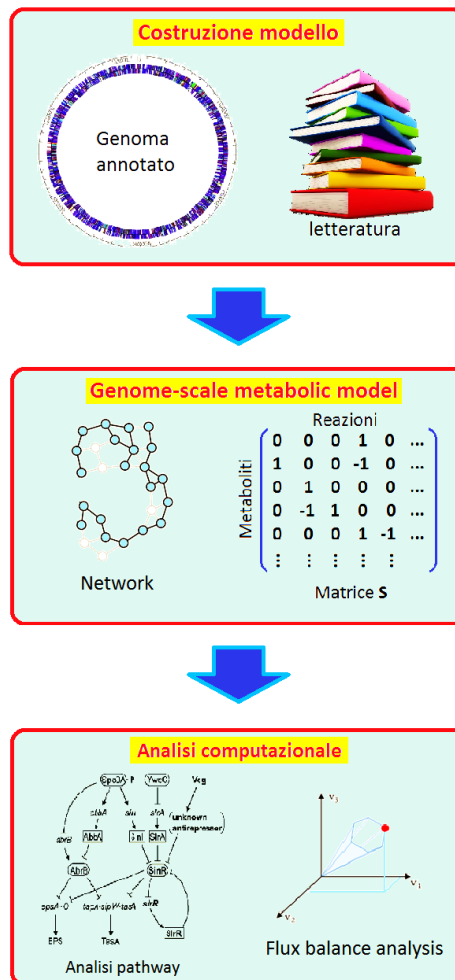
Ottenuta la rappresentazione matematica del modello metabolico, è possibile utilizzare dei *constraints-based tools* che consentono di darne sia una descrizione statica che una quantitativa, senza dover ricorrere a parametri cinetici. Fra questi, uno dei più utilizzati è la *Flux Balance Analysis (FBA)*<sup>[20]</sup>, che consente di imporre dei vincoli alle reazioni così da ottenere una distribuzione di flussi che simuli verosimilmente quello che avviene nella realtà all'interno del metabolismo di una cellula.

#### 1.4 Flux balance analysis (FBA)

La *Flux balance analysis (FBA)* è uno strumento che sfrutta un approccio di tipo matematico e computazionale per analizzare e fare delle simulazioni all'interno di network metabolici, come ad esempio nei GEMs<sup>[20]</sup>. Quello che l'FBA va a calcolare è il flusso di metaboliti attraverso le reazioni contenute nel modello rendendo così possibile predire il tasso di crescita di un organismo oppure i tassi di produzione

e/o consumo di un particolare metabolita di interesse. Con l’FBA è possibile scegliere e impostare dei vincoli (*constraints*) così da definire lo spazio delle distribuzioni dei flussi ammissibili per un sistema, ovvero le velocità con cui ogni metabolita viene consumato o prodotto da ciascuna reazione. Questo approccio permette di poter analizzare il fenotipo e la capacità adattativa di un organismo in determinati scenari simulati sia ambientali che genetici.

Tra i *constraints* utilizzabili, quelli basilari sono: una funzione obiettivo (*objective function*, OF), dei valori limite inferiori (*lower bounds*, lb) e superiori (*upper bounds*, ub) che definiscono i flussi metabolici minimi e massimi ammissibili nelle varie reazioni che compongono il network e l’assunzione di uno stato stazionario per il sistema (*steady state*) in cui la quantità totale dei metaboliti prodotti è uguale alla quantità totale di quelli consumati. Lo *steady state* biologicamente rappresenta lo stato di crescita esponenziale di una cellula. Questo approccio permette di ottenere risultati dalle analisi in tempi brevi, secondi o frazioni di secondo, utilizzando comuni computer senza necessità particolari di potenza di calcolo, anche nel caso in cui vengano utilizzati network molto grandi con migliaia di reazioni all’interno. Dal punto di vista matematico il flusso attraverso tutte le reazioni che compongono la matrice **S** è rappresentato dal vettore **v** che ha lunghezza *n*. La concentrazione di tutti i metaboliti è invece rappresentata dal vettore **x** avente lunghezza *m*. Allo *steady state* ( $dx/dt=0$ ) il sistema di equazioni che bilanciano la massa è dato da  $Sv = 0$ . Ciascun **v** che soddisfa questa equazione si trova nello spazio nullo di **S**. In qualsiasi GEMs realistico ci saranno più reazioni che metaboliti ( $n > m$ ): questo comporta che ci siano più variabili ignote che equazioni e per questo che non ci sia una unica soluzione a questo sistema di equazioni<sup>[20]</sup>. I *constraints* utilizzati vanno così a definire un *range* di soluzioni possibili, una delle quali costituirà l’*output* dell’FBA (figura 6).

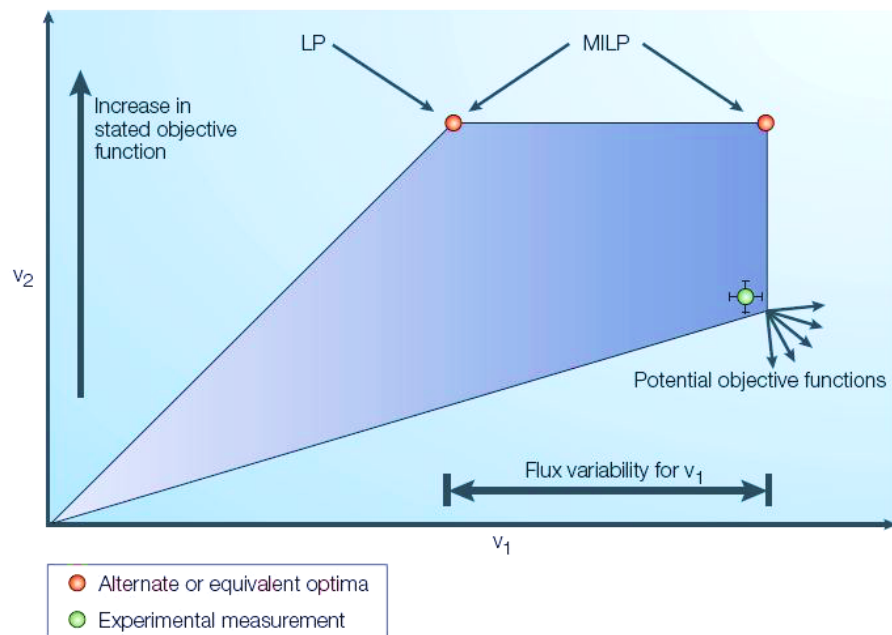


**Figura 6.** Rappresentazione schematica riassuntiva delle varie fasi e delle componenti necessarie a partire dalla costruzione di un modello fino alla sua analisi.

### 1.5 Flux variability analysis (FVA)

Le distribuzioni di flusso calcolate per mezzo della FBA spesso sono soluzioni non uniche. In molte situazioni, è necessario per un sistema biologico poter raggiungere lo stesso obiettivo, per esempio la crescita cellulare, percorrendo però vie metaboliche alternative ma equivalenti. In questo modo si vanno a creare

soluzioni ottimali alternative fenotipicamente diverse, fenotipi silenti. Questo è ancora più frequente in microrganismi complessi con network metabolici molto grandi e tutto ciò si riflette anche nei corrispettivi modelli *in silico*. Per questo motivo molto spesso è utile ricorrere ad un altro strumento la *Flux variability analysis (FVA)*<sup>[34]</sup>. La FVA sfrutta a livello computazione come *solver* i *Mixed Integer Linear Programming (MILP)* per calcolare il flusso massimo e minimo possibile attraverso ciascuna reazione per un determinato valore obiettivo massimo. Quello che accade nella pratica è che tutte le reazioni in esame vengono subordinate al raggiungimento dello stesso valore della funzione obiettivo e viene variato il flusso all'interno di queste con lo scopo di determinare i valori massimi e minimi che permettano comunque di raggiungere l'ottimizzazione. L'impiego dell'FVA consente di stimare il flusso minimo e il flusso massimo ammissibile attraverso ciascuna reazione, impiegando gli stessi *constraints* utilizzati nell'FBA, quindi in quanto tale è possibile utilizzarla per stimare la correttezza e l'accuratezza delle previsioni ottenute tramite FBA (figura 7).



**Figura 7.** Rappresentazione grafica dello spazio delle soluzioni ammissibili con FVA

## 2. Scopo del lavoro

Lo scopo principale di questo lavoro è identificare, mediante un approccio computazionale (*systems biology*), le ripercussioni a livello metabolico di cambiamenti nell'espressione genica di ceppi di *P. aeruginosa* PAO1 wildtype e mutanti nei geni degli operoni *pel* (PA3064, PA3063, PA3062, PA3061, PA3060, PA3059, PA3058) e *psl* (PA2242, PA2241, PA2240, PA2239, PA2238, PA2237, PA2236, PA2235, PA2234, PA2233, PA2232, PA2231) ciascuno cresciuto in due condizioni differenti, terreno semisolido (condizione "aggregata") e liquido (condizione "planctonica").

Poiché esistono metodi tecnicamente e concettualmente diversi per integrare dati di espressione genica con modelli metabolici *genome-scale* (metodi assoluti vs. metodi relativi, vedi Materiali e metodi), questo lavoro si prefigge anche il compito di valutare le differenze nella scelta di un metodo di integrazione di dati di espressione piuttosto che un altro.



### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Principali software e tool utilizzati

##### 1) MATLAB (MATrix LABoratory)

È un ambiente sviluppato per il calcolo numerico e l'analisi statistica. Comprende un omonimo linguaggio di programmazione sviluppato da MathWorks. MATLAB permette di trattare matrici, visualizzare graficamente dati e funzioni, sviluppare algoritmi, creare interfacce utente, ed è in grado di interfacciarsi con programmi scritti in altri linguaggi (C, C++, Java, Fortran e Python).

##### 2) COBRA toolbox

È un pacchetto software in linguaggio MATLAB utilizzato per effettuare predizioni sul comportamento cellulare e multicellulare di tipo quantitativo in network biochimici sfruttando un approccio del tipo "*CO*nstraint-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis" (COBRA)<sup>[21]</sup>. L'approccio COBRA nei confronti della *system biology* nasce dall'accettazione del fatto che non possediamo dati sperimentali sufficientemente dettagliati per modellare con precisione, in senso biofisico, un organismo su scala biologica: vengono così definiti una serie di vincoli biofisici (suddivisione in compartimenti, conservazione della massa e direzionalità delle reazioni) con lo scopo di limitare il numero di stati in cui il sistema può trovarsi rendendolo così risolvibile da tecniche di calcolo come la FBA. Come risultato non avremo quindi una soluzione unica ma un insieme ridotto di soluzioni utilizzabili per la formulazione di ipotesi in campo biologico. Dal 2007, data in cui è stata sviluppata la prima versione da Bernhard Palsson e dal suo gruppo della UC San Diego<sup>[36]</sup>, grazie anche all'aumentata

disponibilità di dati di carattere -omico, questo pacchetto è largamente adottato per la modellazione, l'analisi e la predizione di fenotipi metabolici che utilizzano *network* biochimici su scala genomica.

### 3) Tn-Core

È un pacchetto sviluppato con lo scopo di assistere nell'interpretazione di dati Tn-seq e di trascrittomica (RNA-seq) utilizzando ricostruzioni di network metabolici e la modellazione metabolica *constraint-based*<sup>[29]</sup>. Tn-Core fornisce un *workflow user-friendly* per la generazione di modelli metabolici contesto-specifici attraverso l'integrazione di dati Tn-seq e facoltativamente anche di dati RNA-seq<sup>[19]</sup>. L'*output* restituito da Tn-Core dovrebbe aiutare i biologi che fanno esperimenti a sfruttare la modellazione metabolica per comprendere meglio i dati ottenuti di tipo Tn-seq, così come i biologi computazionali che desiderano integrare dati Tn-seq alle loro *pipeline* di modellazione metabolica e/o ad affinare ricostruzioni metaboliche su scala genomica. Tn-Core implementa GIMME<sup>[31]</sup> per l'integrazione di dati di espressione con un modello *genome-scale* ed è considerato un metodo continuo e assoluto. Continuo si riferisce al fatto che il flusso predetto in ogni singola reazione è stimato in relazione al livello di espressione del/i gene/i corrispondente/i. Assoluto si riferisce al fatto che non ha bisogno di dati di espressione differenziali (tra una condizione di controllo ed una "trattato") ma può svolgere l'integrazione utilizzando dati assoluti.

### 4) TIGER toolbox

TIGER (*Toolbox for Integrating Genome-scale metabolism, Expression, and Regulation*) è un pacchetto software in linguaggio MATLAB pubblicato per la prima volta da Jensen e Papin nel 2011<sup>[22]</sup>. TIGER consente di convertire

automaticamente una lista di correlazioni GPR (*Gene-Protein-Reaction*) e TRN (*Transcriptional-Regulatory-Network*), esplicite e/o implicite, in un set di disequazioni lineari che poi va ad integrare ad un modello COBRA generando come *output* un nuovo modello TIGER. Il modello risultante può essere poi utilizzato per mappare dati di tipo RNA-seq sfruttando script come MADE per generare modelli contesto-specifici<sup>[22]</sup>.

## 5) MADE

MADE (*Metabolic Adjustment by Differential Expression*) è uno script implementato in TIGER all'interno di MATLAB pubblicato nel 2011 da Jensen e Papin<sup>[32]</sup>. È considerato un metodo discreto e relativo per studiare i cambiamenti a livello metabolico considerando la transizione tra due o più stati<sup>[31]</sup>. Questo algoritmo si basa su tre asserzioni: l'organismo deve comunque crescere in ciascuna condizione, i geni up-regolati sono da considerarsi accesi mentre i geni down-regolati spenti, i geni accesi in una condizione sono spenti nell'altra, a meno che non siano geni essenziali. MADE come *output* fornisce la distribuzione dei flussi attraverso le reazioni della soluzione e lo stato in cui si trovano i geni (1 = acceso o 0 = spento) permettendo così di produrre dei modelli contesto-specifici ottenuti cancellando i geni spenti nelle diverse condizioni. MADE, quindi, integra i dati di espressione ad un modello metabolico senza dover determinare a priori una soglia di attività, in quanto analizza gli effetti della transizione tra due o più condizioni (temporali o ambientali) nel network metabolico in studio. Sfrutta un metodo basato sull'ottimizzazione per creare una serie di stati di espressione binari che riflettano, a livello statistico, i maggiori cambiamenti nelle misurazioni dell'espressione genica<sup>[31]</sup>. Lo stato dei geni risultante produce sempre modelli funzionanti e concordanti con i dati di espressione.

## 6) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

È un database, liberamente accessibile online, utilizzato per comprendere funzioni e utilità in sistemi biologici (cellula, organismo, ecosistema) partendo da informazioni di tipo molecolare come ad esempio grandi moli di dati provenienti dal sequenziamento di un genoma o da altre tecnologie sperimentali del tipo *high-throughput*<sup>[35]</sup>. Permette inoltre, grazie a sottosezioni, la visualizzazione grafica dei *pathways* e l'analisi delle reazioni che coinvolgono un qualsiasi composto chimico in esame, con la possibilità di confrontare una determinata via metabolica all'interno di organismi diversi.

## 7) ModelSEED

È una piattaforma web *open-source* liberamente accessibile per la ricostruzione, l'analisi, l'ottimizzazione e il confronto di modelli metabolici su scala genomica<sup>[27]</sup>. Sfrutta informazioni provenienti dall'annotazione funzionale di un genoma per creare una lista di reazioni metaboliche che può anche mappare, in modo del tutto automatico, su un *network*.

Fornisce anche un *database* omonimo, consultabile online, per risalire dal nome oppure dalla formula di un composto chimico al suo codice univoco in formato cpdNNNNN.

### 3.2 Scelta del modello

Per la scelta del modello di *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 di partenza è stata effettuata un'ampia ricerca in letteratura e in particolare sul portale dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Il modello scelto, in quanto più recente tra quelli resi disponibili, è quello aggiornato e curato da Jennifer A. Bartell et al. (2017), denominato iPae1146 e rilasciato come *supplementary* ad un loro articolo<sup>[10]</sup>.

Il modello iPae1146 contiene complessivamente 1148 geni, 1496 reazioni e 1284 metaboliti<sup>[10]</sup>.

Attraverso la piattaforma MATLAB è stata fatta una prima analisi del modello iPae1146 che è risultato sprovvisto dei *pathways* di produzione e esporto di PEL e PSL codificati dai geni *pel* e *psl*, rispettivamente.

### 3.3 Dati sperimentali

In questo studio sono stati utilizzati dati di espressione genica provenienti da *P. aeruginosa* PAO1 *wildtype* e mutante (*pel/psl*) coltivati in terreno TSBD<sup>[30]</sup> in due condizioni diverse, planctonica e semisolida, per comprendere, in ciascuno di questi ceppi, la distribuzione dei flussi e per analizzare come i cambiamenti nell'espressione genica possono influenzare l'intero network metabolico.

Il terreno TSB (Tryptic Soy Broth) è un terreno di crescita utilizzato per la coltura di un'ampia varietà di microrganismi; composto da caseina e farina di soia digerite enzimaticamente come fonte di azoto, destrosio come fonte di carbonio, cloruro di sodio per mantenere l'equilibrio osmotico e il fosfato dipotassico come agente tampone. Dal TSB attraverso l'impiego di una resina chelante i metalli a scambio ionico (*Chelex100*) viene ottenuto il TSBD (Tryptic Soy Broth Deferrizzato)<sup>[30]</sup>.

Nella parte sperimentale *in vivo* svolta dal gruppo di ricerca del Prof. Imperi presso l'Università degli Studi di Roma La Sapienza, infatti, *P. aeruginosa* PAO1 *wildtype* è stata fatta crescere in TSBD in due situazioni differenti: in una condizione planctonica con terreno liquido e in una condizione semisolida con la sola aggiunta di *agar agar* al terreno liquido. Le medesime due condizioni di coltura sono state adottate anche per il mutante di PAO1. Il ceppo mutante utilizzato è un ceppo

deleto del promotore, dei primi 3 geni e parte del quarto degli operoni *pel* (da PA3064 a PA3061) e *psl* (da PA2231 a PA2234).

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Inclusione dei *pathways* biosintetici di PEL e PSL nel modello

La prima parte del lavoro ha riguardato l'inclusione nel modello originale iPae1146 dei *pathways* biosintetici di PEL e PSL utilizzando, come fonte, database di tipo sia generico (SEED, BiGG, KEGG, ecc.)<sup>[27]</sup> sia specifici per il genere *Pseudomonas* (PseudoCyc)<sup>[33]</sup> per reperire le informazioni necessarie.

