

3. RESULTATS

3.1 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE GENS PEL COMPLEX HHA-H-NS

Molts dels processos regulats per la proteïna H-NS requereixen també de la intervenció d'altres proteïnes (Liu i Richardson, 1993; Marykwas *et al.*, 1996; Kajitani i Ishihama, 1991; Nieto *et al.*, 2000). S'ha descrit que la família de proteïnes associades al nucleòide Hha/YmoA són capaces d'unir-se a la proteïna H-NS per tal de regular l'expressió d'algunes proteïnes. Un exemple és la repressió a baixa temperatura de l'operó *hly* pel complex Hha-H-NS (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002b). La proteïna YdgT és homòloga a Hha i està codificada també al cromosoma d'*Escherichia coli*. S'ha descrit que YdgT interacciona també amb H-NS (Paytubi *et al.*, 2004). Per aquest motiu s'han volgut identificar altres gens o operons potencialment regulats per aquests complexos, i també determinar si gens dels quals se sap que estan regulades per H-NS, podrien també estar regulats per Hha i/o YdgT.

3.1.1 REGULACIÓ DE L'OPERÓ *bgl* PEL COMPLEX HHA-H-NS

L'operó *bgl* d'*Escherichia coli* codifica les funcions necessàries d'internalització i utilització dels β -glucòsids aromàtics, arbutina i salicina. Aquest operó catabòlic és críptic quan es fa créixer *E.coli* en els medis de cultiu habituals (Schaeffler i Maas, 1967; Reynolds *et al.*, 1981). Tot i així, pot ser activat per diferents mutacions espontànies i, un cop activat, l'expressió de l'operó està regulada específicament per la presència de β -glucòsids i subjecte al control per catabòlit (Prasad i Schaeffler, 1974; Reynolds *et al.*, 1981; 1986). Recentment, Khan i Isaacson (1998) han determinat que podia ser possible que l'operó *bgl* pertanyi al conjunt de gens induïts *in vivo*, o sigui, en l'hoste. Tot i així, no se saben les raons per les quals aquest operó es manté críptic en condicions de laboratori i no en organismes hoste.

El silenciament i l'activació mutacional de l'operó *bgl* estan determinades en el seu promotor, en canvi la regulació específica de substrat està mitjançada per una antiterminació transcripcional específica. La proteïna H-NS és essencial pel silenciament de l'operó *bgl* (Defez i De Felice, 1981; Higgins *et al.*, 1988). H-NS reprimeix el promotor CRP depenent de l'operó *bgl* unint-se a una zona rica en AT (silenciador) localitzada just abans del lloc d'unió de la proteïna CRP (Schnetz, 1995;

Schnetz i Wang, 1996; Mukerji i Mahadevan, 1997), formant segurament un complex nucleoproteic que s'estén al llarg del promotor (Schnetz i Wang, 1996; Caramel i Schnetz, 1998). Les mutacions espontànies que causen l'activació de l'operó *bgl* inclouen mutacions en el gen *hns*, insercions de seqüències IS en el silenciador que hi ha abans del promotor i mutacions puntuals que milloren el lloc d'unió de la proteïna CRP (Defez i De Felice, 1981; Reynolds *et al.*, 1981; 1986; Schnetz i Rak, 1988; 1992; Lopilato i Wright, 1990; Singh *et al.*, 1995). Presumiblement aquestes mutacions activen l'operó impeding la formació del complex nucleoproteic (Schnetz i Wang, 1996; Caramel i Schnetz, 1998). A més del primer silenciador, n'hi ha un altre dins de la seqüència codificant del primer gen de l'operó (*bglG*), on també s'hi uneix H-NS causant una parada en l'elongació duta a terme per la RNA polimerasa. Per tant, H-NS silencia l'operó *bgl* a dos nivells. Tot i així, a part d'H-NS s'ha determinat que hi ha altres proteïnes que intervenen en el silenciament de l'operó *bgl*, com són les proteïnes FIS, RpoS, StpA, Hfq, LeuO i BglJ (Tsui *et al.*, 1994; Giel *et al.*, 1996; Free *et al.*, 1998; Ueguchi *et al.*, 1998; Ohta *et al.*, 1999).

L'element clau en la regulació específica de substrat és la proteïna antiterminadora BglG, codificada al primer gen de l'operó (Prasad i Schaefer, 1974; Mahadevan *et al.*, 1987; Mahadevan i Wright, 1987; Schnetz *et al.*, 1987; Schnetz i Rak, 1988). La proteïna BglG produeix una antiterminació a dos terminadors rho-independents localitzats a una seqüència "leader" de l'operó i a una zona intercistronica entre els gens *bglG* i *bglF* (Mahadevan i Wright, 1987; Schnetz *et al.*, 1987; Schnetz i Rak, 1988). L'activitat de BglG està regulada positivament i negativament (com s'explica a continuació) per fosforilacions reversibles en resposta a la disponibilitat de α -glucòsids i a l'estat catabòlic de la cèl·lula. En absència de α -glucòsids, la permeasa específica per α -glucòsids, enzimII^{Bgl} (codificat en el gen *bglF*), fosforila BglG i l'inactiva (Schnetz i Rak, 1988; 1990; Amster-Choder i Wright, 1990; 1992). En presència de α -glucòsids i en absència d'altres sucres dependents del sistema de transferència PTS, BglG és defosforilat per BglF, fosforilat per la proteïna HPr (en un lloc diferent d'on ho feia BglF) i com a conseqüència, activat (Görke i Rak, 1999). D'aquesta manera, BglG duu a terme l'antiterminació i s'expressa l'operó *bgl* (revisat a Amster-Choder, 2005). En la figura 3.1.1 hi ha un esquema de l'operó *bgl* on s'especifiquen els diferents gens i llocs descrits.

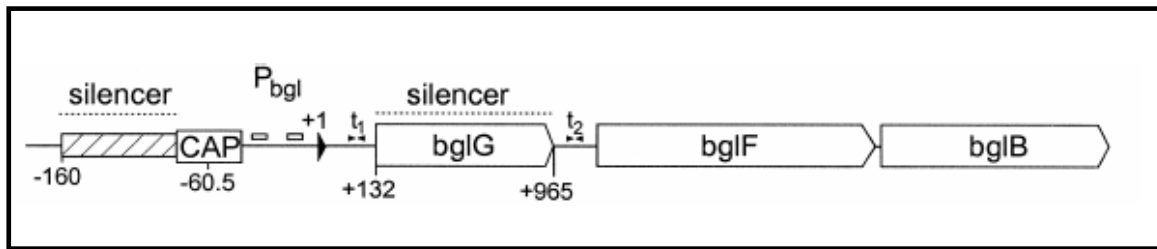


Figura 3.1.1 Esquema de l'operó *bgl*. Podem observar els tres gens que formen l'operó, el seu promotor amb les caixes -10 i -35, l'inici de transcripció (+1), la posició dels terminadors t1 i t2, el lloc d'unió de la proteïna CRP (CAP) i el dos silenciadors. Extret de Caramel i Schnetz, 2000.

L'objectiu d'aquest apartat era estudiar si les proteïnes Hha i YdgT intervien juntament amb H-NS en aquest silenciament. Es va determinar l'expressió de l'operó *bgl* en una col·lecció de soques isogèniques portadores de diferents mutacions afectant les proteïnes reguladores a estudiar. La mesura de l'expressió de l'operó es va realitzar utilitzant diferents aproximacions: mesura directa de l'activitat de l'enzim β -glucosidasa per fluorimetria; mesura de la transcripció mitjançant una fusió transcripcional del gen *bglG* amb el gen *lacZ*, en un plàsmid multicòpia i en un plàsmid de número de còpies mig; i valoració de la transcripció mitjançant la fusió transcripcional *bglG-lacZ* integrada al cromosoma.

3.1.1.1 Determinació de l'activitat β -glucosidasa per fluorimetria

Es va mesurar l'activitat de l'enzim β -glucosidasa de les soques d'*Escherichia coli* BSN26 (wt), BSN26H (*hha*), BSN27 (*hns*), BSN27H (*hha hns*), BSN26Y (*ydgT*) i BSN26HY (*hha ydgT*) per comprovar la influència de les proteïnes Hha i YdgT en l'expressió de l'operó *bgl*. Es va seguir el mètode descrit en l'apartat 2.8.7.3. L'activitat de l'enzim per les sis soques en les condicions estudiades es pot veure en la taula 3.1.1.1 i en la figura 3.1.1.1.

Taula 3.1.1.1 Activitat β -glucosidasa expressada en pmol MUF/min·g de les soques estudiades (promig de tres experiments) (SD: desviació estàndard).

Activitat β -glucosidasa		
		SD
BSN26	14,2	3,0
BSN26H	33,2	1,5
BSN27	471,2	95,7
BSN27H	679,3	76,1
BSN26Y	13,7	0,7
BSN26HY	33,5	8,0

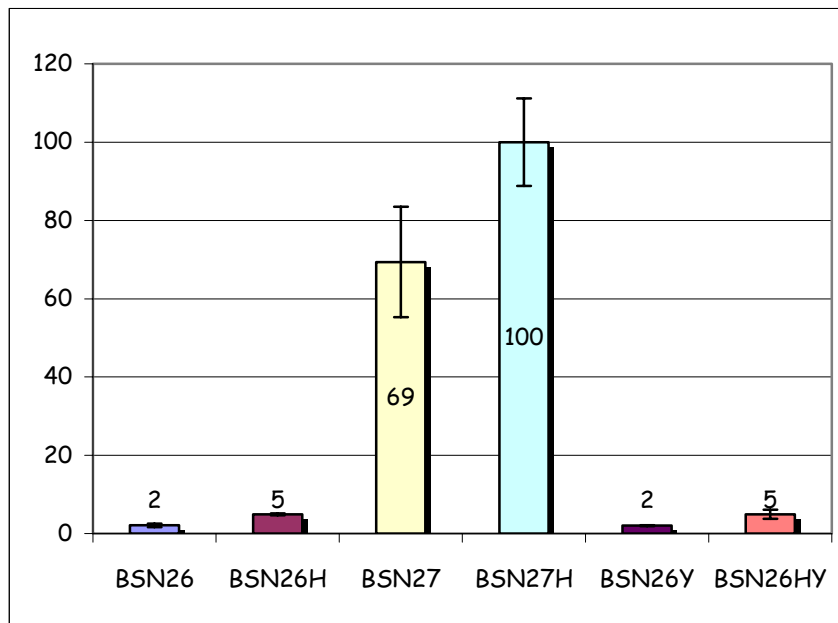


Figura 3.1.1.1 Percentatge de l'activitat de l'enzim β -glucosidasa de les sis soques estudiades. L'activitat β -glucosidasa de la soca BSN27H es va considerar amb un 100 % d'activitat.