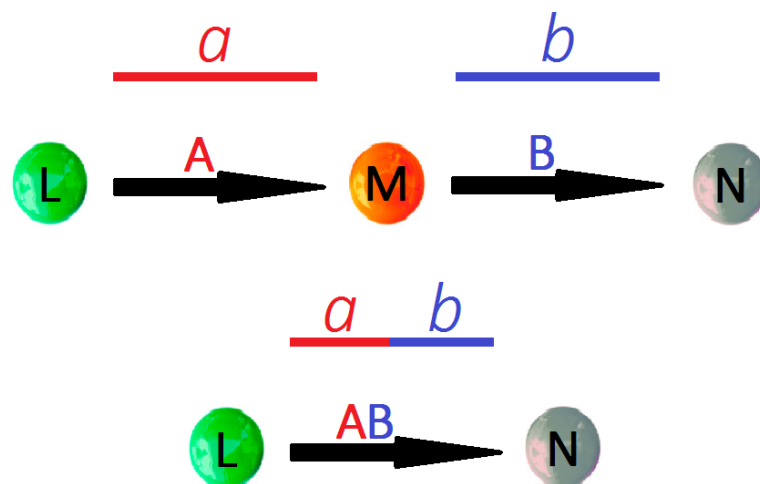
Le indicazioni riguardo alla composizione chimica e alla stechiometria delle reazioni responsabili della produzione di PEL e PSL sono state ricercate in specifici articoli in letteratura<sup>[10-13;15-17]</sup>.

In particolar modo in uno studio di Laura K. Jennings et al. (2017)<sup>[9]</sup> viene mostrato come PEL esista in due differenti forme: ad alto peso molecolare (HWPEL) e a basso peso molecolare (LWPEL). HWPEL ha un peso maggiore di 80kDa e non viene secreto all'esterno della cellula mentre LWPEL ha un peso di circa 0,5kDa e viene secreto all'esterno.

Nel solito lavoro, Jennings et al. (2017)<sup>[9]</sup>, hanno analizzato la struttura di PEL determinando che si tratti di un EPS lineare composto da residui acetilati di N-acetilgalattosamina (GalNAc) e di N-acetilglucosamina (GlcNAc), con un rapporto di 5:1, legati con legami glicosidici 1 -> 4<sup>[9]</sup>.

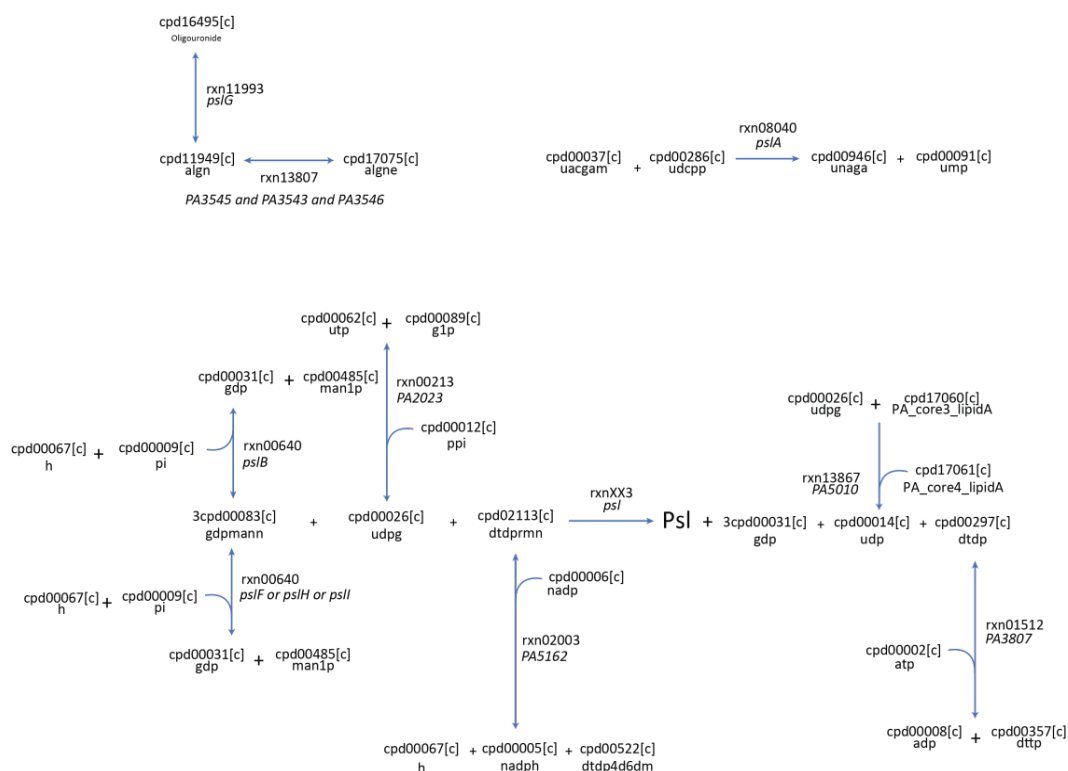
Per quanto concerne la struttura di PSL, in un lavoro pubblicato da Michael J. Franklin et al. (2011)<sup>[4]</sup>, risulta essere composta da pentameri ripetuti di D-mannosio, L-ramnosio e D-glucosio con un rapporto di 3:1:1<sup>[4]</sup>.

I geni formanti gli operoni *pel* e *psl*, illustrati nell'introduzione a questo lavoro, sono stati analizzati tramite il database *Pseudomonas Genome DB* [www.pseudomonas.com] e *NCBI* per reperire quante più informazioni possibili. Allo stato dell'arte per molti dei geni *pel* e *psl* è presente tuttavia solamente una funzione ipotetica, ottenuta mediante il confronto delle sequenze nucleotidiche provenienti da *P. aeruginosa* con quelle provenienti da altri microrganismi<sup>[4;18]</sup>. In questo studio abbiamo optato quindi per evitare di attribuire una funzione o una reazione specifica a ciascun gene formante l'operone e di attribuire invece l'intera produzione dell'esopolisaccaride all'operone *in toto*. Dal punto di vista funzionale questa scelta non è errata in quanto vengono utilizzati i medesimi composti di partenza per ottenere il medesimo prodotto finale: invece di avere il gene "a" che codifica per un enzima "A" che trasforma il composto "L" nel composto "M" e il gene "b" che codifica per un enzima "B" che trasforma il composto "M" nel composto "N" abbiamo l'operone formato dai geni "a" e "b" che utilizza il composto "L" per produrre "N" (figura 8).



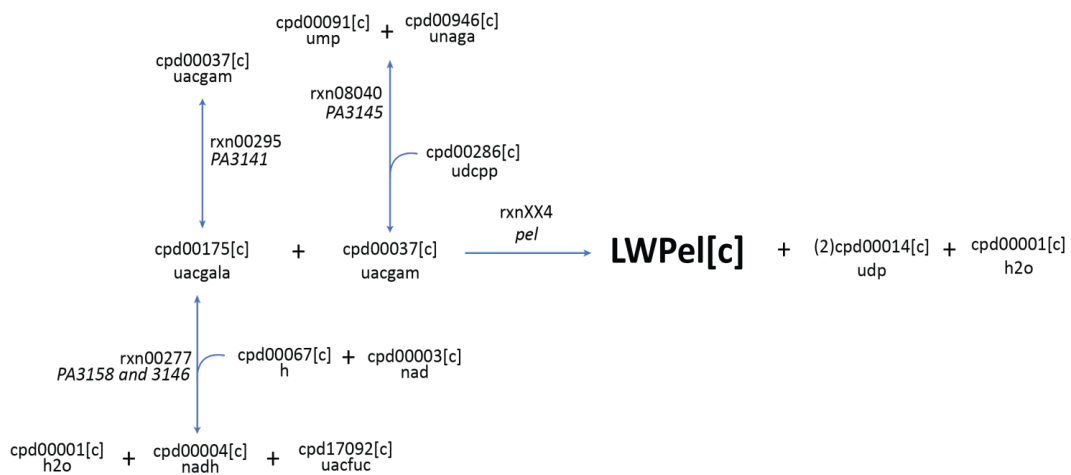
**Figura 8.** Rappresentazione grafica della scelta di non attribuire una funzione o una reazione specifica a ciascun gene formante l'operone e di attribuire invece l'intera produzione dell'EPS all'operone *in toto*.

I composti necessari alla produzione di entrambi gli esopolisaccaridi sono stati ricercati su ModelSEED<sup>[27]</sup>. È stato verificato che questi nuovi composti si integrassero in iPae1146 ovvero che fossero già presenti all'interno del modello reazioni che, anche come metaboliti secondari, producessero e/o consumassero quel determinato composto. Sono stati ricostruiti anche schematicamente in modo grafico i *pathways* coinvolti nella produzione degli EPS in esame così da facilitare la comprensione delle vie metaboliche e delle reazioni coinvolte (figure 9 e 10).



**Figura 9.** Rappresentazione schematica del pathway Psl incluso nel modello iPae1146N. I codici dei composti e delle reazioni sono quelli attualmente inclusi nella ricostruzione.





**Figura 10.** Rappresentazione schematica del pathway LWPel incluso nel modello iPae1146N. I codici dei composti e delle reazioni sono quelli attualmente inclusi nella ricostruzione.

Successivamente alla verifica i composti sono stati aggiunti al modello (tabella 1): all'interno di quest'ultimo i composti sono riportati con diversi campi e informazioni indicanti i) il codice del composto nel formato cpdNNNNN, ii) il nome, iii) la formula chimica, iv) il compartimento cellulare in cui si trova, v) la carica e altre informazioni utili (figura 11).

Codice reazione	Nome reazione	Reazione	GPR
XX5	HWPel synthesis operon	(5) cpd00175 [c] + cpd00037 [c] -> HWPEL [c] + (6) cpd00014 [c] + (5) cpd00001 [c]	PA3058 and PA3059 and PA3060 and PA3061 and PA3062 and PA3063 and PA3064
XX6	HWPel release	HWPEL [c] -> HWPEL [e]	unassigned
EX_HWPel	HWPel EX exchange	HWPEL [e] -> HWPEL [b]	unassigned

XX4	LWPeI synthesis operon	cpd00175 [c] + cpd00037 [c] -> LWPEL [c] + (2) cpd00014 [c] + cpd00001 [c]	PA3058 and PA3059 and PA3060 and PA3061 and PA3062 and PA3063 and PA3064
XX2	LWPeI release	LWPEL [c] -> LWPEL [e]	unassigned
EX_LWPeI	LWPeI EX exchange	LWPEL [e] -> LWPEL [b]	unassigned
XX3	Psl synthesis operon	(3) cpd00083 [c] + cpd00026 [c] + cpd02113 [c] -> PSL [c] + (3) cpd00031 [c] + cpd00014 [c] + cpd00297 [c]	PA2231 and PA2232 and PA2233 and PA2234 and PA2235 and PA2236 and PA2237 and PA2238 and PA2239 and PA2240 and PA2241 and PA2242
XX1	Psl release	PSL [c] -> PSL [e]	unassigned
EX_Psl	Psl EX exchange	PSL [e] -> PSL [b]	unassigned
rxn11993	Poly(beta-D-1,4-mannuronide) lyase	cpd11949[c] <-> cpd16495[c]	PA2237 or PA3547
EX_Alg	Acetylate Alginate exchange	cpd17074[e] -> cpd17074[b]	unassigned

**Tabella 1.** Dettagli delle reazioni di biosintesi di PEL e PSL aggiunte durante la revisione del modello.

```

<species id="M_cpd00001_c" name="H2O" compartment="c" hasOnlySubstanceUnits="false"
boundaryCondition="false" constant="false">
  <notes>
    <body xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">
      <p>FORMULA: H2O</p>
      <p>CHARGE: 0</p>
    </body>
  </notes>
</species>

```

**Figura 11.** Aspetto tipico di un composto all'interno di un GEM; nel caso in figura il composto è l'acqua.

Alla fine di questo processo di revisione del modello originale iPae1146 con l'aggiunta dei nuovi metaboliti, geni e reazioni è stato ottenuto il nuovo modello chiamato iPae1146N. Un confronto più dettagliato tra i due modelli è riportato nella tabella 2.

Componenti	iPae1146	iPae1146N
<b>Metaboliti</b>	1284	1291
<b>Reazioni</b>	1496	1507
<b>Geni</b>	1148	1167

**Tabella 2.** Confronto dei componenti tra i modelli iPae1146 e iPae1146N.

## 4.2 Formulazione della funzione obiettivo (Objective Function)

La produzione di biomassa è la *objective function* (OF) comunemente utilizzata durante le simulazioni che impiegano l'FBA. Generalmente, questa scelta, si basa sul presupposto che, in condizioni ottimali, il metabolismo microbico sia indirizzato verso la produzione delle componenti cellulari principali necessarie per sostenere la vita e per riprodursi. Nel nostro caso, i dati di crescita indicano che *P. aeruginosa*, mentre cresce e quindi produce nuova biomassa, produce anche gli

esopolisaccaridi (entrambe le forme di PEL, PSL e alginato). Quindi è chiaro che il *network* metabolico è in grado di reindirizzare gli intermedi metabolici con lo scopo di produrre sia biomassa che EPS.

Per questo motivo è stato scelto di introdurre una doppia ottimizzazione nel nostro modello, quindi una doppia OF, tenendo conto della sintesi simultanea di questi prodotti. Dal punto di vista pratico è stata introdotta una reazione artificiale nel modello che tiene conto della produzione di biomassa ed EPS, utilizzando i seguenti coefficienti stechiometrici per ripartirla: 0,966 e 0,034 rispettivamente per la produzione di biomassa e la produzione di EPS.

Tale ripartizione è stata fatta approssimando la produzione di EPS alla produzione di LPS: nel modello originale iPae1146 la produzione di LPS è stimata con un coefficiente stechiometrico tale da risultare il 3,4%<sup>[10]</sup> della composizione totale della funzione biomassa.

In aggiunta, secondo i dati sperimentali disponibili, la componente EPS della OF (0,034) è stata ulteriormente ripartita tra le varie tipologie: LWPEL 0,0008, HWPEL 0,0008, alginato 0,0015 e PSL 0,0309. È stato scelto di mettere a punto una doppia ottimizzazione, piuttosto che includere gli EPS nella reazione di produzione della biomassa, poiché i dati sperimentali in nostro possesso suggeriscono che i mutanti *pel* e *psl* sono comunque in grado di crescere. L'inclusione degli EPS nella reazione di produzione della biomassa avrebbe, invece, portato a considerare i ceppi mutanti in *pel* e *psl* come non vitali durante le successive simulazioni computazionali.

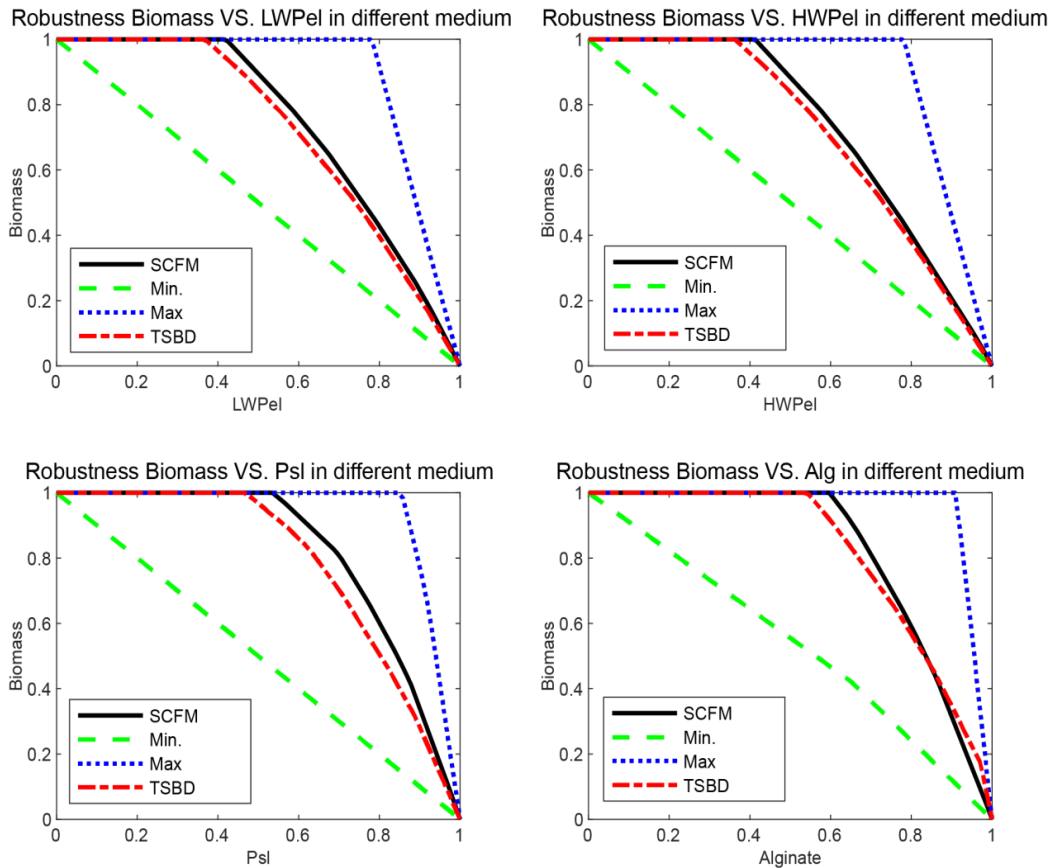
#### **4.3 Formulazione dei *media* di crescita *in silico***

Per studiare la relazione tra la produzione di biomassa e la produzione di EPS è stato necessario formulare, *in silico*, quattro terreni di crescita utilizzati comunemente *in vivo* per far crescere *P. aeruginosa*. I terreni sintetici includono

un mezzo generale completo, un mezzo minimo, l'SCFM (*Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Medium*)<sup>[10]</sup> e il TSBD<sup>[30]</sup> (*Tryptic Soy Broth* nel quale è stato rimosso il ferro). Ciascuna tipologia di mezzo, dal punto di vista pratico, è stata messa a punto chiudendo dapprima tutte le reazioni della tipologia EX: ovvero quelle adibite al trasporto all'interno della cellula dei metaboliti necessari al microrganismo. Il passo successivo è stato quello di riaprire, attribuendogli un *rate* di ingresso definito, quelle sole reazioni corrispondenti al trasporto delle sostanze presenti nella formulazione dello specifico terreno.

L'attribuzione di un *rate* definito simula la concentrazione e quindi la disponibilità di una determinata sostanza nel mezzo. L'esatta formulazione di ciascuno dei quattro terreni di crescita, compresi dunque le sostanze contenute e il *rate* di ingresso nella cellula, è fornita nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato (S1-S4).

Successivamente è stata effettuata un'analisi della robustezza (*Robustness Analysis*, RA) per studiare il *trade-off* tra produzione di biomassa ed EPS nelle diverse condizioni simulate: in questo modo è possibile vedere come i mezzi ne influenzino la produzione. Questo tipo di analisi consente di variare il flusso attraverso una reazione nel modello, nel nostro caso l'efflusso di EPS, e di valutare il valore ottimale dell'obiettivo, la produzione di biomassa, come funzione di questo flusso. In pratica è stato valutato quanto l'obiettivo è sensibile ad una reazione particolare. I risultati di questa analisi sono riportati nella figura 12.



**Figura 12.** RA che mostra il *trade-off* tra la produzione di biomassa ed EPS. I valori negli assi x e y sono espressi come il rapporto tra il valore di ottimizzazione ottenuto durante l'RA e quello ottenuto impostando la solita reazione (biomassa o produzione di EPS) come unica funzione obbiettivo.

La nostra analisi predice correttamente la competizione esistente per gli intermedi cellulari tra l'assemblaggio della biomassa e la produzione di EPS. Indipendentemente dal tipo di EPS che abbiamo posto in esame, non è possibile ottenere simultaneamente la massima produzione di biomassa ed EPS poiché nella maggior parte dei casi, come si evince dalla figura 12, un aumento della produzione di EPS si traduce in una diminuzione del *rate* di produzione di biomassa. Il valore soglia oltre il quale la produzione di EPS determina una

diminuzione del *rate* di produzione di biomassa dipende chiaramente dal mezzo in cui vengono svolte le simulazioni. Nei mezzi più ricchi di nutrienti questo effetto risulta meno evidente e si traduce in un *rate* ottenibile di produzione di EPS che raggiunge il 90% del *rate* massimo ideale di produzione senza aver alcun effetto sul tasso di crescita di *P. aeruginosa*. Nel terreno minimo, la bassa disponibilità di nutrienti, invece, comporta un *trade-off* tra produzione di EPS e produzione di biomassa molto più rigido e implica che il *rate* massimo di produzione di biomassa sia ottenibile solamente quando non vi è produzione di EPS.

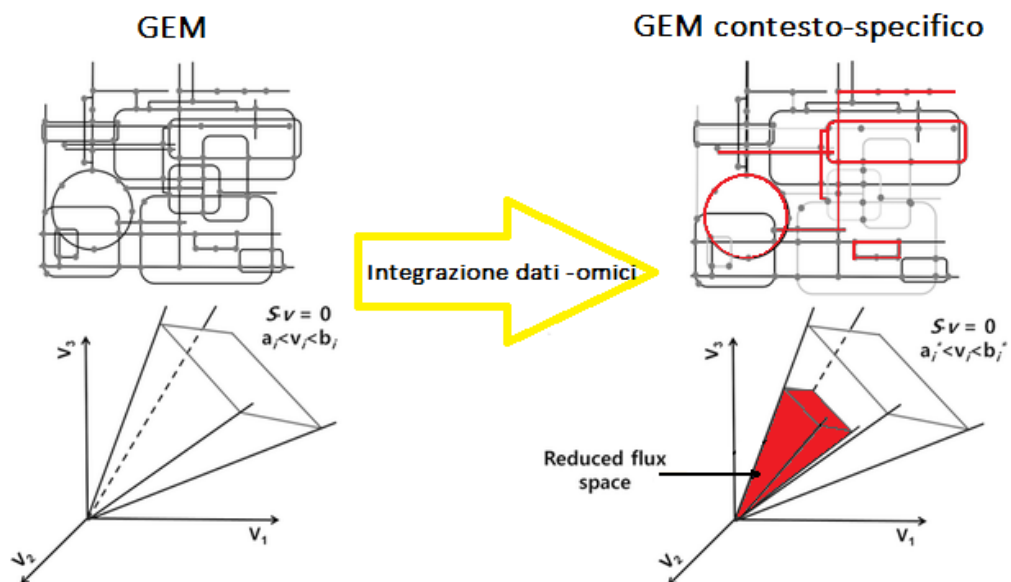
Nel complesso tutto ciò concorda con l'osservazione che un *pool* più ampio di nutrienti disponibili si traduce in una maggior flessibilità del *network* metabolico che consente, quindi, la simultanea e completa ottimizzazione di entrambe le reazioni di produzione. Viceversa, l'utilizzo di un mezzo minimo impone vincoli più stringenti al *network* metabolico tali che la produzione di un composto possa avvenire solamente a spese di un altro composto.

#### **4.4 Realizzazione dei mutanti**

In accordo con quanto è stato fatto *in vivo* abbiamo riprodotto *in silico* il mutante. Si tratta di un doppio mutante (*pel/psl*) privato di entrambi gli operoni *pel* e *psl*. Sotto l'aspetto pratico è stata utilizzata la funzione "*deleteModelGenes*" presente in COBRA per eliminare dal modello l'insieme dei geni formanti gli operoni e più precisamente: PA3064, PA3063, PA3062, PA3061, PA3060, PA3059, PA3058, PA2242, PA2241, PA2240, PA2239, PA2238, PA2237, PA2236, PA2235, PA2234, PA2233, PA2232, PA2231. Le successive analisi sono state effettuate quindi su due varianti del modello iPae1146N: una chiamata *wildtype* uguale in tutto e per tutto all'iPae1146N e una definita mutante creata come scritto sopra, entrambe vincolate al *medium* TSBD.

## 4.5 Integrazione dei dati di espressione e analisi dei ceppi mutanti

È noto che i network metabolici siano utili per comprendere e analizzare condizioni contesto-specifiche<sup>[23]</sup>, in cui solamente una frazione dell'intera rete di reazioni è attiva dovuta da una specifica condizione fisiologica. I dati di espressione genica, provenienti da analisi effettuate *in vivo*, possono essere utilizzati ad integrazione di un modello, come ulteriore vincolo (*constraint*)<sup>[19]</sup>, con l'obiettivo di determinare un sottoinsieme di reazioni contesto-specifiche e per eseguire simulazioni di crescita più realistiche<sup>[31]</sup> (figura 13).



**Figura 13.** Rappresentazione schematica di come i dati di espressione riducono lo spazio delle soluzioni possibili nel GEM.

### 4.5.1 Utilizzando Tn-core

Per questa analisi abbiamo utilizzato un'implementazione modificata<sup>[29]</sup> dell'algoritmo GIMME descritto in [https://www.biorxiv.org/content/early/2017/11/29/221325] per integrare i dati



di espressione genica in formato RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) nel modello iPae1146N.

In totale abbiamo analizzato quattro diverse condizioni:

- i) *P. aeruginosa* PAO1 *wildtype* cresciuto in terreno liquido,
- ii) *P. aeruginosa* PAO1 *wildtype* cresciuto in terreno semisolido,
- iii) *P. aeruginosa* PAO1 mutante in *pel* e *psl* cresciuto in terreno liquido,
- iv) *P. aeruginosa* PAO1 mutante in *pel* e *psl* cresciuto in terreno semisolido.

Per ciascuna di queste condizioni sono state vincolate (*constrained*) le reazioni in base all'espressione dei geni corrispondenti, imposto come funzioni obiettivo del *network* metabolico sia la produzione di biomassa che la produzione di PSL (doppia ottimizzazione) e impiegato l'FBA per ricavare 4 differenti distribuzioni di flusso.

Tuttavia, come spiegato nella parte introduttiva di questo lavoro, è noto che l'FBA fornisca soltanto una tra tutte le distribuzioni di flusso ottimali possibili all'interno della cellula<sup>[26]</sup>. Quindi, con lo scopo di prevedere correttamente i cambiamenti metabolici in ciascuna delle condizioni di crescita e per ciascun *pool* genetico, è stato limitato lo spazio delle soluzioni accettabili sfruttando l'FVA. L'impiego dell'FVA consente di stimare il flusso minimo e il flusso massimo ammissibile attraverso ciascuna reazione, impiegando gli stessi *constraints* utilizzati nell'FBA, quindi in quanto tale è possibile utilizzarla per stimare la correttezza e l'accuratezza delle previsioni ottenute tramite FBA. Nel dettaglio sono state mantenute per le analisi successive soltanto quelle reazioni aventi flusso massimo ( $fFVA_{max}$ ) e flusso minimo ( $fFVA_{min}$ ), predetti tramite FVA, che non differivano oltre il 20% dal flusso predetto dalla FBA ( $fFBA$ ) come segue<sup>[24]</sup>:

$$\begin{aligned} \text{con } fFBA < 0 &\rightarrow fFVA_{min} \geq 1.2 * fFBA \wedge fFVA_{max} \leq 0.8 * fFBA \\ \text{con } fFBA \geq 0 &\rightarrow fFVA_{min} \geq 0.8 * fFBA \wedge fFVA_{max} \leq 1.2 * fFBA \end{aligned}$$

In aggiunta non sono state considerate, per le analisi successive, anche quelle reazioni il cui flusso era cambiato a seguito della rimozione dei geni *pel* e *psl*.

Il modello wildtype e il modello mutante prima di vincolarli ai dati di espressione contano 1507 reazioni ciascuno.

Successivamente al vincolo ai dati di espressione provenienti dai 4 casi precedentemente descritti i modelli contesto-specifici hanno il seguente numero di reazioni mantenute:

- il modello wildtype cresciuto in TSBD liquido (**W**) mantiene 919 reazioni;
- il modello mutante *pel/psl* cresciuto in TSBD liquido (**M**) mantiene 806 reazioni;
- il modello wildtype cresciuto in TSBD semisolido (**WA**) mantiene 907 reazioni;
- il modello mutante *pel/psl* cresciuto in TSBD semisolido (**MA**) mantiene 794 reazioni.

Dai conteggi precedenti sono state tolte quelle reazioni il cui flusso variava (background) nei modelli, non contesto specifici di partenza, come sola conseguenza dell'eliminazione dei geni per ottenere il mutante riportando questi nuovi totali come numero di reazioni:

- il modello **W** conta 682 reazioni;
- il modello **M** conta 602 reazioni;
- il modello **WA** conta 678 reazioni;
- il modello **MA** conta 590 reazioni.

Successivamente sono state tolte dalle analisi successive anche quelle reazioni che non rispettavano i vincoli di affidabilità ottenuti con FVA arrivando alle conte totali del numero di reazioni per ciascun modello contesto-specifico:

- per il modello **W** si hanno 412 reazioni;

- per il modello **M** si hanno 404 reazioni;
- per il modello **WA** si hanno 425 reazioni;
- per il modello **MA** si hanno 429 reazioni.

Di seguito una tabella riassuntiva

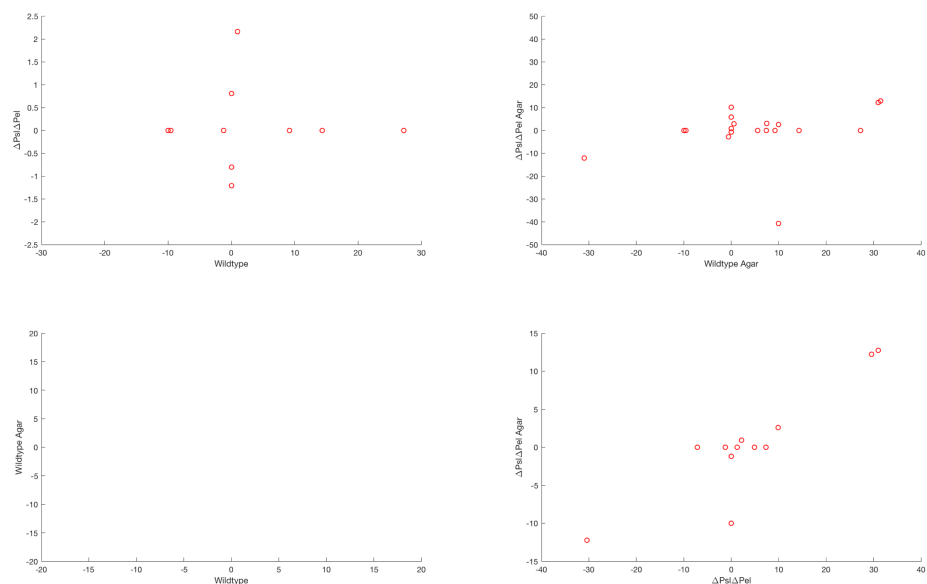
Modello	N° reazioni totali	N° reazioni senza background	N° reazioni con FBA significativo
ContextModel <b>W</b>	919	682	412
ContextModel <b>M</b>	806	602	404
ContextModel <b>WA</b>	907	678	425
ContextModel <b>MA</b>	794	590	429

Dal confronto di ciascuna simulazione, l'una contro l'altra, abbiamo previsto i possibili cambiamenti nelle distribuzioni di flusso per ciascuno dei modelli metabolici contesto specifici (figura 14). Nel dettaglio sono state prese in considerazione le reazioni a comune tra due modelli alla volta in modo da poterne confrontare la variazione di flusso. Per confrontare la variazione di flusso di una reazione tra i due scenari è stato fatto il valore assoluto del rapporto tra il flusso nel caso 2 e nel caso 1 e sono state considerate attendibili solo quelle con risultato del rapporto minore di 0.66 (diminuzione di 2/3) e quelle con risultato maggiore di 1.5 (aumento di una volta e mezzo):

$$\text{con } \left| \frac{fFBA_{caso2}}{fFBA_{caso1}} \right| < 0.66 \wedge \left| \frac{fFBA_{caso2}}{fFBA_{caso1}} \right| > 1.5$$

- tra il modello **W** e il modello **M** ci sono 342 reazioni a comune delle quali **17** in cui il flusso cambia tra le due condizioni in accordo con le condizioni imposte;

- tra il modello **WA** e il modello **MA** ci sono 369 reazioni a comune delle quali **26** in cui il flusso cambia tra le due condizioni in accordo con le condizioni imposte;
- tra il modello **W** e il modello **WA** ci sono 396 reazioni a comune delle quali **0** in cui il flusso cambia tra le due condizioni in accordo con le condizioni imposte;
- tra il modello **M** e il modello **MA** ci sono 388 reazioni a comune delle quali **17** in cui il flusso cambia tra le due condizioni in accordo con le condizioni imposte.



**Figura 14.** Scatter plots riguardanti le diverse distribuzioni di flusso tra le reazioni nelle quattro condizioni testate. I valori sugli assi x e y si riferiscono al valore di flusso di ciascuna reazione.

Nella tabella S5 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **17** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il *wildtype* e il mutante *pel/psf* quando entrambi crescono nel TSBD liquido.

Nella tabella S6 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **26** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il *wildtype* e il mutante *pel/psf* quando entrambi crescono nel TSBD semisolido.

Nella tabella S7 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **17** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il mutante *pel/psf* cresciuto nel TSBD liquido e il mutante *pel/psf* cresciuto nel TSBD semisolido.

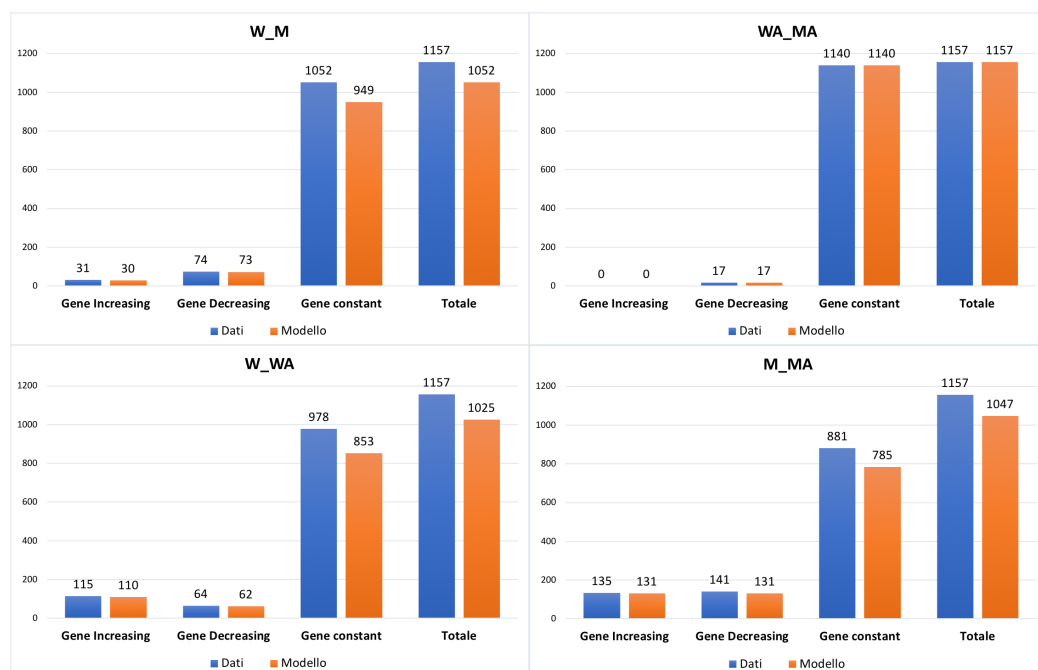
#### **4.5.2 Utilizzando MADE**

Per questa analisi abbiamo utilizzato l'algoritmo MADE descritto in [<http://www.bme.virginia.edu/csbl/Downloads1-made.html>] per integrare i dati relativi ai geni differenzialmente espressi, DEGs (*Differentially Expressed Genes*), nel modello iPae1146N.

I dati sono relativi a quattro diversi confronti:

- i)* tra *wildtype* cresciuto in TSBD liquido (**W**) e mutante *pel/psf* cresciuto in TSBD liquido (**M**),
- ii)* tra *wildtype* cresciuto in TSBD semisolido (**WA**) e mutante *pel/psf* cresciuto in TSBD semisolido (**MA**),
- iii)* tra *wildtype* cresciuto in TSBD liquido (**W**) e *wildtype* cresciuto in TSBD semisolido (**WA**),
- iv)* tra mutante *pel/psf* cresciuto in TSBD liquido (**M**) e mutante *pel/psf* cresciuto in TSBD semisolido (**MA**).

Per ciascuna di queste condizioni è stato lanciato l'algoritmo MADE fornendo come *input*: 1) il modello wildtype del ceppo PAO1 fatto crescere nel terreno TSBD e sottoposto alla doppia OF, come illustrato precedentemente, 2) i valori relativi al  $\log_2$ FoldChange, valore che indica di quanto cambia l'espressione di ciascun gene tra una condizione 1 e una condizione 2, e 3) i valori (*p-value*) relativi alla probabilità che il cambiamento tra la condizione 1 e la condizione 2 sia significativo. Quello che l'algoritmo fornisce come *output*, tra le altre cose, è una lista di geni, presenti nel modello, sia per la condizione 1 che per la condizione 2, indicante se in quella specifica situazione, in accordo con i DEGs, debbano essere considerati accesi (1) o spenti (0) (figura 15).



**Figura 15.** Rappresentazione con istogrammi del confronto, per ciascuna delle 4 condizioni, tra i geni di cui MADE possiede i dati e quelli che ha mappato sul modello.