Tal com era d'esperar, la mutació *hns* va causar una desrepressió de l'expressió de l'operó *bgl*. La mutació *hha* va provocar una lleugera desrepressió de l'operó *bgl*. En canvi quan es donava la suma de les mutacions *hha* i *hns* la desrepressió va ser

superior a la causada només per la mutació *hns*. La soca *ydgT* no presentava canvis en l'expressió de la β -glucosidasa respecte la soca parental, i la soca *ydgT hha* es comportava de forma equivalent a la soca *hha*.

3.1.1.2 Valoració de la transcripció de l'operó *bgl* mitjançant la fusió gènica *bglG-lacZ* clonada en un plàsmid multicòpia

Per tal d'estudiar el paper de les proteïnes Hha i YdgT sobre la transcripció de l'operó *bgl*, juntament amb la proteïna H-NS, es va utilitzar en primer lloc el plàsmid pFDY436.

El plàsmid pFDY436 és d'elevat número de còpies i té clonat el promotor de l'operó *bgl* seguit del primer gen de l'operó, el gen *bglG*, fusionat a 3' amb el gen *lacZ*. En aquest plàsmid l'expressió de l'enzim *lacZ* és constitutiva, o sigui, que no està subjecte a la regulació específica per β -glucòsids ja que el plàsmid no conté el gen *bglF*, que codifica el regulador negatiu enzim^{Bgl}. Per tant, en absència de β -glucòsids l'antiterminador BglG és actiu. El plàsmid pFDY436 conté totes les seqüències necessàries pel silenciament del promotor de *bgl*.

Es va mesurar l'activitat de l'enzim β -galactosidasa en les soques d'*Escherichia coli* BSN26 (wt), BSN26H (*hha*), BSN27 (*hns*), BSN27H (*hha hns*), BSN26Y (*ydgT*) i BSN26HY (*hha ydgT*) per comprovar la influència de les proteïnes Hha i YdgT juntament amb H-NS en l'expressió de l'operó *bgl*. Totes aquestes soques tenen l'operó *bgl* del cromosoma intacte, per tant, hi haurà també una petita expressió basal de *bglF* que inactivarà una petita part de l'antiterminador BglG expressat. L'activitat β -galactosidasa basal d'aquest plàsmid és baixa, com calia esperar per la presència de les seqüències silenciadores. En la figura 3.1.1.2 es mostra l'activitat β -galactosidasa determinada en cultius crescuts fins a DO de 600 nm de 0,8. En la soca mutant *hns* es van obtenir uns nivells elevats d'activitat β -galactosidasa, tal com ja ha estat descrit (Caramel i Schnetz, 1998).

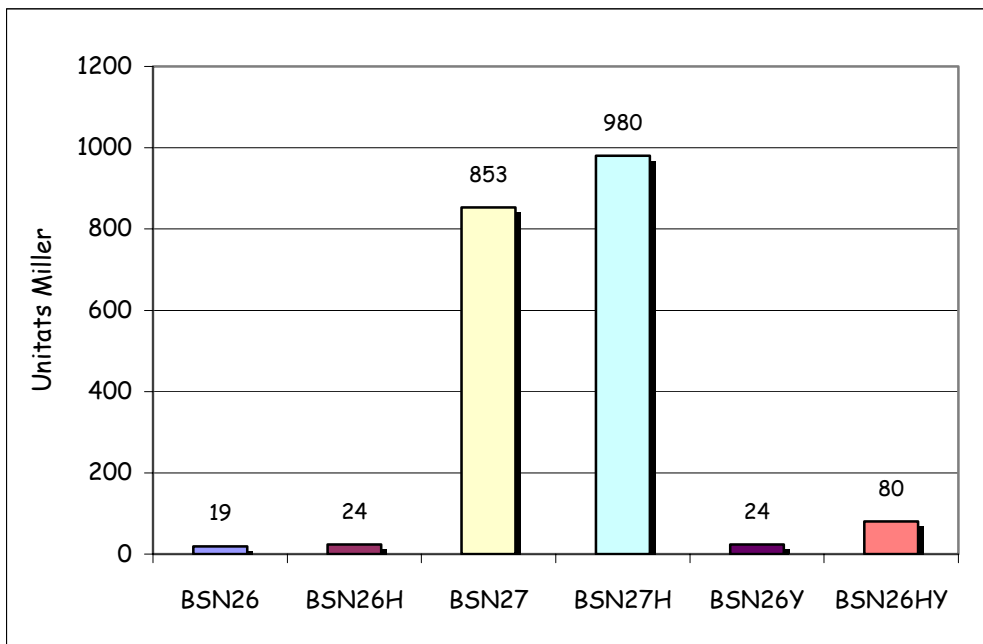


Figura 3.1.1.2 Activitat β -galactosidasa de les diferents soques estudiades portadores del plàsmid pFDY436.

Igual que en l'apartat anterior, la mutació *hha* només va tenir efectes quan es sumava a la mutació *hns* (BSN27H). La soca doble mutant *hha ydgT* (BSN26HY) va provocar també una lleugera desrepressió de l'operó, en un factor de quatre cops respecte la soca salvatge (BSN26).

3.1.2 PROTEÏNES REGULADES PEL COMPLEX HHA-HNS EN DIFERENTS CONDICIONS D'OSMOLARITAT

Una primera aproximació per determinar el paper en la regulació de l'expressió gènica duta a terme per les proteïnes Hha i H-NS va consistir en comprovar l'efecte de les mutacions *hha* i/o *hns* sobre el patró d'expressió proteic en diferents condicions d'osmolaritat.

3.1.2.1 Efecte de les mutacions *hha* i/o *hns* sobre el creixement en diferents condicions d'osmolaritat

Es va seguir el creixement de diferents soques mutants *hha* i/o *hns* en diferents condicions d'osmolaritat per tal de determinar si hi havia algun efecte d'aquestes mutacions. Es va fer un seguiment de la DO a 600 nm (DO_{600}) del cultius de les següents soques: BSN26 (wt), BSN26H (*hha*), BSN27 (*hns*) i BSN27H (*hha hns*) en medi LB, LB sense NaCl i LB amb 0,5 M de NaCl, a 37°C i en agitació (200 rpm). Les corbes de creixement resultants es poden veure a la figura 3.1.2.1. Com es pot observar, les mutacions *hns* i *hha* afecten lleugerament al creixement en medi LB i en medi LB amb 0,5 M de NaCl. En canvi, en medi LB sense sal (LB 0 M NaCl) la soca amb la doble mutació *hha hns* no va arribar a la DO_{600} de 0,1 en 6 h. Tot i així, en 24 h el cultiu de la soca BSN27H va arribar a DO_{600} de 1. Per tant, aquest fet suggereix que hi havia alguna adaptació que permetia a la soca BSN27H créixer a les condicions de medi sense sal.

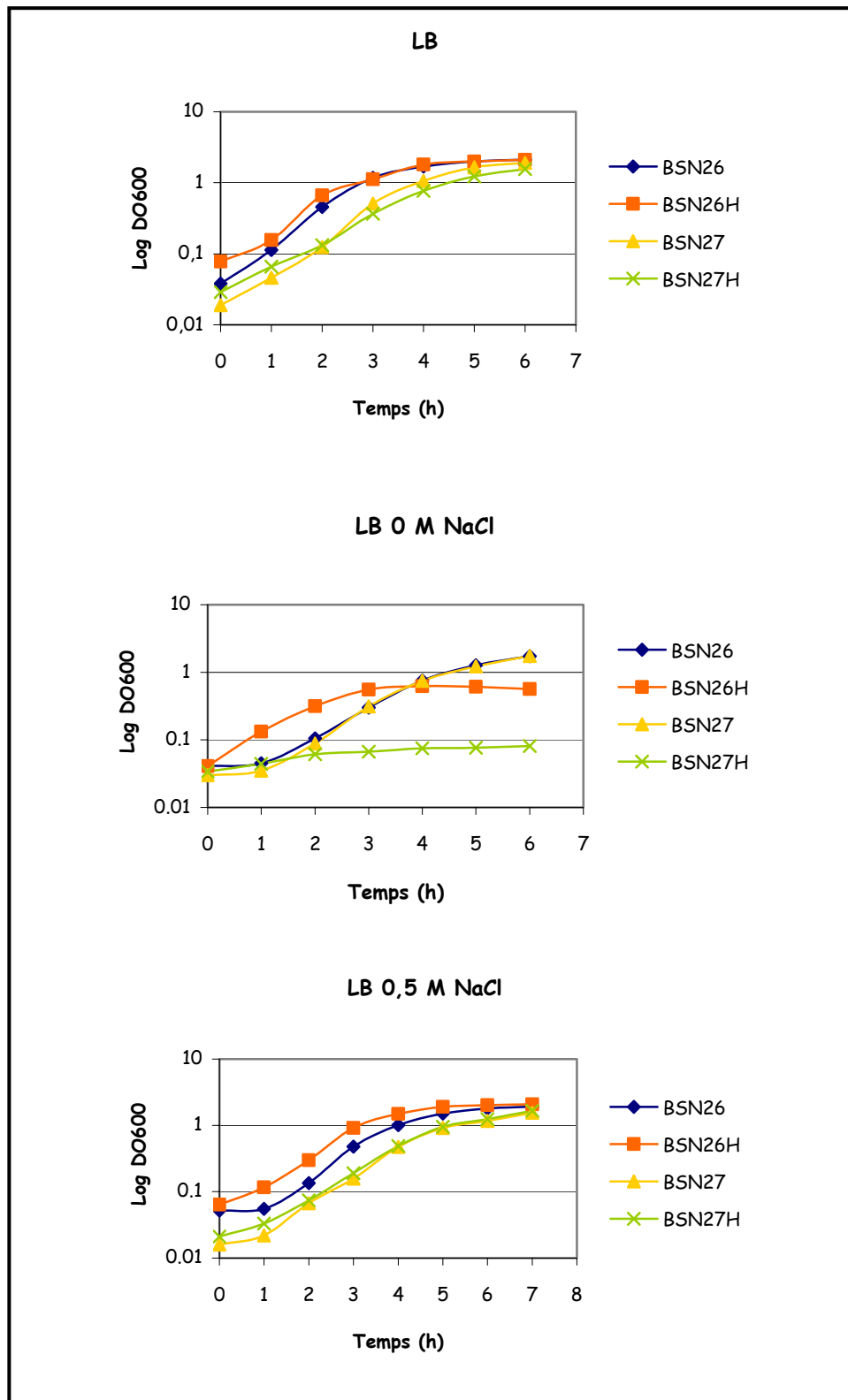


Figura 3.1.2.1 Corbes de creixement de les soques BSN26, BSN26H, BSN27 i BSN27H en medi LB, LB 0 M NaCl i LB 0,5 M NaCl. DO600 és la DO a 600 nm.