Per ciascun confronto, abbiamo realizzato 2 nuovi modelli partendo dal modello fornito come *input* per MADE: nel primo modello abbiamo tolto

(*deleteModelGenes*) quei geni che nella lista della condizione 1 fornita da MADE sono da considerarsi spenti e stessa operazione nel secondo modello togliendo quei geni che nella lista della condizione 2 fornita da MADE sono da considerarsi spenti.

Successivamente abbiamo ottimizzato i modelli ottenuti e abbiamo analizzato tramite FBA come cambiasse la distribuzione dei flussi tra le reazioni componenti il modello.

- Nel confronto tra **W** e **M** di partenza ci sono 1507 reazioni a comune di cui 297 in cui il flusso cambia tra le due condizioni.
- Nel confronto tra **WA** e **MA** di partenza ci sono 1507 reazioni a comune di cui 282 in cui il flusso cambia tra le due condizioni.
- Nel confronto tra **W** e **WA** di partenza ci sono 1507 reazioni a comune di cui 513 in cui il flusso cambia tra le due condizioni.
- Nel confronto tra **M** e **MA** di partenza ci sono 1507 reazioni a comune di cui 472 in cui il flusso cambia tra le due condizioni.

Tuttavia, come abbiamo fatto anche per l'analisi impiegante *Tn-core*, con lo scopo di prevedere correttamente i cambiamenti metabolici in ciascuna delle condizioni, è stato limitato lo spazio delle soluzioni accettabili sfruttando l'FVA. Come in precedenza sono state mantenute per le analisi successive soltanto quelle reazioni aventi flusso massimo ( $fFVA_{max}$ ) e flusso minimo ( $fFVA_{min}$ ), predetti tramite FVA, che non differivano oltre il 20% dal flusso predetto dalla FBA ( $fFBA$ ) come segue<sup>[24]</sup>:

$$\begin{aligned} \text{con } fFBA < 0 &\rightarrow fFVA_{min} \geq 1.2 * fFBA \wedge fFVA_{max} \leq 0.8 * fFBA \\ \text{con } fFBA \geq 0 &\rightarrow fFVA_{min} \geq 0.8 * fFBA \wedge fFVA_{max} \leq 1.2 * fFBA \end{aligned}$$

Prendendo in considerazione solamente le reazioni che rispettano il vincolo di significatività dell'FVA:

- Nel confronto tra **W** e **M** questi condividono 986 reazioni.
- Nel confronto tra **WA** e **MA** questi condividono 911 reazioni.
- Nel confronto tra **W** e **WA** questi condividono 889 reazioni.
- Nel confronto tra **M** e **MA** questi condividono 1082 reazioni.

Di seguito una tabella riassuntiva

Confronto	N° reazioni condivise	N° reazioni condivise che cambiano	N° reazioni con FBA significativo condivise
<b>W_M</b>	1507	297	986
<b>WA_MA</b>	1507	282	911
<b>W_WA</b>	1507	513	889
<b>M_MA</b>	1507	472	1082

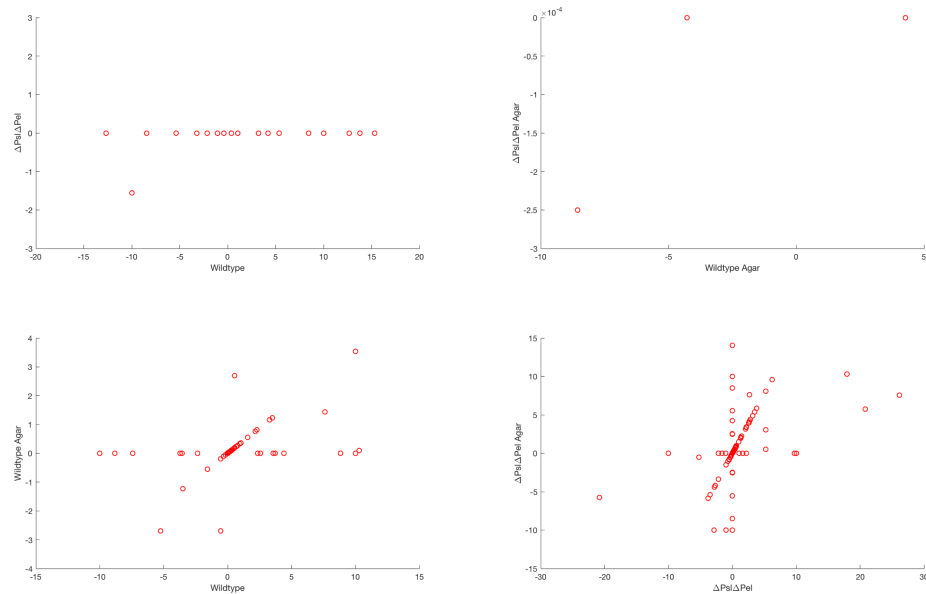
Abbiamo analizzato, quindi, i possibili cambiamenti previsti nelle distribuzioni di flusso per ciascun confronto (figura 16) e come in precedenza, è stato calcolato il valore assoluto del rapporto tra il flusso nel caso 2 e nel caso 1 e sono state considerate attendibili solo quelle reazioni con risultato del rapporto minore di 0.66 (diminuzione di 2/3) e quelle con risultato maggiore di 1.5 (aumento di una volta e mezzo):

$$\text{con } \left| \frac{fFBA_{\text{caso2}}}{fFBA_{\text{caso1}}} \right| < 0.66 \wedge \left| \frac{fFBA_{\text{caso2}}}{fFBA_{\text{caso1}}} \right| > 1.5$$

- tra il modello **W** e il modello **M** ci sono **45** reazioni in cui il flusso cambia in accordo con le condizioni imposte tra le due condizioni;
- tra il modello **WA** e il modello **MA** ci sono **10** reazioni in cui il flusso cambia in accordo con le condizioni imposte tra le due condizioni;
- tra il modello **W** e il modello **WA** ci sono **179** reazioni in cui il flusso cambia in accordo con le condizioni imposte tra le due condizioni;



- tra il modello **M** e il modello **MA** ci sono **256** reazioni in cui il flusso cambia in accordo con le condizioni imposte tra le due condizioni.



**Figura 16.** Scatter plots riguardanti le diverse distribuzioni di flusso tra le reazioni nelle quattro condizioni testate. I valori sugli assi x e y si riferiscono al valore di flusso di ciascuna reazione.

Nella tabella S8 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **45** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il *wildtype* e il mutante *pel/psf* quando entrambi crescono nel TSBD liquido.

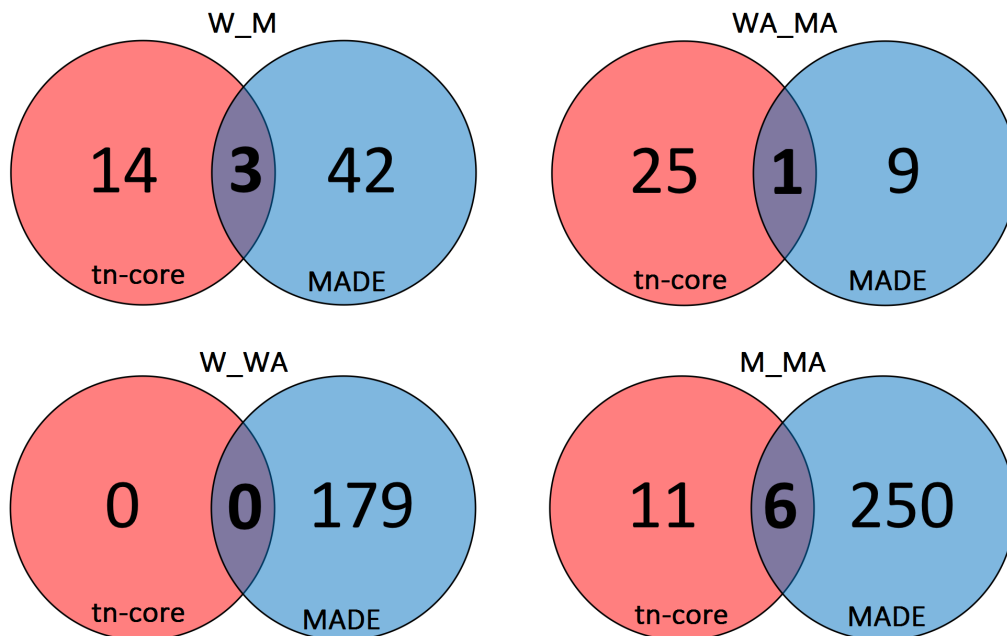
Nella tabella S9 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **10** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il *wildtype* e il mutante *pel/psf* quando entrambi crescono nel TSBD semisolido.

Nella tabella S10 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **179** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il *wildtype* cresciuto nel TSBD liquido e il *wildtype* cresciuto nel TSBD semisolido.

Nella tabella S11 nei materiali supplementari alla fine di questo elaborato sono riportati i dettagli delle **256** reazioni il cui flusso cambia nel confronto tra il mutante *pel/psf* cresciuto nel TSBD liquido e il mutante *pel/psf* cresciuto nel TSBD semisolido.

#### 4.5.3 Confronto tra le reazioni predette con Tn-core e MADE

In tre dei 4 scenari analizzati i modelli creati a partire dall'applicazione di MADE forniscono un numero maggiore di reazioni il cui flusso predetto tramite FBA cambia. La differenza numerica maggiore la troviamo nel confronto tra **M** e **MA** mentre quella minore nel confronto tra **WA** e **MA** (figura 17).



**Figura 17.** Diagramma di Venn per confronto numerico tra le reazioni il cui flusso varia in tn-core e MADE.

Andando nei dettagli:

- Nel confronto tra **W** e **M** i modelli risultanti dall'applicazione di Tn-core contano di 17 reazioni mentre quelli risultanti da MADE contano di 45 reazioni. Confrontando i due insiemi, quello proveniente da Tn-core con quello da MADE, **3** reazioni appaiono in entrambi:

Codice Reazione	Nome Reazione	Sottosistema	KEGG	Geni coinvolti
'R_EX_cpd00797(e)'	'EX (R)-3-Hydroxybutanoate e'			"
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	Sucrose Metabolism/ / Sialic Acid Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis/ Galactose metabolism/ Starch and sucrose metabolism/ Streptomycin biosynthesis	'PA5322'
'R_rxn01329'	'phosphomannomutase'	Mannose Metabolism/ / Perosamine Synthesis Vibrio/ / Alginate metabolism	Fructose and mannose metabolism	'PA5322'

- Nel confronto tra **WA** e **MA** i modelli risultanti dall'applicazione di Tn-core contano di 26 reazioni mentre quelli risultanti da MADE contano di 10 reazioni. Confrontando i due insiemi, quello proveniente da Tn-core con quello da MADE, solamente **1** reazione appare in entrambi:

Codice Reazione	Nome Reazione	Sottosistema	KEGG	Geni coinvolti
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	Sucrose Metabolism/ / Sialic Acid Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis/ Galactose metabolism/	'PA5322'

---

Starch and  
sucrose  
metabolism/  
Streptomycin  
biosynthesis

---

- Nel confronto tra **W** e **WA** i modelli risultanti dall'applicazione di Tn-core contano di 0 reazioni mentre quelli risultanti da MADE contano di 179 reazioni. Confrontando i due insiemi, quello proveniente da Tn-core con quello da MADE, di conseguenza **nessuna** reazione appare in entrambi.
- Nel confronto tra **M** e **MA** i modelli risultanti dall'applicazione di Tn-core contano di 17 reazioni mentre quelli risultanti da MADE contano di 256 reazioni. Confrontando i due insiemi, quello proveniente da Tn-core con quello da MADE, **6** reazioni appaiono in entrambi:

Codice Reazione	Nome Reazione	Sottosistema	KEGG	Geni coinvolti
'R_EX_cpd00054(e)'	'EX L-Serine e'			"
'R_EX_cpd00060(e)'	'EX L-Methionine e'			"
'R_rxn01827'	'4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase'		Tyrosine metabolism	'( PA0242 or PA0865 )'
'R_rxn02276'	'maleylacetate isomerase'		Tyrosine metabolism/ Styrene degradation	'( PA1655 or PA2007 or PA2473 or PA3035 )'
'R_rxn05242'	'L-valine transport in via proton symport'			'PA1590'
'R_rxn05289'	'thioredoxin reductase (NADPH)'	pyrimidine conversions/ Wyeosine-MimG Biosynthesis/ /	Pyrimidine metabolism	'( PA2616 or PA0849 )'

---

Glycine  
reductase,  
sarcosine  
reductase and  
betaine  
reductase

---

## 5. Conclusioni

L'integrazione di dati di espressione al nostro modello, restringendo lo spazio delle soluzioni possibili, ha quindi identificato le possibili ripercussioni a livello metabolico dei cambiamenti dell'espressione genica dovuti al background genetico alterato (mutanti) e alle diverse condizioni di crescita (liquida vs. semisolida).

È stato, in particolare, identificato il possibile ruolo chiave di due geni PA1590 e PA5322 e delle corrispondenti reazioni metaboliche coinvolte nel metabolismo di valina e amino-zuccheri: 'R\_rxn05242' (*'L-valine transport in via proton symport'*) associata al gene PA1590, predetta da entrambi i metodi utilizzati nel confronto M\_MA e 'R\_rxn00704' (*'phosphoglucomutase'*) e 'R\_rxn01329' (*'phosphomannomutase'*) associate al gene PA5322, predette da entrambi i metodi nei confronti W\_M e WA\_MA. In particolare, il gene PA1590 risulta differenzialmente espresso anche secondo i dati DEG nel confronto M\_MA e W\_WA; mentre PA5322 non risulta tra quelli differenzialmente espressi nei dati in nostro possesso. Inoltre sia PA1590 che PA5322 e le reazioni a questi associate figurano tra le reazioni che uno studio analogo<sup>[18]</sup> aveva predetto come reazioni metaboliche in cui il flusso variava nel confronto tra la condizione "planctonica" e la condizione "aggregata".

Analizzando non solamente il numero delle reazioni che vanno a cambiare tra ciascun confronto ma anche l'effettiva differenza di flusso predetta tra le due condizioni, con entrambi i metodi utilizzati, si può giungere alla seguente tabella:

Confronto	Ratio <i>f</i> FBA	range	tn-core	MADE
<b>WM</b>	$ fFBA_M/fFBA_W $	< 0.66	7	45
	$ fFBA_M/fFBA_W $	> 1.5	10	0
<b>WAMA</b>	$ fFBA_{MA}/fFBA_{WA} $	< 0.66	15	10
	$ fFBA_{MA}/fFBA_{WA} $	> 1.5	11	0

<b>WWA</b>	$ fFBA_{WA}/fFBA_W $	< 0.66	0	172
	$ fFBA_{WA}/fFBA_W $	> 1.5	0	7
<b>MMA</b>	$ fFBA_{MA}/fFBA_M $	< 0.66	15	30
	$ fFBA_{MA}/fFBA_M $	> 1.5	2	226

Con l'applicazione di tn-core il confronto con minori differenze è quello tra W e WA mentre quello con maggiori differenze è WA e MA.

Utilizzando MADE il confronto che presenta minori differenze è quello tra WA e MA mentre quello con maggiori differenze è quello con M e MA.

Dal punto di vista biologico le differenze maggiori ci si aspetterebbero nel confronto tra W e M in quanto il primo in grado di produrre/secernere esopolisaccaridi, necessari per il costituirsi del biofilm, e quindi di ottenere condizioni di crescita più favorevoli dalla forma aggregata mentre il secondo non potendo realizzare biofilm è costretto a crescere in forma planctonica, più sfavorevole.

Nel confronto tra WA e MA non ci si aspetterebbero molte differenze in quanto seppur il secondo non abbia la possibilità di produrre biofilm questa carenza verrebbe notevolmente sopperita dall'aggiunta di *agar agar* nel terreno di coltura così da renderlo semisolido permettendo anche al ceppo mutante di crescere in forma aggregata. Tra W e WA non ci si aspetterebbero sostanziali differenze in quanto entrambi sono in grado di produrre biofilm: il secondo ne ha meno necessità trovandosi già in un terreno semisolido che permette l'aggregazione, quindi l'unica differenza potrebbe essere in una maggior crescita del secondo in quanto può dirottare i nutrienti dalla produzione di esopolisaccaridi per il biofilm alla produzione di biomassa. Tra M e MA ci si aspetterebbero notevoli differenze seppur entrambi incapaci di produrre esopolisaccaridi e biofilm: il primo resta costretto ad una crescita planctonica mentre il secondo riesce a sopperire alla mancanza grazie all'aggiunta di *agar agar*.

Si potrebbe ipotizzare, quindi, che le differenze tra M e MA non si discostino troppo da quelle tra W e M. Dal punto di vista prettamente metabolico ci si aspetterebbe quindi grandi differenze tra W e M e tra M e MA, ed in maniera minore tra WA e MA e tra W e WA. Prendendo in considerazione il solo numero di reazioni predette con entrambe le metodiche utilizzate ( $W\_M = 3$ ;  $WA\_MA = 1$ ;  $W\_WA = 0$  e  $M\_MA = 6$ ) questa supposizione sembra corretta.

Infine, in accordo con l'articolo "*Systematic evaluation of methods for integration of transcriptomic data into constraint-based models of metabolism*" Machado, Herrgard (2014), il confronto tra le due metodiche utilizzate ha evidenziato come ci sia ancora bisogno di rendere più accurate le tecniche di integrazione di dati sperimentali con quelle di modellizzazione metabolica per arrivare alla predizione di distribuzioni di flussi metabolici cellulari univoche e consistenti.



## 6. Prospettive future

Con il progredire da una parte delle tecniche e metodologie in grado di generare come output dati di carattere -omico sempre più dettagliati e di maggiore affidabilità è necessario dall'altra parte che vengano sviluppate *pipeline* e metodologie computazionali più chiare e minuziose in modo tale da poter poi essere in grado di confrontare e riprodurre con maggior sicurezza dati, e simulazioni, provenienti da studi diversi od effettuati su organismi differenti. È altresì necessario, per quanto riguarda i modelli metabolici *genome-scale*, ad oggi disponibili, che questi vengano raccolti in una sola, o comunque in numero limitato, di banche dati così da divenire il punto di riferimento per la loro reperibilità. Sarebbe inoltre auspicabile che i modelli presentati in articoli e studi pubblicati fossero resi disponibili a corredo di questi. Certamente la bioinformatica sarà una materia a cui negli anni futuri ci si rivolgerà sempre con maggior frequenza, sia a priori che a posteriori, di esperimenti di laboratorio *in vivo*, per l'interpretazione e la predizione di dati. Per quanto riguarda *Pseudomonas aeruginosa*, ma più in generale qualunque organismo patogeno, l'applicazione di tecniche *in silico* potrà accorciare i tempi nella ricerca e sviluppo di nuovi target e farmaci e aiutare nella comprensione delle modificazioni che avvengono all'interno dei microrganismi.

## Bibliografia

1. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections  
J. W. Costerton, Philip S. Stewart, E. P. Greenberg  
Science, 21 May 1999: Vol. 284, Issue 5418, pp. 1318-1322  
doi: 10.1126/science.284.5418.1318
2. Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm  
Karin Sauer, Anne K. Camper, Garth D. Ehrlich, J. William Costerton, David G. Davies  
Journal of Bacteriology, Feb 2002, 184 (4) 1140-1154  
doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002
3. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 Pseudomonas aeruginosa biofilms  
Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., et al.  
Proc Natl Acad Sci USA. 2003, vol. 100,13: 7907-12  
doi: 10.1073/pnas.1231792100
4. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl  
Franklin M. J., Nivens D. E., Weadge J. T., Howell P. L.  
Frontiers in microbiology, 2, 167.  
doi: 10.3389/fmicb.2011.00167
5. Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates  
Owlia, P., Nosrati, R., Alaghebandan, R., Lari, A. R.  
GMS hygiene and infection control, vol. 9,2 Doc13. 19 Aug. 2014  
doi: 10.3205/dgkh000233
6. Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development  
Cynthia Ryder, Matthew Byrd, Daniel J Wozniak  
Current Opinion in Microbiology Volume 10, Issue 6, December 2007, Pages 644-648  
doi: 10.1016/j.mib.2007.09.010
7. Genome Diversity of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Laboratory Strains  
Jens Klockgether, Antje Munder, Jens Neugebauer, Colin F. Davenport, Frauke Stanke, Karen D. Larbig, et al.  
Journal of Bacteriology Jan 2010, 192 (4) 1113-1121  
doi: 10.1128/JB.01515-09
8. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen  
Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al.  
Nature. 2000 Aug 31;406(6799):959-64  
doi: 10.1038/35023079
9. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix  
Jennings L. K., Storek K. M., Ledvina H. E. , Coulon C., Marmont L. S., Sadovskaya I., et al.  
doi: 10.1073/pnas.1503058112

10. Reconstruction of the metabolic network of *Pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis  
Bartell J. A., Blazier A. S., Yen P., Thøgersen J. C., Jelsbak L., Goldberg J. B., et al.  
Nature communications vol. 8 14631.  
doi: 10.1038/ncomms14631
11. PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*  
Colvin KM, Alnabelseya N, Baker P, Whitney JC, Howell PL, Parsek MR.  
J Bacteriol. 2013 May;195(10):2329-39  
doi: 10.1128/JB.02150-12
12. Role of PelF in Pel Polysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*  
Aamir Ghafoor, Zoe Jordens, Bernd H. A. Rehm  
doi: 10.1128/AEM.03666-12
13. Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune Evasion  
Jones CJ, Wozniak DJ.  
MBio. 2017 Jun 20;8(3).  
doi: 10.1128/mBio.00864-17
14. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology  
Ethan E. Mann, Daniel J. Wozniak  
FEMS Microbiol Rev. 2012 Jul; 36(4): 893–916.  
doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
15. PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*  
Marmont LS, Whitfield GB, Rich JD, Yip P, Giesbrecht LB, Stremick CA, et al.  
J Biol Chem. 2017 Nov 24;292(47):19411-19422.  
doi: 10.1074/jbc.M117.812842
16. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix  
Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, et al.  
Environ Microbiol. 2012 Aug;14(8):1913-28.  
doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x
17. The *Pseudomonas aeruginosa* PSL Polysaccharide Is a Social but Noncheatable Trait in Biofilms  
Irie Y, Roberts AEL, Kragh KN, Gordon VD, Hutchison J, Allen RJ, et al.  
MBio. 2017 Jun 20;8(3). pii: e00374-17.  
doi: 10.1128/mBio.00374-17
18. Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial Metabolism  
Vital-Lopez FG, Reifman J, Wallqvist A.  
PLoS Comput Biol. 2015 Oct 2;11(10):e1004452.  
doi: 10.1371/journal.pcbi.1004452
19. Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions  
Anna S. Blazier, Jason A. Papin

- Front Physiol. 2012; 3: 299.  
doi: 10.3389/fphys.2012.00299
20. What is flux balance analysis?  
Jeffrey D. Orth, Ines Thiele, Bernhard Ø. Palsson  
Nat Biotechnol. 2010 Mar; 28(3): 245–248.  
doi: 10.1038/nbt.1614
  21. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0  
Schellenberger J, Que R, Fleming RM, Thiele I, Orth JD, Feist AM, et al.  
Nat Protoc. 2011 Aug 4;6(9):1290-307.  
doi: 10.1038/nprot.2011.308
  22. TIGER: Toolbox for integrating genome-scale metabolic models, expression data, and transcriptional regulatory networks  
Jensen PA, Lutz KA, Papin JA  
BMC Syst Biol. 2011 Sep 23;5:147.  
doi: 10.1186/1752-0509-5-147
  23. Improving metabolic flux predictions using absolute gene expression data  
Dave Lee, Kieran Smallbone, Warwick B Dunn, Ettore Murabito, Catherine L Winder, Douglas B Kell, et al.  
BMC Systems Biology20126:73.  
doi: 10.1186/1752-0509-6-73
  24. Constraint-based modeling identifies new putative targets to fight colistin-resistant *A. baumannii* infections  
Presta L, Bosi E, Mansouri L, Dijkshoorn L, Fani R, Fondi M  
Sci Rep. 2017 Jun 16;7(1):3706.  
doi: 10.1038/s41598-017-03416-2
  25. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction  
Ines Thiele, Bernhard Ø. Palsson  
Nat Protoc. 2010; 5(1): 93–121.  
doi: 10.1038/nprot.2009.203
  26. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges  
Raman K, Chandra N  
Brief Bioinform. 2009 Jul;10(4):435-49.  
doi: 10.1093/bib/bbp011
  27. SEED Servers: High-Performance Access to the SEED Genomes, Annotations, and Metabolic Models  
Ramy K. Aziz, Scott Devoid, Terrence Disz, Robert A. Edwards, Christopher S. Henry, Gary J. Olsen, et al.  
PLoS One. 2012; 7(10): e48053.  
doi: 10.1371/journal.pone.0048053
  28. A practical guide to genome-scale metabolic models and their analysis  
Santos F, Boele J, Teusink B  
Methods Enzymol. 2011;500:509-32.  
doi: 10.1016/B978-0-12-385118-5.00024-4

29. Tn-Core: context-specific reconstruction of core metabolic models using Tn-seq data  
George diCenzo, Alessio Mengoni, Marco Fondi  
doi: 10.1101/221325
30. Toxin A-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PA103: isolation and characterization  
Ohman DE, Sadoff JC, Iglewski BH  
Infect Immun. 1980 Jun;28(3):899-908.
31. Systematic evaluation of methods for integration of transcriptomic data into constraint-based models of metabolism  
Machado D, Herrgård M  
PLoS Comput Biol. 2014 Apr 24;10(4):e1003580.  
doi: 10.1371/journal.pcbi.1003580
32. Functional integration of a metabolic network model and expression data without arbitrary thresholding  
Jensen PA, Papin JA  
Bioinformatics. 2011 Feb 15;27(4):541-7.  
doi: 10.1093/bioinformatics/btq702
33. PseudoCyc, A Pathway-Genome Database for *Pseudomonas aeruginosa*  
Romero P., Karp P.  
J Mol Microbiol Biotechnol 2003;5:230–239.  
doi: 10.1159/000071075
34. Computationally efficient flux variability analysis  
Gudmundsson S, Thiele I  
BMC Bioinformatics. 2010; 11: 489.  
doi: 10.1186/1471-2105-11-489
35. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
Minoru Kanehisa, Susumu Goto  
*Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 1, 1 January 2000, Pages 27–30.  
doi: 10.1093/nar/28.1.27
36. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox  
Becker SA, Feist AM, Mo ML, Hannum G, Palsson BØ, Herrgard MJ  
Nat Protoc. 2007;2(3):727-38.  
doi: 10.1038/nprot.2007.99

## Materiali supplementari

### S1. Formulazione in silico del terreno di crescita minimo

Reaction code	Compound name	Compound formula	Lower bound
'R_EX_cpd00007(e)'	O2	O <sub>2</sub>	-20
'R_EX_cpd00009(e)'	Phosphate	HO <sub>4</sub> P	-1000
'R_EX_cpd00001(e)'	H2O	H <sub>2</sub> O	-1000
'R_EX_cpd00137(e)'	Citrate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd00149(e)'	Co2+	Co	-1000
'R_EX_cpd00205(e)'	K+	K	-1000
'R_EX_cpd00030(e)'	Mn2+	Mn	-1000
'R_EX_cpd10516(e)'	fe3+	Fe	-1000
'R_EX_cpd00021(e)'	Fe2+	Fe	-0,001
'R_EX_cpd00034(e)'	Zn2+	Zn	-1000
'R_EX_cpd00013(e)'	NH3	H <sub>4</sub> N	-1000
'R_EX_cpd00058(e)'	Cu2+	Cu	-1000
'R_EX_cpd00254(e)'	Mg	Mg	-1000
'R_EX_cpd00099(e)'	Cl-	Cl	-1000
'R_EX_cpd00063(e)'	Ca2+	Ca	-1000
'R_EX_cpd00067(e)'	H+	H	-1000
'R_EX_cpd00048(e)'	Sulfate	O <sub>4</sub> S	-1000
'R_EX_cpd00971(e)'	Na+	Na	-1000
'R_EX_cpd11574(e)'	Molybdate	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	-1000

### S2. Formulazione in silico del terreno di crescita complesso

Reaction code	Compound name	Compound formula	Lower bound
'R_EX_cpd00797(e)'	(R)-3-Hydroxybutanoate	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd17085(e)'	2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00176(e)'	2-keto-3-deoxygluconate	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00024(e)'	2-Oxoglutarate	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00489(e)'	4-Hydroxyphenylacetate	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00147(c)'	5-Methylthioadenosine	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00029(e)'	Acetate	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00142(e)'	Acetoacetate	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00182(e)'	Adenosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd11587(e)'	Ala-Gln	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd11584(e)'	Ala-His	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd11593(e)'	ala-L-asp-L	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd11583(e)'	Ala-Leu	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd11586(e)'	ala-L-glu-L	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd11582(e)'	ala-L-Thr-L	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd01092(e)'	Allantoin	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00162(e)'	Aminoethanol	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO	-10
'R_EX_cpd01262(e)'	Amylotriose	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	-10
'R_EX_cpd01048(e)'	Arsenate	HAsO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd04098(e)'	Arsenite	H <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00540(e)'	BET	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd11416_c'	Biomass	undefined	-10

'R_EX_cpd11596(e)'	butanesulfonate	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00211(e)'	Butyrate	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00063(e)'	Ca <sup>2+</sup>	Ca	-10
'R_EX_cpd00635(e)'	Cbl	C <sub>62</sub> H <sub>91</sub> CoN <sub>13</sub> O <sub>14</sub> P	-10
'R_EX_cpd01012(e)'	Cd <sup>2+</sup>	Cd	-10
'R_EX_cpd00098(e)'	Choline	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO	-10
'R_EX_cpd11595(e)'	chromate	H <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00137(e)'	Citrate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd00099(e)'	Cl <sup>-</sup>	Cl	-10
'R_EX_cpd00011(e)'	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00149(e)'	Co <sup>2+</sup>	Co	-10
'R_EX_cpd00058(e)'	Cu <sup>2+</sup>	Cu	-10
'R_EX_cpd01015(e)'	Cyanate	CNO	-10
'R_EX_cpd01017(e)'	Cys-Gly	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00381(e)'	L-Cystine	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00367(e)'	Cytidine	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00307(e)'	Cytosine	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	-10
'R_EX_cpd00117(e)'	D-Alanine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00438(e)'	Deoxyadenosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00654(e)'	Deoxycytidine	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00277(e)'	Deoxyguanosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd03279(e)'	Deoxyinosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00412(e)'	Deoxyuridine	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00082(e)'	D-Fructose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00072(e)'	D-fructose-6-phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub> P	-10
'R_EX_cpd00653(e)'	D-Galactonate	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd00280(e)'	D-Galacturonate	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd00609(e)'	D-Glucarate	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	-10
'R_EX_cpd00027(e)'	D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00079(e)'	D-glucose-6-phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub> P	-10
'R_EX_cpd00221(e)'	D-Lactate	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd01307(e)'	D-Lyxitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00386(e)'	D-Malate	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00637(e)'	D-Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00652(e)'	D-Mucic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	-10
'R_EX_cpd00105(e)'	D-Ribose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00550(e)'	D-Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd11579(e)'	ethanesulfonate	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00021(e)'	Fe <sup>2+</sup>	Fe	-0,001
'R_EX_cpd10516(e)'	fe <sup>3</sup>	Fe	-10
'R_EX_cpd03724(e)'	Ferrichrome	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> FeN <sub>9</sub> O <sub>12</sub>	-10
'R_EX_cpd00106(e)'	Fumarate	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00108(e)'	Galactose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00164(e)'	Glucuronate	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd11581(e)'	gly-asn-L	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd11589(e)'	gly-asp-L	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00100(e)'	Glycerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00080(e)'	Glycerol-3-phosphate	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> P	-10
'R_EX_cpd00033(e)'	Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00139(e)'	Glycolate	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd15603(e)'	Gly-Cys	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd11580(e)'	Gly-Gln	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd11592(e)'	gly-glu-L	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd15604(e)'	Gly-Leu	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd11591(e)'	Gly-Met	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd15605(e)'	Gly-Phe	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10

'R_EX_cpd11588(e)'	gly-pro-L	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd15606(e)'	Gly-Tyr	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00067(e)'	H+	H	-10
'R_EX_cpd00001(e)'	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	-10
'R_EX_cpd00268(e)'	H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	HO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd11578(e)'	hexanesulfonate	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00531(e)'	Hg <sup>2+</sup>	Hg	-10
'R_EX_cpd00226(e)'	HYXN	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	-10
'R_EX_cpd00246(e)'	Inosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd03048(e)'	Isethionate	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	-10
'R_EX_cpd00205(e)'	K+	K	-10
'R_EX_cpd03091(e)'	5'-Deoxyadenosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00035(e)'	L-Alanine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd11585(e)'	L-alanylglycine	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00224(e)'	L-Arabinose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00051(e)'	L-Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00132(e)'	L-Asparagine	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00041(e)'	L-Aspartate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00395(e)'	L-Cysteate	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00084(e)'	L-Cysteine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00023(e)'	L-Glutamate	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00053(e)'	L-Glutamine	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00119(e)'	L-Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00121(e)'	L-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00322(e)'	L-Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00159(e)'	L-Lactate	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00107(e)'	L-Leucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00039(e)'	L-Lysine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00130(e)'	L-Malate	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00060(e)'	L-Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd11576(e)'	L-methionine R-oxide	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd01914(e)'	L-Methionine S-oxide	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00066(e)'	L-Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00129(e)'	L-Proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00054(e)'	L-Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cJB00034(e)' (cpd00212)	L-Sorbose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00161(e)'	L-Threonine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00065(e)'	L-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00069(e)'	L-Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00156(e)'	L-Valine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00308(e)'	Malonate	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd01329(e)'	Maltohexaose	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>31</sub>	-10
'R_EX_cpd00179(e)'	Maltose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-10
'R_EX_cPY00016(e)'	Mannose		-10
'R_EX_cpd08023(e)'	methanesulfonate	CH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd11590(e)'	met-L-ala-L	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00254(e)'	Mg	Mg	-10
'R_EX_cpd00030(e)'	Mn <sup>2+</sup>	Mn	-10
'R_EX_cpd11574(e)'	Molybdate	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd11575(e)'	MOPS	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> S	-10
'R_EX_cpd00971(e)'	Na+	Na	-10
'R_EX_cpd00122(e)'	N-Acetyl-D-glucosamine	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00013(e)'	NH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> N	-10
'R_EX_cpd00244(e)'	Ni <sup>2+</sup>	Ni	-10
'R_EX_cpd00209(e)'	Nitrate	NO <sub>3</sub>	-10



'R_EX_cpd00075(e)'	Nitrite	NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00528(e)'	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00007(e)'	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	-20
'R_EX_cpd00064(e)'	Ornithine	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd04097(e)'	Pb	Pb	-10
'R_EX_cpd00009(e)'	Phosphate	HO <sub>4</sub> P	-10
'R_EX_cpy00116(e)' (cpd00285)	Phosphoethanolamine	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> P	-10
'R_EX_cpd00012(e)'	PPi	HO <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00141(e)'	Propionate	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00118(e)'	Putrescine	C <sub>4</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00020(e)'	Pyruvate	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00588(e)'	Sorbitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00264(e)'	Spermidine	C <sub>7</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00036(e)'	Succinate	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00048(e)'	Sulfate	O <sub>4</sub> S	-10
'R_EX_cpd09878(e)'	Sulfoacetate	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	-10
'R_EX_cpd00210(e)'	Taurine	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	-10
'R_EX_cpd00305(e)'	Thiamin	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS	-10
'R_EX_cpd00184(e)'	Thymidine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd01242(e)'	Thyminose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00851(e)'	trans-4-Hydroxy-L- proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00092(e)'	Uracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00073(e)'	Urea	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	-10
'R_EX_cpd00249(e)'	Uridine	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd03424(e)'	Vitamin B12	C <sub>61</sub> H <sub>86</sub> CON <sub>13</sub> O <sub>14</sub> PR	-10
'R_EX_cpd00423(e)'	Vitamin B12r	C <sub>62</sub> H <sub>91</sub> CON <sub>13</sub> O <sub>14</sub> P	-10
'R_EX_cpd00309(e)'	XAN	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00306(e)'	Xylitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00154(e)'	Xylose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-10
'R_EX_cpd00034(e)'	Zn <sup>2+</sup>	Zn	-10
'R_rJB00275' (cpd06227)	THF-L-glutamate	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>	-10
'R_rJB00280' (cpd00222)	GLCN	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_rJB00281' (cpd00480)	2-Dehydro-D-gluconate	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	-10
'R_EX_cpd00331(e)'	cis-Aconitate	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00089(e)'	Glucose-1-phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub> P	-10
'R_EX_cpd00314(e)'	D-Mannitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00380(e)'	Itaconate	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00581(e)'	Urocanate	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00281(e)'	GABA	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'EX_Psl'	Psl		-10
'EX_LWPel'	LWPel		-10
'EX_HWPel'	HWPel		-10
'EX_Alg'	Alginate		0

### S3. Formulazione in silico del terreno di crescita TSBD

Reaction code	Compound name	Compound formula	Lower bound
'R_EX_cpd00021(e)'	Fe <sup>2+</sup>	Fe	-0,001
'R_EX_cpd00001(e)'	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	-10
'R_EX_cpd00007(e)'	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	-20