3.1.2.2 Anàlisi del patró de proteïnes per electroforesi en gels d'acrilamida desnaturalitzants

Per tal d'identificar les possibles proteïnes responsables de l'adaptació de la soca BSN27H al medi LB sense NaCl es van obtenir les proteïnes corresponents a la fracció interna d'aquesta soca a DO_{600} de 0,1 i 1. Es van separar les proteïnes en gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS al 10%, 12,5% i al 15% d'acrilamida per tal de cobrir tots els rangs de pesos moleculars. Després de tenyir amb Blau de Coomassie (apartat 2.8.5.3), es va localitzar una proteïna de baix pes molecular (uns 9 kDa) que es trobava sobreexpressada en els extractes de la soca BSN27H obtinguts a DO_{600} de 1 (figura 3.1.2.2a). Aquesta proteïna va ser seqüenciada i identificada com a HdeA. HdeA va ser descrita per primer cop com una proteïna d'expressió altament desreprimida en mutants *hns* d'*E. coli* (Yoshida *et al.*, 1993), i d'aquí ve el seu nom (*hns*-dependent expression). També estava descrita la seva estructura cristal·lina (Yang *et al.*, 1998) i se sabia que la proteïna homòloga identificada a *Shigella flexneri* estava implicada en la resistència a pH àcid (Waterman i Small, 1996), però no es coneixia quina era exactament la funció a *E. coli*.

Una altra aproximació per a l'anàlisi dels patrons de proteïnes va consistir en separar les fraccions periplasmàtiques i citoplasmàtiques obtingudes de cultius de les diferents soques isogèniques (BSN26, BSN26H, BSN27 i BSN27H) en LB i en LB sense NaCl a una DO_{600} de 1. Les fraccions citoplasmàtiques i periplasmàtiques es van analitzar en gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS i es van tenyir amb Blau de Coomassie.

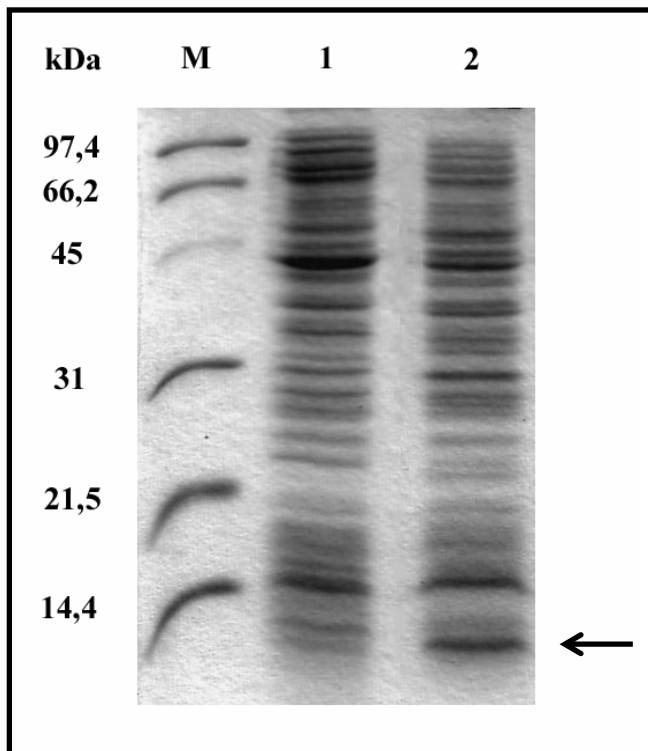


Figura 3.1.2.2a Anàlisi electroforètica dels extractes proteics de la soca BSN27H obtinguts a DO₆₀₀ de 0,1 (carril 1) i 1 (carril 2). M correspon al marcador de pesos moleculars indicats en kDa. La fletxa indica la banda corresponent a proteïna identificada, HdeA.

Respecte a les fraccions obtingudes dels cultius en LB sense NaCl, no es van detectar diferències en l'anàlisi de les fraccions citoplasmàtiques, però en canvi sí que hi havia diferències en el patró de proteïnes de les fraccions periplasmàtiques. Es tractava d'una proteïna d'uns 48 kDa, que es va identificar com HtrA, i d'una altra de baix pes molecular que corresponia a la proteïna HdeA, ja identificada. Podíem observar que les dues proteïnes estaven sobreexpressades en els tres mutants, però sobretot en el doble mutant *hha hns*. A més, mentre HdeA es veia sobreexpressada en extractes obtinguts de soques crescudes tan en LB com en LB sense sal, la proteïna HtrA estava sobretot sobreexpressada en extractes de les soques crescudes en LB sense sal (Figura 3.1.2.2b). HtrA és una proteïna periplasmàtica relacionada amb el xoc tèrmic que actua de proteasa o de xaperonina depenent de la temperatura. No es van trobar diferències en el patró de proteïnes de les fraccions corresponents als cultius obtinguts en LB, a excepció de la ja esmentada banda corresponent a la proteïna HdeA.

Es va decidir seguir amb l'estudi del paper d'Hha i d'H-NS en l'expressió d'HtrA, ja que era una proteïna de funció coneguda que no s'havia relacionat fins llavors amb Hha i/o H-NS.

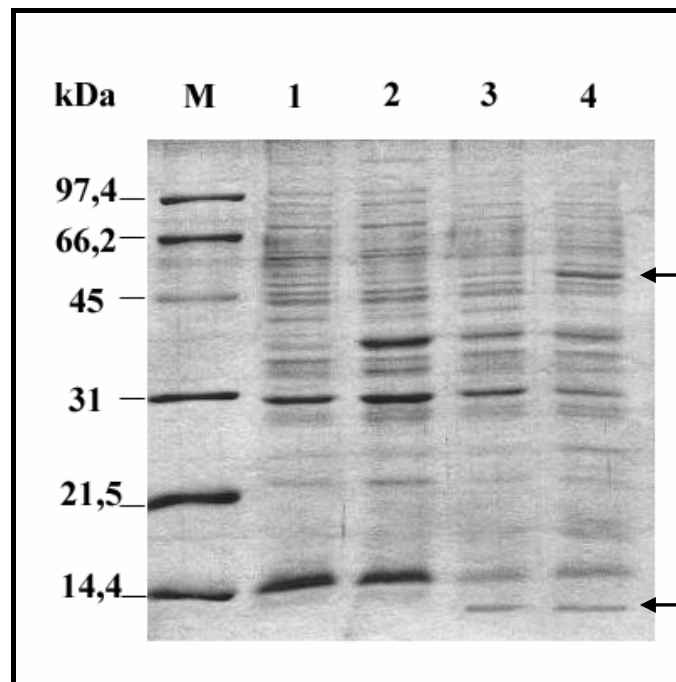


Figura 3.1.2.2b Anàlisi electroforètica de les fraccions periplasmàtiques de les soques BSN26 (carril 1), BSN26H (carril 2), BSN27 (carril 3) i BSN27H (carril4). M correspon a el marcador de pesos moleculars indicats en kDa. La fletxa superior marca la proteïna HtrA i la fletxa inferior la proteïna HdeA.

3.1.2.3 Efecte de les mutacions *hha* i *hns* sobre l'expressió del gen *htrA* (*degP*)

L'objectiu d'aquest apartat era determinar si les proteïnes Hha i H-NS intervenien en la regulació de l'expressió del gen *htrA*. Es va estudiar l'expressió d'aquest gen en una col·lecció de soques isogèniques portadores de les mutacions *hha* i/o *hns*. La mesura de l'expressió de l'operó es va realitzar mitjançant una fusió transcripcional del gen *degP* amb el gen *lacZ*, en un plàsmid multicòpia, i per mesura semi-quantitativa de la transcripció mitjançant la tècnica de la RT-PCR.

3.1.2.3.1 Valoració de l'activitat β -galactosidasa d'una fusió *degP-lacZ* clonada en un plàsmid multicòpia

Es va mesurar el nivell de transcripció del gen *htrA* en soques mutants *hha*, *hns* i *hha hns* mitjançant la valoració de l'activitat β -galactosidasa de la fusió gènica *degP-lacZ* clonada al plàsmid pSINATRA131. Per a això, es van transformar amb aquest plàsmid les soques BSN26 (wt), BSN26H (*hha*), BSN27 (*hns*) i BSN27H (*hha hns*). El plàsmid pSINATRA131 és de nombre de còpies alt i incorpora una fusió transcripcional del promotor i l'inici del gen *htrA* al gens *lacZ*, *lacI* i *lacA* de l'operó de la lactosa.

Les diferents soques es van fer créixer en medi LB i en medi LB sense NaCl i es va mesurar l'activitat β -galactosidasa dels cultius a DO_{600} de 0,4. La soca BSN27H amb el plàsmid pSINATRA131 no creix en LB sense NaCl i per tant no es va poder mesurar l'activitat β -galactosidasa en aquestes condicions. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.1.2.3.1.