'R_EX_cpd00009(e)'	Phosphate	HO <sub>4</sub> P	-10
'R_EX_cpd00013(e)'	NH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> N	-10
'R_EX_cpd00023(e)'	L-Glutamate	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00027(e)'	D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00033(e)'	Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00035(e)'	L-Alanine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00039(e)'	L-Lysine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00041(e)'	L-Aspartate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00048(e)'	Sulfate	O <sub>4</sub> S	-10
'R_EX_cpd00051(e)'	L-Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00054(e)'	L-Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00060(e)'	L-Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00063(e)'	Ca <sup>2+</sup>	Ca	-10
'R_EX_cpd00066(e)'	L-Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00067(e)'	H <sup>+</sup>	H	-10
'R_EX_cpd00069(e)'	L-Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00084(e)'	L-Cysteine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00099(e)'	Cl <sup>-</sup>	Cl	-10
'R_EX_cpd00100(e)'	Glycerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00107(e)'	L-Leucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00119(e)'	L-Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00129(e)'	L-Proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00156(e)'	L-Valine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00161(e)'	L-Threonine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00205(e)'	K <sup>+</sup>	K	-10
'R_EX_cpd00254(e)'	Mg	Mg	-10
'R_EX_cpd00322(e)'	L-Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00971(e)'	Na <sup>+</sup>	Na	-10

#### S4. Formulazione in silico del terreno di crescita SCFM

Reaction code	Compound name	Compound formula	Lower bound
'R_EX_cpd00011(e)'	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00027(e)'	D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-10
'R_EX_cpd00221(e)'	D-Lactate	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00021(e)'	Fe <sup>2+</sup>	Fe	-0,001
'R_EX_cpd00033(e)'	Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00067(e)'	H <sup>+</sup>	H	-10
'R_EX_cpd00001(e)'	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	-10
'R_EX_cpd00205(e)'	K <sup>+</sup>	K	-10
'R_EX_cpd00035(e)'	L-Alanine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00051(e)'	L-Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00041(e)'	L-Aspartate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00084(e)'	L-Cysteine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00023(e)'	L-Glutamate	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	-10
'R_EX_cpd00119(e)'	L-Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00322(e)'	L-Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00107(e)'	L-Leucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00039(e)'	L-Lysine	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00060(e)'	L-Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	-10
'R_EX_cpd00066(e)'	L-Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00129(e)'	L-Proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00054(e)'	L-Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	-10

'R_EX_cpd00161(e)'	L-Threonine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00065(e)'	L-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00069(e)'	L-Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00156(e)'	L-Valine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00254(e)'	Mg	Mg	-10
'R_EX_cpd00971(e)'	Na+	Na	-10
'R_EX_cpd00013(e)'	NH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> N	-10
'R_EX_cpd00209(e)'	Nitrate	NO <sub>3</sub>	-10
'R_EX_cpd00007(e)'	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	-20
'R_EX_cpd00064(e)'	Ornithine	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-10
'R_EX_cpd00009(e)'	Phosphate	HO <sub>4</sub> P	-10
'R_EX_cpd00048(e)'	Sulfate	O <sub>4</sub> S	-10

**S5.** Tabella con le **17** reazioni che cambiano tra **W** e **M**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_W$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_M$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_M / fFBA_W|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_W$	$fFBA_M$	$ fFBA_M / fFBA_W $
'R_EX_cpd00048(e)'	'EX Sulfate e'	1,00E-05	-1,2139436	121394,36
'R_EX_cpd00054(e)'	'EX L-Serine e'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00060(e)'	'EX L-Methionine e'	-1,2139436	1,00E-05	8,23761E-06
'R_EX_cpd00119(e)'	'EX L-Histidine e'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00797(e)'	'EX (R)-3-Hydroxybutanoate e'	27,23601	1,00E-05	3,67161E-07
'R_rxn00374'	'formamidase'	9,19039	1,00E-05	1,08809E-06
'R_rxn00623'	'sulfite reductase (NADPH2)'	1,00E-05	-1,2139436	121394,36
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-9,544580415	-0,00024	2,51452E-05
'R_rxn00789'	'ATP phosphoribosyltransferase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn01329'	'phosphomannomutase'	14,31652062	1,00E-05	6,98494E-07
'R_rxn02160'	'histidinol-phosphatase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn02320'	'histidinol-phosphate transaminase'	1,00E-05	-0,80961	80961
'R_rxn02473'	'imidazoleglycerol-phosphate dehydratase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn02834'	'phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn02835'	'phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn03135'	'Imidazole-glycerol-3-phosphate synthase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn05289'	'thioredoxin reductase (NADPH)'	0,94789	2,1618436	2,280690375

**S6.** Tabella con le **26** reazioni che cambiano tra **WA** e **MA**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_{WA}$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_{MA}$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_{MA} / fFBA_{WA}|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_{WA}$	$fFBA_{MA}$	$ fFBA_{MA} / fFBA_{WA} $
'R_EX_cpd00119(e)'	'EX L-Histidine e'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00797(e)'	'EX (R)-3-Hydroxybutanoate e'	27,23601	1,00E-05	3,672E-07
'R_rJB00278'	'quinoprotein glucose dehydrogenase'	1,00E-05	10,00001	1000001
'R_rxn00288'	'succinate dehydrogenase'	7,4879847	3,05E+00	0,4072744
'R_rxn00337'	'aspartate kinase'	3,15E+01	12,770372	0,4053121
'R_rxn00374'	'formamidase'	9,19039	1,00E-05	1,088E-06
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-9,5445804	-0,00024	2,515E-05
'R_rxn00853'	'N-carbamoylputrescine amidohydrolase'	1,00E-05	5,69451	569451
'R_rxn00902'	'2-isopropylmalate synthase'	7,42041	1,00E-05	1,348E-06
'R_rxn01069'	'threonine synthase'	30,973831	12,236702	0,3950658
'R_rxn01300'	'homoserine kinase'	30,973831	1,22E+01	0,3950658
'R_rxn01302'	'homoserine dehydrogenase (NADPH)'	-30,973811	-12,236682	0,3950654
'R_rxn01329'	'phosphomannomutase'	14,316521	1,00E-05	6,985E-07
'R_rxn01643'	'aspartate-semialdehyde dehydrogenase'	31,507501	12,770372	0,4053121
'R_rxn01739'	'shikimate kinase'	5,57E-01	2,83045	5,0772225
'R_rxn01740'	'shikimate dehydrogenase'	-5,57E-01	-2,83043	5,0773688
'R_rxn01827'	'4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase'	5,53311	1,00E-05	1,807E-06
'R_rxn02276'	'maleylacetoacetate isomerase'	5,53E+00	1,00E-05	1,807E-06
'R_rxn02320'	'histidinol-phosphate transaminase'	1,00E-05	-0,80961	80961
'R_rxn02473'	'imidazoleglycerol-phosphate dehydratase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn02476'	'3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase'	0,55748	2,83045	5,0772225
'R_rxn02834'	'phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn02835'	'phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn03135'	'Imidazole-glycerol-3-phosphate synthase'	1,00E-05	0,80963	80963
'R_rxn05242'	'L-valine transport in via proton symport'	10,00001	2,57961	0,2579607
'R_rxn05582'	'glycine transport in/out via proton symport'	10,00001	-40,772828	4,0772787

**S7.** Tabella con le **17** reazioni che cambiano tra **M** e **MA**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_M$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_{MA}$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_{MA} / fFBA_M|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_M$	$fFBA_{MA}$	$ fFBA_{MA} / fFBA_M $
'R_EX_cpd00048(e)'	'EX Sulfate e'	-1,2139436	1,00E-05	8,238E-06
'R_EX_cpd00054(e)'	'EX L-Serine e'	1,00E-05	-1,00E+01	999999
'R_EX_cpd00060(e)'	'EX L-Methionine e'	1,00E-05	-1,2139436	121394,36
'R_EX_cpd00066(e)'	'EX L-Phenylalanine e'	-7,1719388	1,00E-05	1,394E-06
'R_rxn00337'	'aspartate kinase'	3,10E+01	12,770372	0,4123528
'R_rxn00623'	'sulfite reductase (NADPH2)'	-1,2139436	1,00E-05	8,238E-06
'R_rxn00902'	'2-isopropylmalate synthase'	7,3387202	1,00E-05	1,363E-06
'R_rxn01069'	'threonine synthase'	29,597122	1,22E+01	0,4134423
'R_rxn01300'	'homoserine kinase'	29,597122	12,236702	0,4134423
'R_rxn01302'	'homoserine dehydrogenase (NADPH)'	-30,435836	-12,236682	0,4020485
'R_rxn01643'	'aspartate-semialdehyde dehydrogenase'	30,969526	1,28E+01	0,4123528
'R_rxn01827'	'4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase'	4,90E+00	1,00E-05	2,041E-06
'R_rxn02276'	'maleylacetoacetate isomerase'	4,8989887	1,00E-05	2,041E-06
'R_rxn05153'	'sulfate transport via ABC system'	1,21E+00	1,00E-05	8,237E-06
'R_rxn05242'	'L-valine transport in via proton symport'	9,9183202	2,57961	0,2600854
'R_rxn05289'	'thioredoxin reductase (NADPH)'	2,1618436	9,48E-01	0,4384637
'R_rxn09240'	'sulfate adenylyltransferase'	1,2139636	1,00E-05	8,237E-06

**S8.** Tabella con le **45** reazioni che cambiano tra **W** e **M**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_W$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_M$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_M / fFBA_W|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_W$	$fFBA_M$	$ fFBA_M / fFBA_W $
'EX_Psi'	'Psi EX exchange'	1,07E+00	1,00E-05	9,35E-06
'R_EX_cpd00322(e)'	'EX L-Isoleucine e'	-9,99999	-1,56E+00	0,1557092
'R_EX_cpd00797(e)'	'EX (R)-3-Hydroxybutanoate e'	12,656276	1,00E-05	7,901E-07

'R_rxn00213'	'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase'	1,07E+00	1,00E-05	9,35E-06
'R_rxn00290'	'3-oxoacid CoA-transferase (Succinyl-CoA: acetoacetate)'	-3,85E-01	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn00322'	'lysine decarboxylase'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn00559'	'mannose-6-phosphate isomerase'	-3,21E+00	1,00E-05	3,117E-06
'R_rxn00602'	'methylmalonyl-CoA mutase'	8,44291	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn00640'	'mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP) reversible'	3,21E+00	1,00E-05	3,117E-06
'R_rxn00676'	'acetyl-CoA C-acyltransferase (2-Methyl-3-acetoacetyl-CoA)'	-8,44289	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-2,1392201	-2,40E-04	0,0001122
'R_rxn00991'	'hydroxymethylglutaryl-CoA lyase'	5,35271	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn00992'	'3-hydroxybutyrate dehydrogenase'	-12,656256	1,00E-05	7,901E-07
'R_rxn01241'	'pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide dehydrogenase)'	13,79561	1,00E-05	7,249E-07
'R_rxn01245'	'3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring).'	5,35271	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn01329'	'phosphomannomutase'	3,2084801	1,00E-05	3,117E-06
'R_rxn01355'	'Propionyl-CoA carboxylase'	8,44291	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn01504'	'methylglutaconyl-CoA hydratase'	-5,35269	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn01575'	'isoleucine transaminase'	8,44E+00	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn01675'	'glucose-1-phosphate thymidyltransferase'	1,07E+00	1,00E-05	9,35E-06
'R_rxn01729'	'glutarate-semialdehyde dehydrogenase'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn01730'	'glutaryl-coa synthetase'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn01802'	'glutaryl-CoA dehydrogenase'	3,85E-01	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn01996'	'methylmalonyl-CoA epimerase'	-8,44E+00	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn01997'	'dTDPglucose 4,6-dehydratase'	1,07E+00	1,00E-05	9,35E-06
'R_rxn02000'	'dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase'	1,0695	1,00E-05	9,35E-06
'R_rxn02003'	'dTDP-4-dehydrorhamnose reductase'	-1,07E+00	1,00E-05	9,35E-06
'R_rxn02268'	'acyl-CoA dehydrogenase (2-methylbutnonyl-CoA)'	4,22E+00	1,00E-05	2,369E-06
'R_rxn02271'	'S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide'	-8,44E+00	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn02866'	'isovaleryl-coA dehydrogenase'	5,35271	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn02867'	'S-(3-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide'	-5,35269	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn02889'	'Methylcrotonoyl-CoA carboxylase'	5,35271	1,00E-05	1,868E-06
'R_rxn02933'	'3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (2-Methylacetoacetyl-CoA)'	8,44291	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn02934'	'2-Methylprop-2-enoyl-CoA (2-Methylbut-2-enoyl-CoA)'	-8,44289	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn02950'	'3-Methyl-2-oxopentanoate:lipoamide oxidoreductase(decarboxylating and acceptor-2-methylpropanoylating)'	8,44291	1,00E-05	1,184E-06
'R_rxn05147'	'D-glucose transport via ABC system'	10,00001	1,00E-05	1E-06
'R_rxn06377'	'glycine dehydrogenase'	15,321278	1,00E-05	6,527E-07
'R_rxn06493'	'dihydrolipoamide dehydrogenase'	15,321278	1,00E-05	6,527E-07
'R_rxn06600'	'aminomethyltransferase'	15,321278	1,00E-05	6,527E-07
'R_rxn12405'	'transport of (r)-3-hydroxybutanoate [extraorganism-cytosol](passive)'	-12,656256	1,00E-05	7,901E-07
'R_rxn13789'	'delta-aminovalerate aminotransferase'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn13825'	'Diamine oxidase'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'R_rxn13921'	'delta-aminovalerate synthesis'	0,3851684	1,00E-05	2,596E-05
'XX1'	'Psl release'	1,0695	1,00E-05	9,35E-06
'XX3'	'Psl synthesis operon'	1,0695	1,00E-05	9,35E-06

**S9.** Tabella con le **10** reazioni che cambiano tra **WA** e **MA**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_{WA}$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_{MA}$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_{MA} / fFBA_{WA}|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_{WA}$	$fFBA_{MA}$	$ fFBA_{MA} / fFBA_{WA} $
'EX_Psl'	'Psl EX exchange'	4,28E+00	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn00213'	'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase'	4,28E+00	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-8,5603938	-2,40E-04	2,804E-05
'R_rxn01512'	'nucleoside-diphosphate kinase (ATP:dTDP)'	4,28E+00	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn01675'	'glucose-1-phosphate thymidyltransferase'	4,2800869	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn01997'	'dTDPglucose 4,6-dehydratase'	4,28E+00	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn02000'	'dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase'	4,2800869	1,00E-05	2,336E-06
'R_rxn02003'	'dTDP-4-dehydrorhamnose reductase'	-4,2800669	1,00E-05	2,336E-06
'XX1'	'Psl release'	4,2800869	1,00E-05	2,336E-06
'XX3'	'Psl synthesis operon'	4,2800869	1,00E-05	2,336E-06

**S10.** Tabella con le **179** reazioni che cambiano tra **W** e **WA**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_W$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel wildtype ( $fFBA_{WA}$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_{WA} / fFBA_W|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_W$	$fFBA_{WA}$	$ fFBA_{WA} / fFBA_W $
'EX_Psl'	'Psl EX exchange'	3,71E+00	1,00E-05	2,693E-06
'R_EX_cpd00021(e)'	'EX Fe2+ e'	-0,00099	-3,44E-04	0,3469745
'R_EX_cpd00054(e)'	'EX L-Serine e'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00100(e)'	'EX Glycerol e'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00139(e)'	'EX Glycolate'	1,01E-03	3,64E-04	0,3599057
'R_PAO1_Biomass'	'Pseudomonas biomass'	1,00E+01	3,54E+00	0,3535054

'R_rAB00001'	'glycoaldehyde:NAD+ oxidoreductase'	0,00101	3,64E-04	0,3599057
'R_rPY00162'	'PA160161S'	4,30E-02	1,52E-02	0,353655
'R_rPY00163'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C16:0 16:1)'	0,0430066	1,52E-02	0,353655
'R_rPY00164'	'Phosphatidylserine syntase (n-C16:0 16:1)'	1,36E-02	4,82E-03	0,3539797
'R_rPY00165'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C16:0 16:1)'	0,013612	4,82E-03	0,3539797
'R_rPY00166'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PE170cyc)'	0,013612	4,82E-03	0,3539797
'R_rPY00167'	'PA180181S'	8,52E-02	3,01E-02	0,3535806
'R_rPY00168'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C18:0 18:1)'	0,0852342	3,01E-02	0,3535806
'R_rPY00169'	'Phosphatidylserine syntase (n-C18:0 18:1)'	0,030253	1,07E-02	0,3537184
'R_rPY00170'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C18:0 18:1)'	0,030253	1,07E-02	0,3537184
'R_rPY00171'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PE190cyc)'	0,030253	1,07E-02	0,3537184
'R_rPY00172'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C16:0 16:1)'	0,0294046	1,04E-02	0,3537246
'R_rPY00173'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C16:0 16:1)'	0,0294046	1,04E-02	0,3537246
'R_rPY00174'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PG170cyc)'	0,0079322	2,81E-03	0,3543197
'R_rPY00175'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C18:0 18:1)'	5,50E-02	1,94E-02	0,3536223
'R_rPY00176'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C18:0 18:1)'	0,0549912	1,94E-02	0,3536223
'R_rPY00177'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PG190cyc)'	1,59E-02	5,61E-03	0,3539125
'R_rPY00180'	'S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme'	5,38E-03	1,91E-03	0,3547068
'R_rPY00182'	'Cyclopropanation Cardiolipin(n-C19:0cyc)'	0,0097943	3,47E-03	0,3541648
'R_rPY00183'	'Cardiolipin synthase (n-C18:0 18:1)'	0,0195786	6,93E-03	0,3538349
'R_rPY00184'	'Cardiolipin synthase (n-C16:0 16:1)'	1,07E-02	3,81E-03	0,3541063
'R_rxn00029'	'porphobilinogen synthase'	4,01E-03	1,42E-03	0,3551169
'R_rxn00060'	'hydroxymethylbilane synthase'	1,01E-03	3,64E-04	0,3599057
'R_rxn00117'	'nucleoside-diphosphate kinase (ATP:UDP)'	7,6236522	1,44E+00	0,188815
'R_rxn00119'	'UMP kinase'	3,28E+00	1,16E+00	0,3535067
'R_rxn00126'	'methionine adenosyltransferase'	8,58E-02	3,03E-02	0,3535801
'R_rxn00141'	'adenosylhomocysteinase'	3,01E-03	1,07E-03	0,3556525
'R_rxn00193'	'glutamate racemase'	0,53368	1,89E-01	0,3535168
'R_rxn00213'	'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06
'R_rxn00239'	'guanylate kinase (GMP:ATP)'	0,31381	1,11E-01	0,3535253
'R_rxn00293'	'UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase'	1,57781	5,58E-01	0,3535088
'R_rxn00299'	'GTP cyclohydrolase I'	0,00101	3,64E-04	0,3599057
'R_rxn00364'	'cytidylate kinase (CMP)'	0,2699744	9,54E-02	0,3535287
'R_rxn00374'	'formamidase'	3,5569136	1,00E-05	2,811E-06
'R_rxn00461'	'UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn00555'	'glutamine-fructose-6-phosphate transaminase'	1,57781	0,5577697	0,3535088



'R_rxn00602'	'methylmalonyl-CoA mutase'	8,81813	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn00615'	'glycerol kinase'	10,273226	0,0965932	0,0094024
'R_rxn00676'	'acetyl-CoA C-acyltransferase (2-Methyl-3-acetoacetyl-CoA)'	-8,81811	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn00686'	'dihydrofolate reductase (irreversible)'	-0,16213	-0,0573073	0,3534648
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-7,4259244	-7,84E-05	1,055E-05
'R_rxn00710'	'orotidine-5"-phosphate decarboxylase'	3,49232	1,234558	0,3535066
'R_rxn00777'	'ribose-5-phosphate isomerase'	-5,2562691	-2,688635	0,5115101
'R_rxn00791'	'anthranilate phosphoribosyltransferase'	0,55548	0,1963713	0,3535163
'R_rxn00834'	'IMP dehydrogenase'	2,29931	0,8128234	0,3535075
'R_rxn00851'	'D-AlanineD-Alanine ligase (ADP-forming)'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn00917'	'GMP synthase (glutamine-hydrolysing)'	2,29931	0,8128234	0,3535075
'R_rxn01018'	'aspartate carbamoyltransferase'	3,49232	1,23E+00	0,3535066
'R_rxn01116'	'ribulose 5-phosphate 3-epimerase'	-5,2562691	-2,69E+00	0,5115101
'R_rxn01127'	'deoxyadenylate kinase'	-0,16113	-5,70E-02	0,3534646
'R_rxn01200'	'transketolase'	2,3494145	1,00E-05	4,256E-06
'R_rxn01219'	'cytidylate kinase (dCMP)'	-0,31279	-0,1105663	0,353484
'R_rxn01255'	'chorismate synthase'	0,55748	2,688655	4,8228725
'R_rxn01257'	'4-amino-4-deoxychorismate synthase'	0,00101	3,64E-04	0,3599057
'R_rxn01332'	'3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase'	0,55748	2,69E+00	4,8228725
'R_rxn01333'	'transaldolase'	-2,3493945	1,00E-05	4,256E-06
'R_rxn01355'	'Propionyl-CoA carboxylase'	8,81813	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn01362'	'orotate phosphoribosyltransferase'	-3,4923	-1,23E+00	0,3535029
'R_rxn01465'	'dihydroorotase'	-3,4923	-1,23E+00	0,3535029
'R_rxn01466'	'geranyltranstransferase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn01485'	'phosphoglucosamine mutase'	-1,57779	-0,5577497	0,3535006
'R_rxn01509'	'deoxyguanylate kinase (dGMP:ATP)'	-0,31279	-0,1105663	0,353484
'R_rxn01520'	'thymidylate synthase'	0,16115	0,0569737	0,3535448
'R_rxn01575'	'isoleucine transaminase'	8,81813	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn01603'	'dihydrofolate synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn01629'	'glutamate-1-semialdehyde aminotransferase'	-0,00799	-0,002818	0,3526956
'R_rxn01639'	'formimidoylglutamase'	3,5569136	1,00E-05	2,811E-06
'R_rxn01642'	'imidazolonepropionase'	3,5569136	1,00E-05	2,811E-06
'R_rxn01675'	'glucose-1-phosphate thymidyltransferase'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06
'R_rxn01739'	'shikimate kinase'	0,55748	2,688655	4,8228725
'R_rxn01740'	'shikimate dehydrogenase'	-0,55746	-2,688635	4,8230097
'R_rxn01964'	'tryptophan synthase (indoleglycerol phosphate)'	0,55548	0,1963713	0,3535163
'R_rxn01996'	'methylmalonyl-CoA epimerase'	-8,81811	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn01997'	'dTDPglucose 4,6-dehydratase'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06
'R_rxn02000'	'dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06
'R_rxn02003'	'dTDP-4-dehydrorhamnose reductase'	-3,7128322	1,00E-05	2,693E-06
'R_rxn02008'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn02011'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate synthetase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn02085'	'urocanase'	-3,5568936	1,00E-05	2,811E-06
'R_rxn02201'	'dihydropteroate synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02212'	'3-dehydroquinate synthase'	0,55748	2,688655	4,8228725

'R_rxn02213'	'3-dehydroquinate dehydratase'	0,55748	2,688655	4,8228725
'R_rxn02264'	'uroporphyrinogen-III synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02268'	'acyl-CoA dehydrogenase (2-methylbutnoyl-CoA)'	4,40907	1,00E-05	2,268E-06
'R_rxn02271'	'S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide'	-8,81811	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn02285'	'UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase'	-0,53366	-0,1886449	0,3534926
'R_rxn02286'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine synthetase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn02288'	'uroporphyrinogen decarboxylase (uroporphyrinogen III)'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02303'	'coproporphyrinogen oxidase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02476'	'3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase'	0,55748	2,688655	4,8228725
'R_rxn02503'	'2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine diphosphokinase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02504'	'dihydroneopterin aldolase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn02507'	'indole-3-glycerol-phosphate synthase'	0,55548	0,1963713	0,3535163
'R_rxn02508'	'phosphoribosylanthranilate isomerase'	0,55548	0,1963713	0,3535163
'R_rxn02933'	'3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (2-Methylacetoacetyl-CoA)'	8,81813	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn02934'	'2-Methylprop-2-enoyl-CoA (2-Methylbut-2-enoyl-CoA)'	-8,81811	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn02950'	'3-Methyl-2-oxopentanoate:lipoamide oxidoreductase(decarboxylating and acceptor-2-methylpropanoylating)'	8,81813	1,00E-05	1,134E-06
'R_rxn03164'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn03167'	'alkaline phosphatase (Dihydroneopterin)'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn03408'	'UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn03638'	'glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase'	1,57781	0,5577697	0,3535088
'R_rxn03841'	'4-aminobenzoate synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn03901'	'undecaprenyl-diphosphatase'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn03904'	'phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (meso-2,6-diaminopimelate)'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn03907'	'2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase'	0,00901	0,0031915	0,3542222
'R_rxn03908'	'4-(cytidine 5"-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase'	0,00901	0,0031915	0,3542222
'R_rxn03909'	'1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase'	0,00901	0,0031915	0,3542222
'R_rxn03910'	'2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase'	0,00901	0,0031915	0,3542222
'R_rxn03958'	'1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase'	-0,00899	-0,0031715	0,3527856
'R_rxn05003'	'3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn05028'	'Solanesyl diphosphate synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn05034'	'4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase'	0,00101	0,0003635	0,3599057

'R_rxn05242'	'L-valine transport in via proton symport'	2,57961	1,00E-05	3,877E-06
'R_rxn05289'	'thioredoxin reductase (NADPH)'	0,94789	0,33509	0,3535115
'R_rxn05293'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase'	0,00901	0,0031915	0,3542222
'R_rxn05300'	'L-threonine symport'	10,00001	1,00E-05	1E-06
'R_rxn05307'	'L-Serine transport via ABC system'	10,00001	1,00E-05	1E-06
'R_rxn05470'	'Glycolate permease'	-0,00099	-0,0003435	0,3469745
'R_rxn05581'	'glycerol transport in/out via diffusion reversible'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_rxn06591'	'glutamyl-tRNA reductase'	0,00801	0,002838	0,3543118
'R_rxn06937'	'Glutamyl-tRNA synthetase'	0,00801	0,002838	0,3543118
'R_rxn07980'	'3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase (n-C18:1)'	2,1558942	0,7621252	0,3535077
'R_rxn07993'	'3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (n-C18:1)'	2,1558942	0,7621252	0,3535077
'R_rxn08002'	'3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (n-C18:1)'	2,1558942	0,7621252	0,3535077
'R_rxn08087'	'1-hexadec-7-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase (n-C161)'	0,32416	0,1145986	0,3535247
'R_rxn08089'	'1-octadec-7-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase (n-C181)'	1,03534	0,366004	0,353511
'R_rxn08229'	'Cardiolipin synthase (n-C16:0)'	0,078601	0,0277923	0,353587
'R_rxn08230'	'Cardiolipin synthase (n-C16:1)'	0,041659	0,0147331	0,3536599
'R_rxn08231'	'Cardiolipin synthase (n-C18:0)'	0,0037915	0,0013468	0,3552098
'R_rxn08232'	'Cardiolipin synthase (n-C18:1)'	0,1189	0,0420382	0,3535591
'R_rxn08309'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C160)'	0,761002	0,2690243	0,3535132
'R_rxn08310'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C161)'	0,32416	0,1145986	0,3535247
'R_rxn08311'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C180)'	0,0324816	0,0114889	0,3537037
'R_rxn08312'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C181)'	1,03534	0,366004	0,353511
'R_rxn08352'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn08398'	'enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) (n-C18:1)'	2,1558942	0,7621252	0,3535077
'R_rxn08550'	'glycerol-3-phosphate acyltransferase (C161)'	0,32416	0,1145986	0,3535247
'R_rxn08552'	'glycerol-3-phosphate acyltransferase (C181)'	1,03534	0,366004	0,353511
'R_rxn08756'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase'	0,00801	0,002838	0,3543118
'R_rxn09037'	'Octaprenyl pyrophosphate synthase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn09104'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C160)'	0,282762	0,0999642	0,3535276
'R_rxn09105'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C161)'	0,12129	0,0428831	0,353558
'R_rxn09106'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C180)'	0,0117896	0,0041741	0,3540531
'R_rxn09107'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C181)'	0,35336	0,1249209	0,353523
'R_rxn09111'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C160)'	0,282762	0,0999642	0,3535276
'R_rxn09112'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C161)'	0,12129	0,0428831	0,353558
'R_rxn09113'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C180)'	0,0117896	0,0041741	0,3540531
'R_rxn09114'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C181)'	0,35336	0,1249209	0,353523
'R_rxn09200'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C160)'	0,47825	0,1690701	0,3535182
'R_rxn09201'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C161)'	0,20288	0,0717255	0,3535366

'R_rxn09202'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C180)'	0,020702	0,0073247	0,353817
'R_rxn09203'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C181)'	0,68199	0,2410931	0,3535142
'R_rxn09208'	'Phosphatidylserine syntase (n-C160)'	0,47825	0,1690701	0,3535182
'R_rxn09209'	'Phosphatidylserine syntase (n-C161)'	0,20288	0,0717255	0,3535366
'R_rxn09210'	'Phosphatidylserine syntase (n-C180)'	0,020702	0,0073247	0,353817
'R_rxn09211'	'Phosphatidylserine syntase (n-C181)'	0,68199	0,2410931	0,3535142
'R_rxn10199'	'Peptidoglycan subunit synthesis'	0,53368	0,1886649	0,3535168
'R_rxn12218'	'Heme B synthesis reaction'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn12879'	'2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn12880'	'5-demethoxyubiquinol hydroxylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn12892'	'2-polyprenyl-6-hydroxyphenol methylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn13044'	'nonaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn13107'	'2-Nonaprenylphenol hydroxylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn13108'	'2-nonaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn13826'	'dimethylallyltransferase'	0,00101	0,0003635	0,3599057
'R_rxn13874'	'pseudomonas Lipid A disaccharide synthase'	0,25524	0,090235	0,35353
'R_rxn13880'	'Pseudomonas Tetraacyldisaccharide 4''kinase'	0,25524	0,090235	0,35353
'R_rxn13881'	'Pseudomonas UDP-3-O-(acyl)glucosamine acyltransferase'	0,51047	0,18046	0,3535174
'R_rxn13882'	'acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase'	0,51047	0,18046	0,3535174
'R_rxn13883'	'UDP-3-O-acyl N-acetylglucosamine deacetylase'	0,51047	0,18046	0,3535174
'R_rxn13884'	'UDP-diacyl-GlcN pyrophosphatase'	0,25524	0,090235	0,35353
'XX1'	'Psl release'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06
'XX3'	'Psl synthesis operon'	3,7128522	1,00E-05	2,693E-06

**S11.** Tabella con le **256** reazioni che cambiano tra **M** e **MA**: da sinistra verso destra nelle colonne è riportato il codice univoco della reazione all'interno del modello iPae1146N, il nome della reazione, il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_M$ ), il valore predetto per ciascuna reazione con FBA nel mutante ( $fFBA_{MA}$ ) e il valore assoluto del rapporto tra i valori predetti con FBA  $|fFBA_{MA} / fFBA_M|$ .

Codice Reazione	Nome Reazione	$fFBA_M$	$fFBA_{MA}$	$ fFBA_{MA} / fFBA_M $
'R_EX_cpd00009(e)'	'EX Phosphate e'	2,59E+00	4,01E+00	1,548503
'R_EX_cpd00021(e)'	'EX Fe2+ e'	-0,0006106	-9,51E-04	1,5574889
'R_EX_cpd00027(e)'	'EX D-Glucose e'	1,00E-05	-1,00E+01	999999

'R_EX_cpd00039(e)'	'EX L-Lysine e'	-0,6641031	-1,03E+00	1,5485134
'R_EX_cpd00051(e)'	'EX L-Arginine e'	-1,00E+01	1,00E-05	1E-06
'R_EX_cpd00054(e)'	'EX L-Serine e'	1,00E-05	-1,00E+01	999999
'R_EX_cpd00060(e)'	'EX L-Methionine e'	-0,5204665	-8,06E-01	1,5485157
'R_EX_cpd00073(e)'	'EX Urea e'	2,62E+01	7,59E+00	0,2901018
'R_EX_cpd00084(e)'	'EX L-Cysteine e'	-0,2328329	-3,61E-01	1,5485287
'R_EX_cpd00107(e)'	'EX L-Leucine e'	-2,88E+00	-1,00E+01	3,4675544
'R_EX_cpd00139(e)'	'EX Glycolate'	0,0006306	9,71E-04	1,5398063
'R_EX_cpd00156(e)'	'EX L-Valine e'	1,00E-05	-2,48E+00	247879,35
'R_EX_cpd00161(e)'	'EX L-Threonine e'	1,00E-05	-1,00E+01	999999
'R_EX_cpd00322(e)'	'EX L-Isoleucine e'	-0,9662491	-1,00E+01	10,349288
'R_PAO1_Biomass'	'Pseudomonas biomass'	6,2055143	9,61E+00	1,5485043
'R_rAB00001'	'glycoaldehyde:NAD+ oxidoreductase'	0,0006306	9,71E-04	1,5398063
'R_rPY00162'	'PA160161S'	0,0266916	4,13E-02	1,5482996
'R_rPY00163'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C16:0 16:1)'	0,0266916	4,13E-02	1,5482996
'R_rPY00164'	'Phosphatidylserine syntase (n-C16:0 16:1)'	0,0084507	1,31E-02	1,5478561
'R_rPY00165'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C16:0 16:1)'	0,0084507	1,31E-02	1,5478561
'R_rPY00166'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PE170cyc)'	8,45E-03	1,31E-02	1,5478561
'R_rPY00167'	'PA180181S'	0,0528959	8,19E-02	1,5484014
'R_rPY00168'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C18:0 18:1)'	5,29E-02	8,19E-02	1,5484014
'R_rPY00169'	'Phosphatidylserine syntase (n-C18:0 18:1)'	1,88E-02	2,91E-02	1,548213
'R_rPY00170'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C18:0 18:1)'	0,0187773	2,91E-02	1,548213
'R_rPY00171'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PE190cyc)'	0,0187773	2,91E-02	1,548213
'R_rPY00172'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C16:0 16:1)'	1,83E-02	2,83E-02	1,5482046
'R_rPY00173'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C16:0 16:1)'	1,83E-02	2,83E-02	1,5482046
'R_rPY00174'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PG170cyc)'	4,93E-03	7,62E-03	1,5473917
'R_rPY00175'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C18:0 18:1)'	0,0341286	5,28E-02	1,5483444
'R_rPY00176'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C18:0 18:1)'	3,41E-02	5,28E-02	1,5483444
'R_rPY00177'	'S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (PG190cyc)'	9,84E-03	1,52E-02	1,5479478
'R_rPY00180'	'S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme'	3,34E-03	5,17E-03	1,5468635
'R_rPY00182'	'Cyclopropanation Cardiolipin(n-C19:0cyc)'	0,0060817	9,41E-03	1,5476032
'R_rPY00183'	'Cardiolipin synthase (n-C18:0 18:1)'	0,0121533	1,88E-02	1,5480538
'R_rPY00184'	'Cardiolipin synthase (n-C16:0 16:1)'	0,0066724	1,03E-02	1,5476831
'R_rxn00003'	'acetolactate synthase (Also catalyzes ACHBS)'	-1,6007619	1,00E-05	6,247E-06
'R_rxn00014'	'cytochrome-c peroxidase'	2,1671645	1,00E-05	4,614E-06