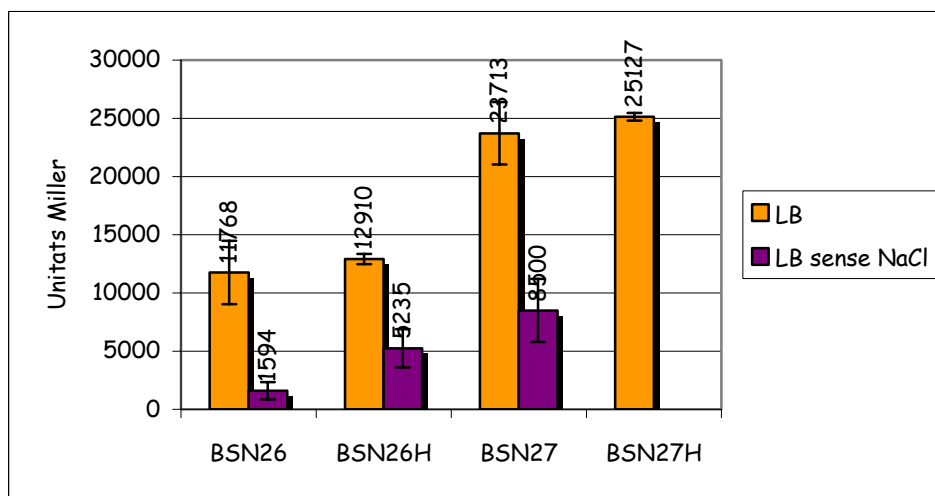


Figura 3.1.2.3.1 Activitat β -galactosidasa de les soques estudiades transformades amb el plàsmid pSINATRA131 crescudes en els dos tipus de medis.

Com s'observa en el gràfic, la transcripció del gen *htrA* reflectida en l'activitat β -galactosidasa està incrementada en un fons genètic *hns* i *hha hns*. Aquest increment és més rellevant quan els cultius que han crescut en medi sense NaCl. La soca BSN27 presenta una activitat més de 5 vegades superior a la soca salvatge en medi LB sense

NaCl, i aquesta diferència només és el doble en medi LB. L'efecte de la mutació *hha* també és més evident en condicions de baixa osmolaritat (el triple d'expressió respecte la soca salvatge) que en medi LB, on pràcticament no hi ha diferència.

3.1.2.3.2 Anàlisi de la transcripció del gen *htrA* per RT-PCR

Donats aquests resultats aparentment contradictoris i el fet que en cap cas vam poder valorar la transcripció a la soca BSN27H en LB sense NaCl, vam decidir analitzar directament els nivells de mRNA del gen *htrA* en les diferents soques per RT-PCR semi-quantitativa (apartat 2.7.3).

Es va aïllar el RNA total (apartat 2.7.1.1) de cultius de les soques BSN26, BSN26H, BSN27 i BSN27H crescudes tant en LB com en LB sense NaCl a 37°C fins a una DO₆₀₀ de 0,5. Es va dur a terme una digestió del RNA amb DNaseI per tal d'eliminar les possibles restes de DNA, es va quantificar la concentració de RNA i es va verificar la seva qualitat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

Es van dur a terme reaccions de RT-PCR amb diferents quantitats de RNA total per tal d'establir l'interval d'increment lineal entre la quantitat de RNA total i de producte obtingut. Es va determinar que la quantitat de RNA total que s'havia d'utilitzar en cada reacció per a què aquesta no es saturés era de 50 ng de RNA total. S'utilitzaren els oligonucleòtids HTRA-RT i HTRA-PCR (taula 3.1.2.6). El programa, descrit a l'apartat 2.7.3.2, es va aplicar amb una temperatura d'hibridació de 58°C durant 30 segons i un temps d'elongació de 30 segons, obtenint-se una banda de 873 pb. Els productes de la RT-PCR van ser analitzats mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 2% (apartat 2.6.6). Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 3.1.2.6. En condicions de baixa osmolaritat, és evident un increment de la transcripció del gen *htrA* tant en el mutant *hha* com en el mutant *hns*, tot i que el nivell més elevat de mRNA es detecta al doble mutant *hha hns*. També es pot observar, en el cas de la soca BSN26 (*wt*), un major nivell d'expressió d'*htrA* en medi LB que en medi LB sense NaCl. En medi LB no es detecten diferències significatives en els nivells de mRNA entre les diferents soques.

Està descrit que l'expressió d'*htrA* depèn del factor sigma alternatiu σ^{24} (σ^E) (Lipinska *et al.*, 1990; Seol *et al.*, 1991). El reguló RpoE s'activa en condicions d'un xoc tèrmic (Raina *et al.*, 1995), i també s'ha descrit que s'indueix en un xoc

hiperosmòtic (Bianchi i Baneyx, 1999). Per aquesta raó es va voler esbrinar si H-NS o el complex Hha/H-NS regulaven els nivells d'HtrA directament, o bé indirectament modulant els nivells de RpoE. Per a això es van analitzar també els nivells de transcripció del gen *rpoE* per RT-PCR a les soques BSN26, BSN26H, BSN27 i BSN27H. Es van fer les corbes de saturació i en aquest cas es determinà que la quantitat de RNA total adequada era de 3 ng en cada reacció. Els oligonucleòtids utilitzats varen ser RPOE-RT i RPOE-PCR (taula 3.1.2.6). La hibridació es va fer a 58°C durant 30 segons i l'elongació va ser de 1 minut, obtenint-se un producte de 570 pb. El resultat el podem observar a la figura 3.1.2.3.2, on podem veure que no hi ha diferències significatives en els nivells de transcripció entre les quatre soques, i per tant les mutacions *hns* i/o *hha* no afecten l'expressió del gen *rpoE*.

Com a control de la qualitat del RNA es va fer l'anàlisi per RT-PCR del mRNA del gen del rRNA 16S (*rrsH*). S'utilitzaren els oligonucleòtids 16S-1 i 16S-3 (taula 3.1.2.3.2). Amb les corbes de saturació es va determinar que calia utilitzar una quantitat de 0,5 ng de RNA total per reacció. En aquest cas la hibridació es feia a 58°C durant 40 segons i l'elongació es va fer durant 1 minut. El producte obtingut de la RT-PCR era de 474 pb.

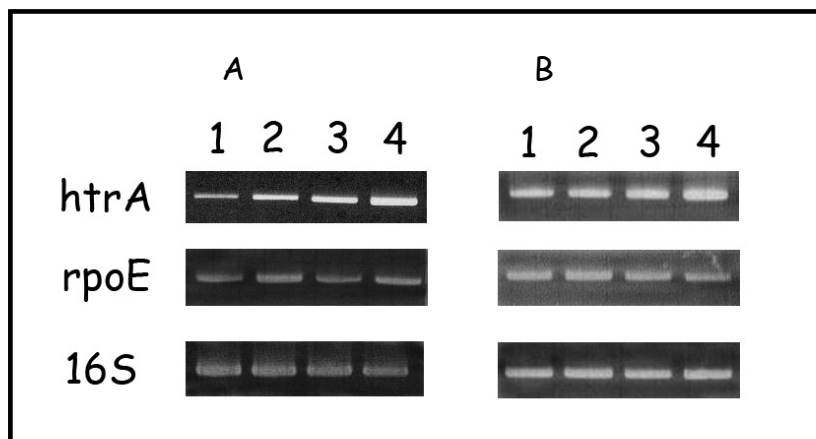


Figura 3.1.2.3.2 Anàlisi dels nivells de mRNA de *htrA* i *rpoE* per RT-PCR de les soques BSN26 (carrils 1), BSN26H (carrils 2), BSN27 (carrils 3) i BSN27H (carrils 4) crescudes en medi LB sense NaCl (A) i en medi LB (B). La RT-PCR del rRNA 16S ens serveix com a control de quantitat i qualitat del RNA que es va posar en cada reacció.

Taula 3.1.2.3.2 Oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de RT-PCR.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
HTRA-RT	GTTGAAGATGGAGCTGGAATC
HTRA-PCR	CGGCCAGCAACAGAAATTCAT
RPOE-RT	GCCTGATAAGCGGTTGAACT
RPOE-PCR	ATGAGCGAGCAGTTAACGGA
16S-1	GCTGCATGGCTGTCGTCAG
16S-3	CGCAGGTTCCCCTACGGTT

3.1.2.4 Unió de la proteïna H-NS a les regions promotores dels gens *htrA* i *rpoE*

A partir dels resultats obtinguts, que indiquen l'efecte de la mutació *hns* en la transcripció del gen *htrA*, ens vam plantejar determinar si hi havia una unió preferencial de la proteïna H-NS a la regió promotora del gen *htrA*. Aquesta possibilitat també va ser assajada amb la regió promotora de *rpoE*.

Per determinar aquestes possibles unions preferencials es van realitzar assajos de retard competitiu de DNA en gels d'agarosa.

Els fragments de DNA utilitzats corresponien a les regions promotores del gens *htrA* i *rpoE*. Es van obtenir aquests fragments mitjançant amplificació per PCR (apartat 2.6.4) a partir de colònia (*Escherichia coli* 5K) utilitzant els oligonucleòtids PhtrA1 i PhtrA2 (taula 3.1.2.4) per la regió promotora del gen *htrA*, obtenint un fragment de 150 pb que anomenarem PhtrA; i els oligonucleòtids PrpoE1 i PrpoE2 (taula 3.1.2.4) per la regió promotora de *rpoE*, donant un fragment de 140 pb anomenat PrpoE. Com a DNA competidor vam fer servir una seqüència de la regió reguladora de l'operó *hly* del plàsmid pHly152 (el fragment S/H) que no conté seqüències d'unió preferencial amb H-NS (Madrid *et al.*, 2002b). El fragment S/H és de 427 pb i s'obtingué per PCR utilitzant els oligonucleòtids HlyS i HlyH (taula 3.1.2.7), a partir de colònia (5K (pANN202-312R)).

El programa utilitzat per dur a terme l'amplificació del fragment PhtrA va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'
 Desnaturalització: 94°C, 30''
 Hibridació: 56°C, 30''
 Elongació: 72°C, 30''
 Finalització: 72°C, 10'

} ⇒ x 30 cicles

Per amplificar el fragment PrpoE s'utilitzà el següent programa:

Desnaturalització: 94°C, 5'
 Desnaturalització: 94°C, 30''
 Hibridació: 58°C, 30''
 Elongació: 72°C, 30''
 Finalització: 72°C, 10'

} ⇒ x 30 cicles

Finalment, el programa de PCR per l'amplificació del fragment S/H va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'
 Desnaturalització: 94°C, 30''
 Hibridació: 58°C, 1'
 Elongació: 72°C, 30''
 Finalització: 72°C, 10'

} ⇒ x 30 cicles

Taula 3.1.2.4 Oligonucleòtids utilitzats per amplificar els fragments utilitzats per dur a terme els retards competitiu en gel d'agarosa.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
PhtrA1	CAATAACCAGGCTTTTGTAAG
PhtrA2	ATGTGGTTTTTTTCATGTATTCAG
PrpoE1	CCGAGGTAAAGTCTCCCA
PrpoE2	ACAGCATGACAAACAAAACAG
HlyS	CAGACCACACCTGGAAAAC
HlyH	GGGCTTCACTGCGAAATCA

Un cop obtinguts els diferents fragments es purificaven per electroelució (apartat 2.6.7) per tal d'eliminar les restes de DNA motlle.

La proteïna H-NS, a una concentració de 0,65 g/l, va ser purificada com a proteïna modificada amb una cua de sis histidines a l'extrem carboxi-terminal amb les metodologies estàndards descrites prèviament (Nieto *et al.*, 2002).

Per la realització del retard en gel d'agarosa (apartat 2.6.8) es van fer barreges de quantitats equivalents dels fragments de PhtrA o PrpoE amb el fragment S/H. Es va afegir a cada barreja quantitats creixents de proteïna H-NS: 0 g, 0,32 g, 0,48 g, 0,65 g i 1,3 g. El resultat del retard competitiu es pot observar a la figura 3.1.2.4. Es necessita menys concentració d'H-NS per generar complexes DNA-proteïna de mobilitat reduïda amb el fragment de DNA corresponent a la regió promotora d'*htrA* que no pas amb el fragment corresponent a la regió promotora de *rpoE*. Això ens suggereix que la regió reguladora de *htrA* conté zones d'unió preferencial de la proteïna H-NS.

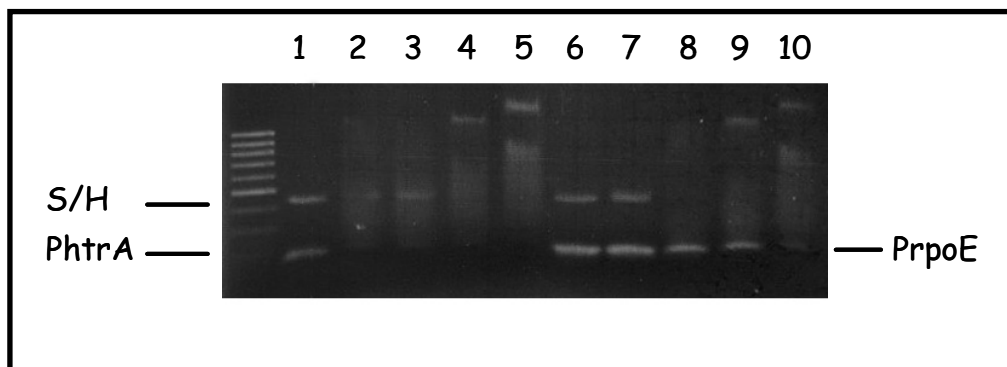
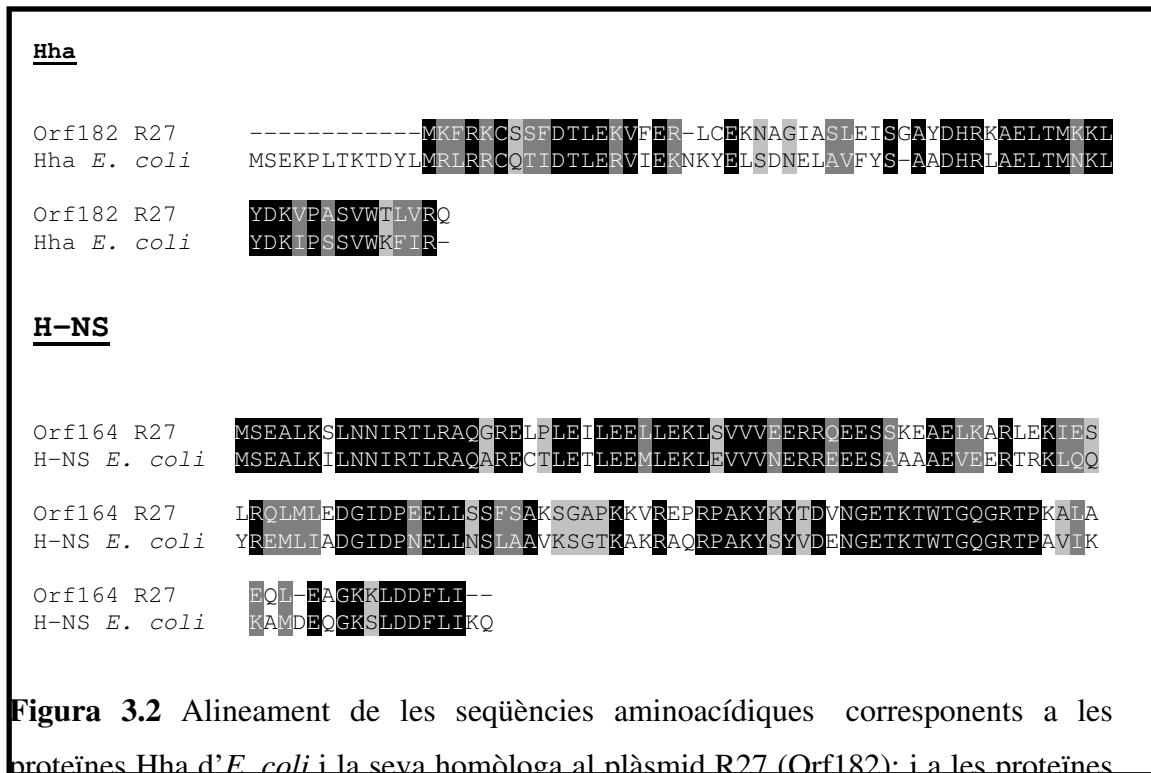


Figura 3.1.2.4 Efecte de quantitats creixents de proteïna H-NS (carrils 1 i 6, no hi ha proteïna; carrils 2 i 7, 0,32 g; carrils 3 i 8, 0,48 g; carrils 4 i 9, 0,65 g; i carrils 5 i 10, 1,3 g) en la mobilitat electroforètica dels fragments de DNA corresponents a les regions promotores dels gens *htrA* (carrils 1-5) i *rpoE* (carrils 6-10). Com a DNA competidor no específic s'utilitzà el fragment S/H del plàsmid pANN202-312R. Es va utilitzar el marcador 100 pb ladder (Biotools).

3.2 PAPER DE LES PROTEÏNES HHA I H-NS EN LA REGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ DEL PLÀSMID R27

L'anàlisi genòmic de diferents plàsmids conjugatius ha mostrat que molts d'ells incorporen gens que codifiquen proteïnes homòlogues a Hha i/o a H-NS (Madrid *et al.*, 2002a; Dorman, 2004). En alguns casos podem trobar còpies d'ambdós gens, *hha* i *hns*, presents en el mateix plàsmid. Com a exemples podem citar el plàsmid R446 del grup IncM aïllat de *Proteus morgani*, amb dues pautes de lectura homòlogues a Hha i H-NS (Nieto i Juárez, 1999), el plàsmid R478 del grup IncHI2 de *Serratia marcescens* (Gilmour *et al.*, 2004), el plàsmid de virulència de *Shigella sonnei*, pSS (Jiang *et al.*, 2005), o el plàsmid pHCM1 de *Salmonella enterica* serovar Typhi (Parkhill *et al.*, 2001). En aquest treball ens hem centrat en el plàsmid R27 aïllat de *Salmonella enterica* serovar Typhi, del grup IncHI1, que ha estat estudiat àmpliament en els últims anys (Gilmour *et al.*, 2001; Gilmour *et al.*, 2003; Lawley *et al.*, 2002a). La seva seqüència nucleotídica ha estat obtinguda i anotada (Sherburne *et al.*, 2000), revelant la presència de dues ORFs homòlogues a *hha* (*orf182*) i *hns* (*orf164*) amb un 41% i un 61% d'identitat a nivell de proteïna respectivament (figura 3.2).

Els plàsmids conjugatius del grup d'incompatibilitat HI (IncHI) són de baix nombre de còpies i codifiquen per la resistència a múltiples antibiòtics a *Salmonella enterica* serovar Typhi (Fica *et al.*, 1997). La persistència d'aquests plàsmids pot ser deguda, almenys parcialment, a la seva habilitat per transferir-se horitzontalment a la natura. Un tret remarcable és que la seva transferència és termosensible (Maher i Taylor, 1993), de manera que és major a baixes temperatures (entre 25°C i 30°C), i va disminuint a mesura que aquesta augmenta. R27 és el prototip dels plàsmids IncHI1 i el fet de què s'hagin identificat dins la seva seqüència dos gens homòlegs a *hha* i a *hns*, i considerant que el paper de les proteïnes Hha i H-NS en la termoregulació de l'expressió ja s'ha descrit a *E. coli*, vam decidir estudiar l'efecte d'aquestes proteïnes codificades a R27 i al cromosoma en la termoregulació de la conjugació del plàsmid. Així mateix, vam estudiar si les proteïnes homòlogues a Hha i a H-NS codificades al plàsmid eren capaces de complementar alguns dels efectes de les mutacions cromosòmiques dels gens *hha* i *hns*.