'R_rxn00029'	'porphobilinogen synthase'	0,0024922	3,85E-03	1,5463043
'R_rxn00060'	'hydroxymethylbilane synthase'	0,0006306	9,71E-04	1,5398063
'R_rxn00117'	'nucleoside-diphosphate kinase (ATP:UDP)'	2,5268541	3,9128411	1,548503
'R_rxn00119'	'UMP kinase'	2,0373019	3,154767	1,5485024
'R_rxn00124'	'pyridoxal kinase (Pyridoxal)'	-1,0835672	1,00E-05	9,229E-06
'R_rxn00126'	'methionine adenosyltransferase'	0,0532306	0,0824224	1,5484021
'R_rxn00141'	'adenosylhomocysteinase'	0,0018717	2,89E-03	1,5455745
'R_rxn00193'	'glutamate racemase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn00199'	'OxalosuccinateNADP+ oxidoreductase (decarboxylating)'	-20,790234	-5,74E+00	0,2760255
'R_rxn00239'	'guanylate kinase (GMP:ATP)'	0,1947387	0,3015484	1,548477
'R_rxn00256'	'citrate synthase'	20,790254	5,7386548	0,2760262
'R_rxn00293'	'UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase'	0,9791145	1,5161583	1,5484995
'R_rxn00299'	'GTP cyclohydrolase I'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn00364'	'cytidylate kinase (CMP)'	0,1675365	0,2594257	1,5484724
'R_rxn00371'	'formate dehydrogenase'	-2,2072281	1,00E-05	4,531E-06
'R_rxn00416'	'asparagine synthase (glutamine-hydrolysing)'	0,6114694	0,946858	1,5484962
'R_rxn00461'	'UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase'	0,3311791	5,13E-01	1,5484886
'R_rxn00555'	'glutamine-fructose-6-phosphate transaminase'	0,9791145	1,52E+00	1,5484995
'R_rxn00602'	'methylmalonyl-CoA mutase'	1,00E-05	8,50E+00	850375,29
'R_rxn00676'	'acetyl-CoA C-acyltransferase (2-Methyl-3-acetoacetyl-CoA)'	1,00E-05	-8,5037329	850373,29
'R_rxn00686'	'dihydrofolate reductase (irreversible)'	-0,100606	-0,1557945	1,5485597
'R_rxn00693'	'methionine synthase'	0,0018717	2,89E-03	1,5455745
'R_rxn00704'	'phosphoglucomutase'	-0,0001451	-2,30E-04	1,5862972
'R_rxn00710'	'orotidine-5''-phosphate decarboxylase'	2,1671645	3,36E+00	1,5485026
'R_rxn00727'	'anthranilate synthase'	0,3447071	5,34E-01	1,5484892
'R_rxn00770'	'phosphoribosylpyrophosphate synthetase'	5,2221303	8,09E+00	1,5485041
'R_rxn00785'	'transketolase'	5,2221303	3,0526281	0,5845561
'R_rxn00789'	'ATP phosphoribosyltransferase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn00790'	'glutamine phosphoribosyldiphosphate amidotransferase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn00791'	'anthranilate phosphoribosyltransferase'	0,3447071	0,5337753	1,5484892
'R_rxn00800'	'adenylsuccinate lyase'	1,283447	1,99E+00	1,5485009
'R_rxn00802'	'argininosuccinate lyase'	17,929938	10,326381	0,5759295
'R_rxn00832'	'IMP cyclohydrolase'	-2,7102587	-4,1968549	1,5485072
'R_rxn00834'	'IMP dehydrogenase'	1,4268416	2,21E+00	1,5485013
'R_rxn00838'	'adenylosuccinate synthetase'	1,283447	1,99E+00	1,5485009
'R_rxn00851'	'D-AlanineD-Alanine ligase (ADP-forming)'	0,3311791	5,13E-01	1,5484886
'R_rxn00859'	'histidinol dehydrogenase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn00898'	'dihydroxy-acid dehydratase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)'	1,6007819	1,00E-05	6,247E-06
'R_rxn00907'	'methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP)'	2,7102787	7,6147944	2,8095983

'R_rxn00917'	'GMP synthase (glutamine-hydrolysing)'	1,4268416	2,21E+00	1,5485013
'R_rxn00966'	'chorismate pyruvate lyase'	0,0006306	9,71E-04	1,5398063
'R_rxn00991'	'hydroxymethylglutaryl-CoA lyase'	1,00E-05	5,53E+00	553430,08
'R_rxn00993'	'fumarylacetoacetase'	9,7278746	1,00E-05	1,028E-06
'R_rxn01018'	'aspartate carbamoyltransferase'	2,1671645	3,3558598	1,5485026
'R_rxn01019'	'ornithine carbamoyltransferase'	17,929938	10,326381	0,5759295
'R_rxn01127'	'deoxyadenylate kinase'	-0,0999855	-0,1548335	1,54856
'R_rxn01200'	'transketolase'	1,00E-05	2,516941	251694,1
'R_rxn01211'	'methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase'	2,7102787	7,6147944	2,8095983
'R_rxn01219'	'cytidylate kinase (dCMP)'	-0,1940982	-0,3005675	1,5485334
'R_rxn01241'	'pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide dehydrogenase)'	1,00E-05	1,40E+01	1403804,4
'R_rxn01245'	'3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring).'	1,00E-05	5,53E+00	553430,08
'R_rxn01255'	'chorismate synthase'	5,2221303	0,5356972	0,1025821
'R_rxn01257'	'4-amino-4-deoxychorismate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn01332'	'3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase'	5,2221303	0,5356972	0,1025821
'R_rxn01333'	'transaldolase'	1,00E-05	-2,516921	251692,1
'R_rxn01355'	'Propionyl-CoA carboxylase'	1,00E-05	8,5037529	850375,29
'R_rxn01362'	'orotate phosphoribosyltransferase'	-2,1671445	-3,3558398	1,5485077
'R_rxn01387'	'IsocitrateNADP+ oxidoreductase (decarboxylating)'	-20,790234	-5,7386348	0,2760255
'R_rxn01434'	'argininosuccinate synthase'	17,929938	10,326381	0,5759295
'R_rxn01465'	'dihydroorotase'	-2,1671445	-3,3558398	1,5485077
'R_rxn01466'	'geranyltranstransferase'	0,0006306	9,71E-04	1,5398063
'R_rxn01485'	'phosphoglucosamine mutase'	-0,9790945	-1,52E+00	1,5485107
'R_rxn01504'	'methylglutaconyl-CoA hydratase'	1,00E-05	-5,53E+00	553428,08
'R_rxn01509'	'deoxyguanylate kinase (dGMP:ATP)'	-0,1940982	-0,3005675	1,5485334
'R_rxn01517'	'uridylate kinase (dUMP)'	-0,0999855	-0,1548335	1,54856
'R_rxn01520'	'thymidylate synthase'	0,1000055	0,1548535	1,5484503
'R_rxn01575'	'isoleucine transaminase'	1,00E-05	8,5037529	850375,29
'R_rxn01603'	'dihydrofolate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn01629'	'glutamate-1-semialdehyde aminotransferase'	-0,0049544	-0,0076774	1,5496122
'R_rxn01644'	'dihydrodipicolinate synthase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn01739'	'shikimate kinase'	5,2221303	0,5356972	0,1025821
'R_rxn01740'	'shikimate dehydrogenase'	-5,2221103	-0,5356772	0,1025787
'R_rxn01807'	'pyridoxal kinase (Pyridoxamine)'	1,0835872	1,00E-05	9,229E-06
'R_rxn01825'	'homogentisate 1,2-dioxygenase'	9,7278746	1,00E-05	1,028E-06
'R_rxn01827'	'4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase'	9,7278746	1,00E-05	1,028E-06
'R_rxn01964'	'tryptophan synthase (indoleglycerol phosphate)'	0,3447071	0,5337753	1,5484892
'R_rxn01973'	'succinyl-diaminopimelate desuccinylase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn01974'	'diaminopimelate epimerase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn01996'	'methylmalonyl-CoA epimerase'	1,00E-05	-8,50E+00	850373,29
'R_rxn02008'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886

'R_rxn02011'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate synthetase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn02160'	'histidinol-phosphatase'	0,50242	7,78E-01	1,5484942
'R_rxn02186'	'acetohydroxy acid isomeroreductase'	1,6007819	1,00E-05	6,247E-06
'R_rxn02201'	'dihydropteroate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02212'	'3-dehydroquinate synthase'	5,2221303	5,36E-01	0,1025821
'R_rxn02213'	'3-dehydroquinate dehydratase'	5,2221303	0,5356972	0,1025821
'R_rxn02264'	'uroporphyrinogen-III synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02268'	'acyl-CoA dehydrogenase (2-methylbutenyl-CoA)'	1,00E-05	4,2518814	425188,14
'R_rxn02271'	'S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide'	1,00E-05	-8,5037329	850373,29
'R_rxn02276'	'maleylacetoacetate isomerase'	9,7278746	1,00E-05	1,028E-06
'R_rxn02285'	'UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase'	-0,3311591	-0,5128071	1,5485217
'R_rxn02286'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine synthetase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn02288'	'uroporphyrinogen decarboxylase (uroporphyrinogen III)'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02303'	'coproporphyrinogen oxidase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02320'	'histidinol-phosphate transaminase'	-0,5024	-0,7779745	1,5485161
'R_rxn02473'	'imidazoleglycerol-phosphate dehydratase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn02476'	'3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase'	5,2221303	0,5356972	0,1025821
'R_rxn02503'	'2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02504'	'dihydroneopterin aldolase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn02507'	'indole-3-glycerol-phosphate synthase'	0,3447071	0,5337753	1,5484892
'R_rxn02508'	'phosphoribosylanthranilate isomerase'	0,3447071	0,5337753	1,5484892
'R_rxn02834'	'phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn02835'	'phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn02866'	'isovaleryl-coA dehydrogenase'	1,00E-05	5,5343008	553430,08
'R_rxn02867'	'S-(3-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide'	1,00E-05	-5,5342808	553428,08
'R_rxn02889'	'Methylcrotonoyl-CoA carboxylase'	1,00E-05	5,5343008	553430,08
'R_rxn02895'	'phosphoribosylglycinamide synthase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn02929'	'dihydrodipicolinate reductase (NADPH)'	-0,3311591	-0,5128071	1,5485217
'R_rxn02933'	'3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (2-Methylacetoacetyl-CoA)'	1,00E-05	8,5037529	850375,29
'R_rxn02934'	'2-Methylprop-2-enoyl-CoA (2-Methylbut-2-enoyl-CoA)'	1,00E-05	-8,5037329	850373,29
'R_rxn02937'	'phosphoribosylaminoimidazole synthetase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn02950'	'3-Methyl-2-oxopentanoate:lipoamide oxidoreductase(decarboxylating and acceptor-2-methylpropanoylating)'	1,00E-05	8,5037529	850375,29



'R_rxn03031'	'tetrahydropicolinate succinylase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn03084'	'phosphoribosylformylglycinamidine synthase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn03087'	'succinyldiaminopimelate transaminase'	-0,3311591	-0,5128071	1,5485217
'R_rxn03135'	'imidazole-glycerol-3-phosphate synthase'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn03136'	'adenylosuccinate lyase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn03137'	'phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase'	2,7102787	4,1968749	1,5485031
'R_rxn03147'	'phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase'	2,2078686	3,4188904	1,5485027
'R_rxn03164'	'UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn03167'	'alkaline phosphatase (Dihydroneopterin)'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn03175'	'1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase (irreversible)'	0,50242	0,7779945	1,5484942
'R_rxn03408'	'UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn03638'	'glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase'	0,9791145	1,5161583	1,5484995
'R_rxn03841'	'4-aminobenzoate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn03901'	'undecaprenyl-diphosphatase'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn03904'	'phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (meso-2,6-diaminopimelate)'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn03907'	'2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase'	0,005595	0,0086583	1,5475248
'R_rxn03908'	'4-(cytidine 5"-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase'	0,005595	0,0086583	1,5475248
'R_rxn03909'	'1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase'	0,005595	0,0086583	1,5475248
'R_rxn03910'	'2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase'	0,005595	0,0086583	1,5475248
'R_rxn03958'	'1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase'	-0,005575	-0,0086383	1,549489
'R_rxn04954'	'5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADH)'	-0,0018517	-0,0028728	1,5514674
'R_rxn05003'	'3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn05028'	'Solanesyl diphosphate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn05034'	'4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn05219'	'L-methionine transport via ABC system'	0,5204865	0,8059705	1,5484946
'R_rxn05237'	'L-cysteine transport via ABC system'	0,2328529	3,61E-01	1,5484816
'R_rxn05242'	'L-valine transport in via proton symport'	1,00E-05	2,48E+00	247881,35
'R_rxn05289'	'thioredoxin reductase (NADPH)'	0,5882173	0,9108521	1,5484958
'R_rxn05293'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase'	0,005595	0,0086583	1,5475248
'R_rxn05300'	'L-threonine symport'	1,00E-05	10,00001	1000001

'R_rxn05307'	'L-Serine transport via ABC system'	1,00E-05	10,00001	1000001
'R_rxn05329'	'(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier-protein] hydro-lyase'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05330'	'(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier-protein] hydro-lyase'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05331'	'(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier-protein] hydro-lyase'	3,1479313	4,8745823	1,5485034
'R_rxn05333'	'(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier-protein] hydro-lyase'	3,4646974	5,3650963	1,5485036
'R_rxn05334'	'((3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier-protein] hydro-lyase'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05336'	'(3R)-3-Hydroxypalmitoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-2,8311451	-4,3840482	1,5485071
'R_rxn05337'	'(3R)-3-Hydroxyhexanoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-3,7814436	-5,8555904	1,5485066
'R_rxn05338'	'(3R)-3-Hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-3,7814436	-5,8555904	1,5485066
'R_rxn05339'	'(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier protein]:NADP+ oxidoreductase'	-3,7814436	-5,8555904	1,5485066
'R_rxn05340'	'(3R)-3-Hydroxydodecanoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-3,4646774	-5,3650763	1,5485067
'R_rxn05341'	'(3R)-3-Hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-3,7814436	-5,8555904	1,5485066
'R_rxn05342'	'(3R)-3-Hydroxytetradecanoyl-[acyl-carrier-protein]:NADP+ oxidoreductase'	-2,8311451	-4,3840482	1,5485071
'R_rxn05343'	'Octanoyl-[acyl-carrier protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein] C-acyltransferase (decarboxylating)'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05344'	'Tetradecanoyl-[acyl-carrier-protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein] C-acyltransferase'	2,8311651	4,3840682	1,5485032
'R_rxn05345'	'Dodecanoyl-[acyl-carrier-protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein] C-acyltransferase'	2,8311651	4,3840682	1,5485032
'R_rxn05346'	'Butyryl-[acyl-carrier protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein]C-acyltransferase (decarboxylating)'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05348'	'Decanoyl-[acyl-carrier protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein] C-acyltransferase'	3,4646974	5,3650963	1,5485036
'R_rxn05350'	'Hexanoyl-[acyl-carrier protein]:malonyl-[acyl-carrier-protein] C-acyltransferase'	3,7814636	5,8556104	1,5485037
'R_rxn05470'	'Glycolate permease'	-0,0006106	-0,0009509	1,5574889
'R_rxn06591'	'glutamyl-tRNA reductase'	0,0049744	0,0076974	1,5474025
'R_rxn06937'	'Glutamyl-tRNA synthetase'	0,0049744	0,0076974	1,5474025
'R_rxn07980'	'3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase (n-C18:1)'	1,3378449	2,0716542	1,548501
'R_rxn07993'	'3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (n-C18:1)'	1,3378449	2,0716542	1,548501

'R_rxn08002'	'3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (n-C18:1)'	1,3378449	2,0716542	1,548501
'R_rxn08087'	'1-hexadec-7-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase (n-C161)'	0,2011614	0,311494	1,5484779
'R_rxn08089'	'1-octadec-7-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase (n-C181)'	0,6424845	0,994885	1,5484966
'R_rxn08229'	'Cardiolipin synthase (n-C16:0)'	0,0487797	0,0755301	1,5483927
'R_rxn08230'	'Cardiolipin synthase (n-C16:1)'	0,0258553	0,0400316	1,548293
'R_rxn08231'	'Cardiolipin synthase (n-C18:0)'	0,0023566	0,0036437	1,5461776
'R_rxn08232'	'Cardiolipin synthase (n-C18:1)'	0,0737872	0,1142544	1,5484308
'R_rxn08309'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C160)'	0,4722439	0,7312666	1,5484935
'R_rxn08310'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C161)'	0,2011614	0,311494	1,5484779
'R_rxn08311'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C180)'	0,0201603	0,0312128	1,5482331
'R_rxn08312'	'CDP-diacylglycerol synthetase (n-C181)'	0,6424845	0,994885	1,5484966
'R_rxn08352'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn08398'	'enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) (n-C18:1)'	1,3378449	2,0716542	1,548501
'R_rxn08550'	'glycerol-3-phosphate acyltransferase (C161)'	0,2011614	0,311494	1,5484779
'R_rxn08552'	'glycerol-3-phosphate acyltransferase (C181)'	0,6424845	0,994885	1,5484966
'R_rxn08756'	'4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase'	0,0049744	0,0076974	1,5474025
'R_rxn09037'	'Octaprenyl pyrophosphate synthase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn09104'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C160)'	0,1754719	0,2717136	1,5484739
'R_rxn09105'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C161)'	0,0752704	0,116551	1,5484323
'R_rxn09106'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C180)'	0,0073198	0,0113293	1,5477558
'R_rxn09107'	'phosphatidylglycerol phosphate phosphatase (n-C181)'	0,2192815	0,339553	1,5484801
'R_rxn09111'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C160)'	0,1754719	0,2717136	1,5484739
'R_rxn09112'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C161)'	0,0752704	0,116551	1,5484323
'R_rxn09113'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C180)'	0,0073198	0,0113293	1,5477558
'R_rxn09114'	'Phosphatidylglycerol synthase (n-C181)'	0,2192815	0,339553	1,5484801
'R_rxn09200'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C160)'	0,296782	0,459563	1,5484867
'R_rxn09201'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C161)'	0,1259011	0,194953	1,5484616
'R_rxn09202'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C180)'	0,0128504	0,0198935	1,5480783
'R_rxn09203'	'Phosphatidylserine decarboxylase (n-C181)'	0,423213	0,655342	1,5484922
'R_rxn09208'	'Phosphatidylserine syntase (n-C160)'	0,296782	0,459563	1,5484867

'R_rxn09209'	'Phosphatidylserine syntase (n-C161)'	0,1259011	0,194953	1,5484616
'R_rxn09210'	'Phosphatidylserine syntase (n-C180)'	0,0128504	0,0198935	1,5480783
'R_rxn09211'	'Phosphatidylserine syntase (n-C181)'	0,423213	0,655342	1,5484922
'R_rxn09566'	'pyridoxal oxidase'	1,0835872	1,00E-05	9,229E-06
'R_rxn10131'	'Arginine/ornithine antiporter'	10,00001	1,00E-05	1E-06
'R_rxn10182'	'putrescine/ornithine antiporter'	-9,99999	1,00E-05	1E-06
'R_rxn10199'	'Peptidoglycan subunit synthesis'	0,3311791	0,5128271	1,5484886
'R_rxn12218'	'Heme B synthesis reaction'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn12879'	'2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn12880'	'5-demethoxyubiquinol hydroxylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn12892'	'2-polyprenyl-6-hydroxyphenol methylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn13044'	'nonaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn13107'	'2-Nonaprenylphenol hydroxylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn13108'	'2-nonaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn13826'	'dimethylallyltranstransferase'	0,0006306	0,0009709	1,5398063
'R_rxn13874'	'pseudomonas Lipid A disaccharide synthase'	0,1583931	0,245267	1,5484705
'R_rxn13880'	'Pseudomonas Tetraacyldisaccharide 4"kinase'	0,1583931	0,245267	1,5484705
'R_rxn13881'	'Pseudomonas UDP-3-O-(acyl)glucosamine acyltransferase'	0,3167762	0,490524	1,5484878
'R_rxn13882'	'acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase'	0,3167762	0,490524	1,5484878
'R_rxn13883'	'UDP-3-O-acyl N-acetylglucosamine deacetylase'	0,3167762	0,490524	1,5484878
'R_rxn13884'	'UDP-diacyl-GlcN pyrophosphatase'	0,1583931	0,245267	1,5484705
'R_rxn13893'	'protoporphyrinogen oxidase anaerobic'	0,0006306	0,0009709	1,5398063