3.2.1 TERMOSENSIBILITAT DE LA CONJUGACIÓ DE R27

Inicialment es va comprovar la termosensibilitat de la conjugació de R27, utilitzant com a donadora la soca d'*E. coli* RG192 portadora del plàsmid R27. Es van utilitzar com a receptores dos tipus de soques, 5K i Hha3 (parental i mutant *hha* respectivament), per tal de comprovar que el genotip de la soca receptora pel que feia al gen *hha* no influïa en la freqüència de conjugació. Es va seguir el protocol de conjugació de R27, tant a 25°C com a 30°C i es van calcular les corresponents freqüències de conjugació. Els resultats es mostren a la taula 3.2.1. Es va confirmar que la conjugació de R27 és termosensible, ja que la freqüència de conjugació disminuïa aproximadament quatre logaritmes en passar de 25°C a 30°C. A més es va

comprovar que el genotip de la soca receptora no influenciava significativament en el resultat de la conjugació.

Taula 3.2.1 Freqüències de conjugació de les soques estudiades a 25°C i 30°C.

Soca donadora	25°C	30°C
5K	$8,25 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-6}$
Hha3	$1,30 \cdot 10^{-2}$	$6,80 \cdot 10^{-6}$

3.2.2 REGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ PER LES PROTEÏNES HHA I HNS CODIFICADES AL CROMOSOMA

Per determinar la implicació d'aquestes proteïnes en la termoregulació de la conjugació del plàsmid, inicialment es va estudiar quin paper jugaven les proteïnes Hha i H-NS codificades al cromosoma de la soca donadora.

Disposàvem ja de la soca salvatge (5K) i del corresponent mutant *hha* (Hha3). Es va obtenir també una soca mutant *hns* i el doble mutant *hha hns*. Això es va fer per transducció de la mutació *hns* de la soca de *E. coli* S614, que portava associat a la mutació un gen de resistència a ampicil·lina (Dersch *et al.*, 1993). Per a la transducció es va utilitzar el fag P1 *vir*. Es van seleccionar els mutants *hns* per resistència a ampicil·lina i es van comprovar els fenotips amb plaques d'agar- β -glucòsid. Les soques obtingudes així es van anomenar 5K *hns* (*hns*) i Hha3 *hns* (*hha hns*).

El primer que es va fer va ser analitzar l'efecte de les diferents mutacions en la freqüència de conjugació del plàsmid R27 a diferents temperatures (25°C, 30°C i 33°C) (apartat 2.4.3.1). Per fer això primer es va conjuguar el plàsmid R27 a la col·lecció de soques 5K (*wt*), Hha3 (*hha*), 5K *hns* (*hns*) i Hha3 *hns* (*hha hns*). Es van utilitzar llavors aquestes soques com a donadores en experiments de conjugació, utilitzant com a receptora la soca 5K Rif. Els resultats es mostren a la taula 3.2.2 i a la figura 3.2.2.

Taula 3.2.2 Freqüències de conjugació del plàsmid R27 a diferents temperatures en diferents fons genètics.

	25°C	30°C	33°C
5K	$1,1 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-7}$	1×10^{-8}
Hha3	$1,5 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-6}$
5K hns	2×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-5}$
Hha3 hns	1×10^{-1}	$8,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-5}

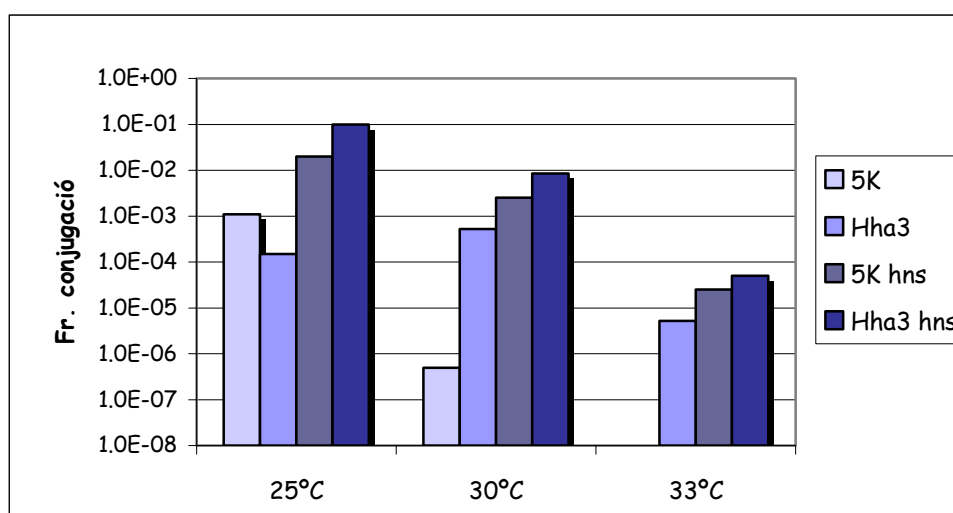


Figura 3.2.2 Histograma de les freqüències de conjugació de R27 en diferents fons genètics a les tres temperatures estudiades.

Com es pot observar en els resultats obtinguts, les mutacions en els gens *hha* i *hns* per separat o conjuntament, causen una supressió de la termosensibilitat de la conjugació de R27, és a dir, desreprimeixen la conjugació a 30°C i a 33°C. Mentre que en la soca salvatge hi ha una diferència de 4 logaritmes entre les freqüències de conjugació obtingudes amb cultius crescuts a 25°C i 30°C, les soques mutants presenten una diferència tan sols de 1 o 2 logaritmes. L'efecte de desrepressió més dràstic s'observa en el cas del doble mutant *hha* i *hns*. A 33°C, una temperatura no permissiva per la conjugació, aquesta és possible en el cas de les tres soques mutants. A més, a 25°C (una temperatura permissiva per la conjugació) les mutacions *hns* i

hha hns, ja causen un augment en la freqüència de conjugació respecte la soca salvatge.

3.2.3 OBTENCIÓ DEL PLÀSMIDS MUTANTS PER A LA *orf182*, PER LA *orf164* I PEL DOBLE MUTANT *orf182 orf164*

Veient doncs que les proteïnes associades al nucleoide Hha i H-NS juguen un paper en la repressió de la conjugació de R27 per temperatura, vam voler saber si les homòlogues d'aquestes proteïnes codificades en la seqüència del plàsmid jugaven també algun paper en la termosensibilitat de la conjugació. Per dur a terme aquest estudi ens vàrem plantejar mutagenitzar les corresponents ORFs homòlogues a les proteïnes Hha i H-NS de R27, és a dir, Orf182 (Hha) i Orf164 (H-NS).

3.2.3.1. Obtenció del plàsmid R27mutant per la *orf182*

Es va mutagenitzar la *orf182* mitjançant la tècnica de mutagènesi amb mini-Tn5 (apartats 2.5.1 i 2.4.2.1.1). Es va utilitzar el mini-Tn5Km1 seguint els protocols descrits, amb l'excepció de que les barreges de cèl·lules donadores i receptors provinents del filtre no eren plaquejades com de costum, sinó que es van utilitzar alíquotes de la barreja per inocular medi fresc PB i dur a terme una posterior conjugació de R27 a la soca 5K Rif. Això es va fer per tal de facilitar la cerca de la soca mutant pel gen d'interès, ja que en seleccionar els transconjugants amb la resistència del mini-Tn5, recuperàvem només els clons de la 5K Rif amb el plàsmid R27 mutat amb el mini-Tn5, eliminant tots els clons amb insercions de mini-Tn5 al cromosoma. En aquest cas les barreges de la conjugació de R27 es plaquejaven en plaques de MacConkey agar amb els marcadors de R27 i del mini-Tn5.

Tots els clons obtinguts amb insercions de mini-Tn5 al plàsmid R27 eren repicats per fer una posterior selecció d'una inserció a *orf182*. Aquesta selecció es va fer mitjançant l'amplificació per PCR (apartat 2.6.4) en les quals utilitzàvem l'oligonucleòtid TN5-3 (taula 3.1.2.3.1) que hibrida als dos extrems de mini-Tn5 (en les repeticions invertides) i l'oligonucleòtid que hibridava a l'inici del gen d'interès, R27SAC5 (taula 3.1.2.3.1). En els clons on s'havia amplificat un fragment d'una

mida inferior a la corresponent al propi gen, es feia una segona PCR on s'utilitzava altre cop l'oligonucleòtid TN5-3 en combinació amb l'oligonucleòtid que hibridés al final del gen, R27SAC3 (taula 3.2.3.1) (veure figura 3.2.3.1a). D'aquesta manera es comprovava que hi havia un mini-Tn5 enmig de la pauta de lectura del gen. Però tot i així es feia una última comprovació amb una amplificació on s'utilitzaven els oligonucleòtids que hibridaven a l'inici i al final del gen, R27SAC5 i R27SAC3. En aquest cas es limitava un temps d'amplificació que permetés l'amplificació dels gen no mutat però que no permetés l'amplificació del gen amb una inserció de mini-Tn5. D'aquesta manera, si no s'amplificava cap fragment volia dir que tenia una mida massa gran, degut a la inserció de mini-Tn5Km1 (figura 3.2.3.1a). El programa utilitzat en les tres PCR va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'	}	⇒	x 30 cicles
Desnaturalització: 94°C, 30''			
Hibridació: 50°C, 30''			
Elongació: 72°C, 30''			
Finalització: 72°C, 10'			

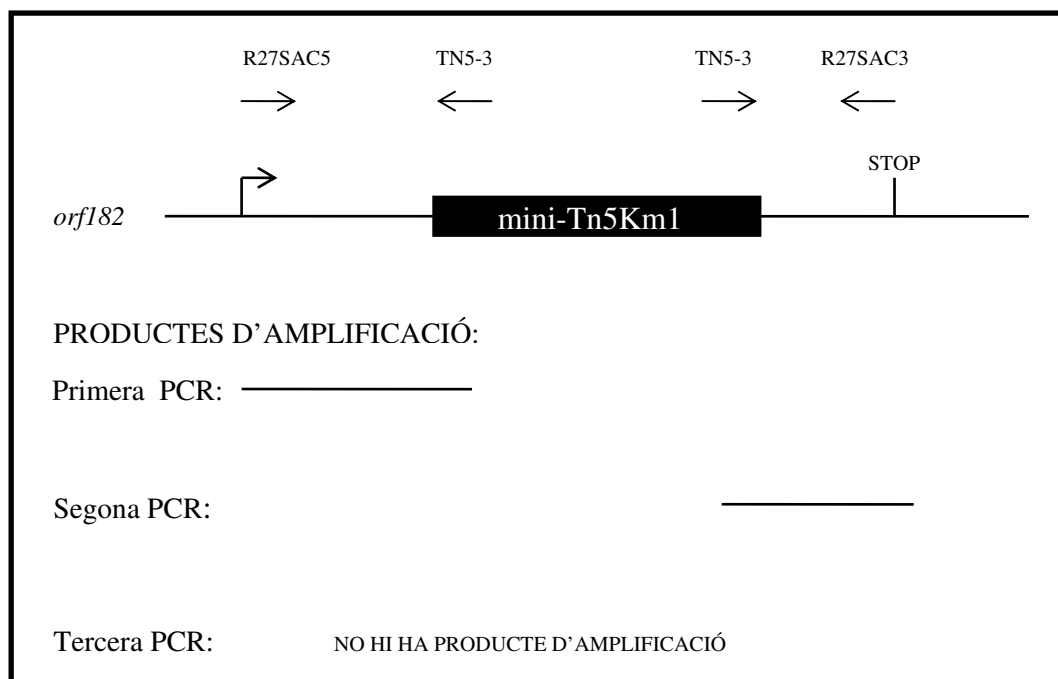


Figura 3.2.3.1a Esquema dels passos seguits per l' "screening" dels clons mutats amb mini-Tn5Km1, on es mostren els productes d'amplificació en el cas de trobar-nos davant un clon amb el gen d'interès mutat.

Taula 3.2.3.1 Oligonucleòtids utilitzats per comprovar la mutació de la *orf182*.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
R27SAC5	GGGGAGCTCATTTAATGAAATTTTCGTAAGT
R27SAC3	GGGGAGCTCATCTTCATATTACTGACGG
TN5-3	GCTACTTGTGTATAAGAGTCAG

Vam obtenir 3 clons amb insercions de mini-Tn5. Per assegurar-nos de que les bandes amplificades en la primera i segona PCRs corresponien a seqüències del gen *orf182*, es van purificar els fragments de DNA, i es van seqüenciar (apartat 2.6.5). Per a la seqüenciació es van utilitzar l'oligonucleòtid TN5-3. Les seqüències obtingudes es van comparar amb la seqüència de R27, i es va comprovar que efectivament el transposó estava insertat a la *orf182* en tots tres clons; vam seleccionar el clon que presentava el mini-Tn5Km1 insertat en una posició més a prop del codó d'inici de traducció, i vam anomenar al plàsmid R27-hha.

Com que no podíem assegurar que degut a la mutagènesis amb mini-Tn5 no s'hagués insertat alguna altre còpia de mini-Tn5 a R27 i que insercions secundàries poguessin afectar a la conjugació, es va comprovar la presència d'una única còpia de mini-Tn5 mitjançant dues aproximacions: i) transducció de la mutació a la soca RG192 R27, i ii) detecció per "Southern blot" del mini-Tn5.

La transducció de les mutacions es va fer amb el bacteriòfag P1 *vir* (apartat 2.4.4.2). Es va obtenir el lisat de P1 *vir* de la soca 5K Rif R27-hha i es van utilitzar per transduir la mutació a la soca RG192 R27. La selecció dels transductants es va fer per la resistència a Km del mini-Tn5Km1.

La comprovació per "Southern blot" (apartat 2.6.9) de que només hi hagués un sol mini-Tn5 al plàsmid es va fer a partir DNA total obtingut de les soques 5K R27 (que ens va servir de control negatiu del southern) i 5K R27-hha. El DNA total de les dues soques es va digerir amb *EcoRV*, enzim pel qual no té dianes el mini-Tn5Km1. Així el transposó va quedar dins un sol fragment de DNA i, per tant, si R27-hha contenia un sol mini-Tn5 el resultat de la hibridació seria una sola banda de DNA de mida corresponent a la banda amb extrems *EcoRV* que contindria el mini-Tn5. Com a sonda es va utilitzar l'oligonucleòtid TN5-3 DIG, que és el mateix oligonucleòtid que TN5-3 però marcat amb digoxigenina. El resultat del "Southern

blot” es mostra a la figura 3.1.2.3.1b. Es pot comprovar que el DNA de la soca portadora del R27-hha presenta una sola banda d’hibridació amb la sonda de Tn5, i per tant el transposó estaria en un sol fragment de DNA i com a conseqüència en una sola còpia.

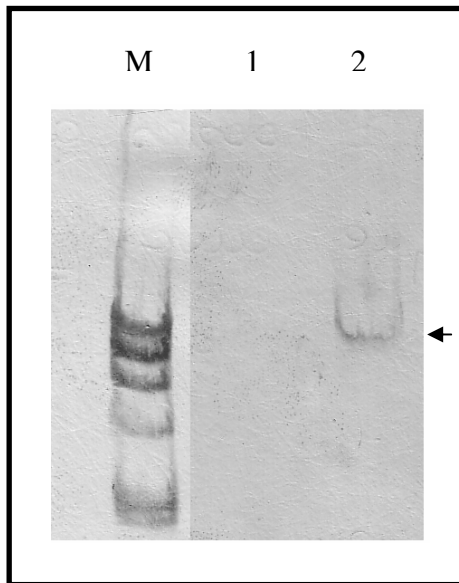


Figura 3.2.3.1b Hibridació de DNA total digerit amb *EcoRV* contra una sonda de Tn5. El primer carril (M) correspon al marcador de pesos moleculars (*HindIII*); el carril 1 correspon al DNA de la soca 5K R27 i el carril 2 a la soca 5K R27-hha.

3.2.3.2 Obtenció del plàsmid R27 mutant per a la *orf164* i del plàsmid R27 doble mutant per la *orf182* i la *orf164*

Per a l’obtenció de la mutació a *orf164* es va utilitzar la inactivació de gens amb fragments de PCR (apartat 2.5.3).

Es va començar dissenyant els oligonucleòtids que ens havien de servir per amplificar el “cassette” de resistència al cloramfenicol del plàsmid pKD3 amb extensions corresponents a *orf164*. Un dels oligonucleòtids (164P1) contenia una seqüència de 40 nucleòtids corresponents a la zona abans del codó d’inici de la *orf164*, seguits de la seqüència P1 del pKD3 (figura 3.2.1.3.2). L’altre oligonucleòtid (164P2) corresponia a la seqüència P2 de pKD3 seguida de 40 nucleòtids corresponents a la seqüència just després del codó stop de la *orf164* (figura 3.2.1.3.2). Es va realitzar la PCR d’amplificació del “cassette” de resistència al cloramfenicol, donant un fragment de 1,1 kb, amb els extrems homòlegs a les seqüències d’*orf164*. El programa de PCR utilitzat va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'
 Desnaturalització: 94°C, 30''
 Hibridació: 52°C, 45''
 Elongació: 72°C, 1'30''
 Finalització: 72°C, 10'

} ⇒ x 25 cicles

Per dur a terme la mutagènesi es va seguir el procés descrit a l'apartat 2.5.3 sobre la soca 5K R27. Una vegada obtinguts els possibles mutants resistents al cloramfenicol, es va comprovar la inserció del fragment de PCR mitjançant l'amplificació utilitzant els oligonucleòtids 164H1 i 164H2 (veure figura 3.2.3.2), comprovant que la mida del fragment amplificat corresponia a la inserció del "cassette" de cloramfenicol (1,1 kb). El programa de PCR va ser el següent:

Desnaturalització: 94°C, 5'
 Desnaturalització: 94°C, 30''
 Hibridació: 54°C, 30''
 Elongació: 72°C, 2''
 Finalització: 72°C, 10'

} ⇒ x 25 cicles

El plàsmid resultant es va anomenar R27-hns[Cm]. La resistència al cloramfenicol es va eliminar seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.3.3. Després de l'escissió es va fer una comprovació per PCR utilitzant els mateixos oligonucleòtids 164H1 i 164H2, amb les mateixes condicions, donant en aquest cas un fragment de 127 pb. Aquest plàsmid es va anomenar R27-hns.

164P1

5'CAAAGTATTCTATTGATTTTATTTATTACTCTTAGTGAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
 3' 164H1 P1

164P2

5'GTGGCTTTTGAAGCTGAGCTGTTCGCGATTTAATTTCAACCATATGAATATCCTCCTTAG
 T3' 164H2 P2

Figura 3.2.3.2 Oligonucleòtids 164P1 i 164P2. Es mostren subratllades les zones corresponents a P1 i a P2. La seqüència sobre fons gris correspon als oligonucleòtids 164H1 i 164H2.

Per tal d'aconseguir el plàsmid R27 doble mutant per la *orf182* i *orf164* es va dur a terme una transducció generalitzada, mitjançant el fag P1 *vir*, de la mutació d'*orf164* a la soca amb el plàsmid R27-hha. Es va obtenir un lisat de la soca 5K R27-hns[Cm] i es va transduir la mutació a la soca 5K R27-hha. Es va seleccionar la mutació per la resistència a cloramfenicol. La soca obtinguda va ser sotmesa també a l'últim pas de la mutagènesi, la escissió del "cassette" de cloramfenicol. Es va comprovar la correcta escissió amb la mateixa PCR que en l'obtenció del plàsmid R27-hns, utilitzant els oligonucleòtids 164H1 i 164H2. El plàsmid resultant s'anomenà R27-hha-hns.

3.2.4 EFECTE DE LA LES MUTACIONS *ORF164* I *ORF182* SOBRE LA TERMOREGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ DEL PLÀSMID R27

Un cop obtinguts i comprovats els tres plàsmids mutants es va procedir a comprovar l'efecte d'aquestes mutacions sobre la freqüència de conjugació de R27 a 25°C, 30°C i 33°C. Per a això es van utilitzar com a donadores del plàsmid les soques 5K R27, 5K R27-hha, 5K R27-hns i 5K R27-hha-hns. Com a receptora es va utilitzar en tots els casos la soca 5K Rif. Els resultats de les freqüències de conjugació obtingudes es poden veure a la taula 3.2.4a i a la figura 3.2.4a.

Taula 3.2.4a Freqüències de conjugació obtingudes amb els diferents plàsmids a diferents temperatures de cultiu.

	25°C	30°C	33°C
R27	$2,6 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-7}$	1×10^{-8}
R27-hha	$7,7 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-7}$
R27-hns	$1,2 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-5}$	8×10^{-7}
R27-hha-hns	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-6}$

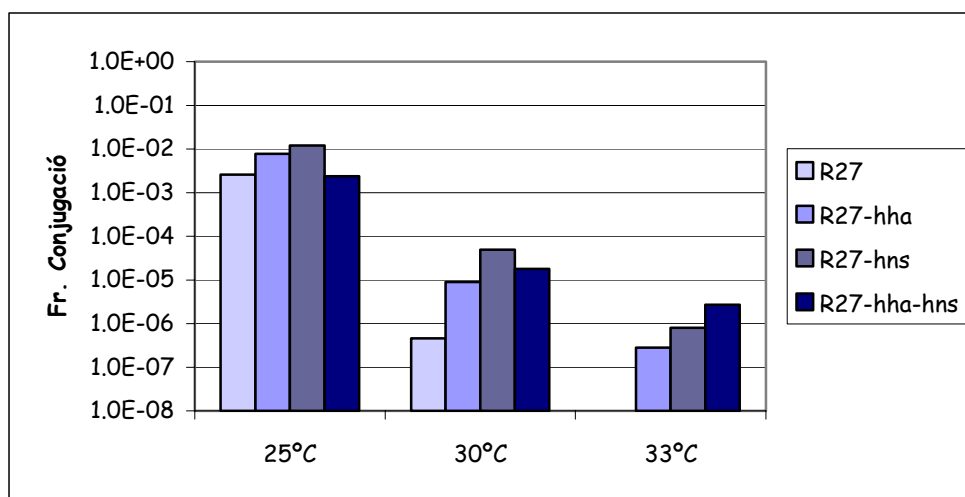


Figura 3.2.4a Histograma de les freqüències de conjugació dels diferents plàsmids a les tres temperatures estudiades.

Com podem veure, les proteïnes Hha i H-NS codificades al plàsmid també reprimeixen la conjugació, ja que les mutacions en aquestes orfs causen una desrepressió de la conjugació a elevades temperatures. L'efecte, però no és tan dràstic com el que causen els al·lels cromosòmics. Tanmateix, tant en aquest apartat com en l'apartat 3.2.2 hem estudiat l'efecte dels al·lels cromosòmics i plasmídics per separat, i potser el fet de que sempre hi hagi un dels dos al·lels emmascara els resultats complementant parcialment la falta de l'altre. Per aquesta raó vam voler calcular la freqüència de conjugació quan faltaven els quatre gens; vam utilitzar com a donadores les soques 5K R27 com a control, 5K R27-hha-hns i Hha3 hns R27, per estudiar la falta dels al·lels plasmídics o cromosòmics respectivament, i la soca Hha3 hns R27-hha-hns, soca que no té cap al·lel d'*hha* ni d'*hns*. La soca receptora va ser la 5K Rif. Es van obtenir les freqüències de conjugació amb cultius incubats a 25°C i a 33°C. Els resultats es mostren a la taula 3.2.4b i a la figura 3.2.4b.

Taula 3.2.4b Freqüències de conjugació del plàsmid R27 amb els diferents fons genètics a 25°C i 33°C.

	25°C	33°C
5K R27	$2,6 \times 10^{-3}$	1×10^{-8}
5K R27-hha-hns	3×10^{-3}	$2,7 \times 10^{-6}$
Hha3 hns R27	3×10^{-2}	5×10^{-5}
Hha3 hns R27-hha-hns	1	8×10^{-4}

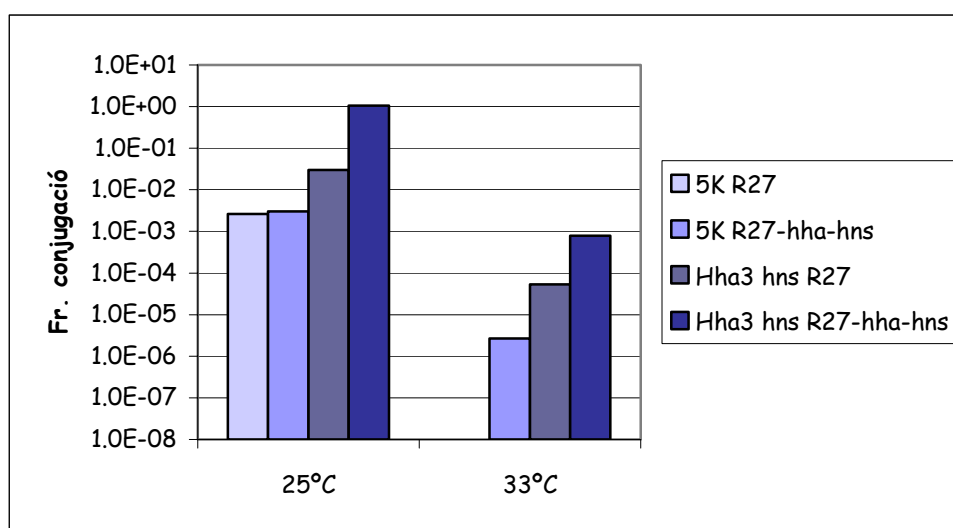


Figura 3.2.4b Histograma de les freqüències de conjugació de R27 de les quatre soques a 25°C i a 33°C.

Com podem veure, quan hi ha una absència de tots els al·lels d'*hha* i d'*hns* la freqüència de conjugació del plàsmid és molt més elevada, tant a 25°C com a 33°C; de fet, a 33°C s'arriba quasi a la freqüència de conjugació que s'obté amb el plàsmid salvatge amb la soca salvatge a 25°C. Tot i que, tant les proteïnes Hha i H-NS cromosòmiques com plasmídiques juguen un paper important en la repressió de la conjugació a altes temperatures, podem observar que les proteïnes cromosòmiques reprimeixen més la conjugació que no pas les proteïnes d'origen plasmídic, ja que la seva absència causa una major desrepressió de la conjugació. Es va comprovar que si incrementàvem la temperatura dels cultius a 37°C, la conjugació del plàsmid només es donava quan la soca donadora era la soca Hha3 hns R27-hha-hns (és a dir, quan mancaven tots els al·lels) amb una freqüència de $5,5 \times 10^{-6}$.

3.2.5 ESTUDI DE LA TRANSCRIPCIÓ DELS GENS DE LES REGIONS Tra1 I Tra2 DE R27 MITJANCANT MICROXIPS

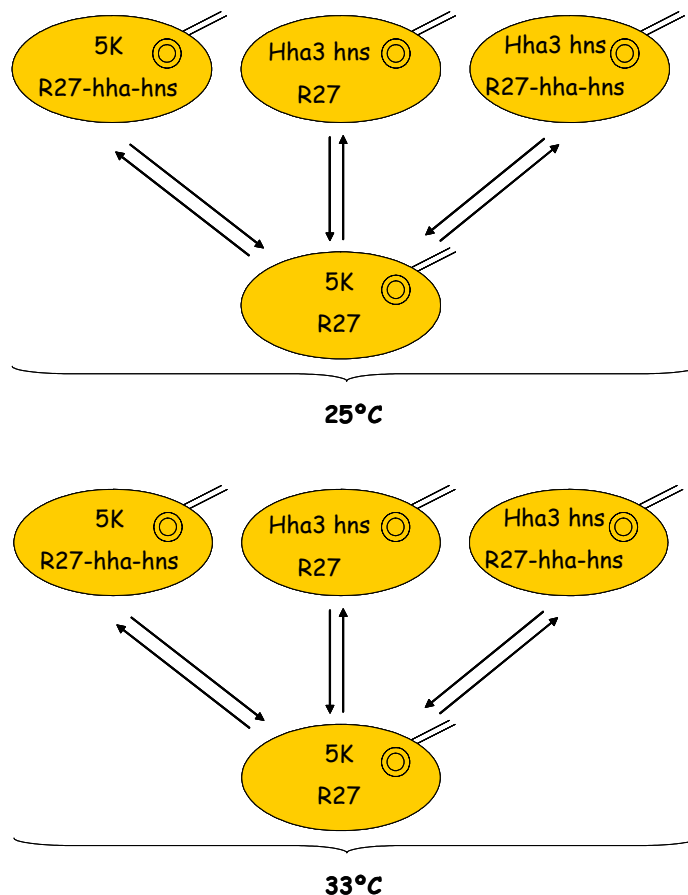
Els gens responsables de la transferència de R27 es troben localitzats en dues regions del plàsmid, la regió Tra1 i la regió Tra2 (Rooker *et al.*, 1999; Sherburne *et al.*, 2000). La regió Tra1 conté l'origen de transferència, la proteïna d'acoblament (coupling protein), i 9 gens essencials que codifiquen les proteïnes de formació del

Mpf (mating-pair formation) i del relaxosoma (Lawley *et al.*, 2002a). La regió Tra2 conté, entre d'altres, 11 gens que codifiquen el complex Mpf, essencials per la transferència del plàsmid (Lawley *et al.*, 2003a). Ja que les proteïnes Hha i H-NS estan implicades en la regulació de la conjugació de R27, vam decidir estudiar si aquestes dues proteïnes influenciaven la transcripció dels gens de les regions Tra1 i Tra2. Per això es va utilitzar la tecnologia dels microxips de DNA.

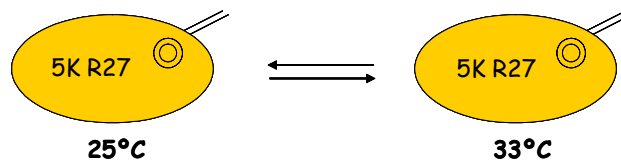
3.2.5.1 Disseny experimental i experiments

Atès l'interès de comparar l'expressió dels gens de les regions Tra1 i Tra2 entre els tres tipus de mutants (5K R27-hha-hns, Hha3 hns R27 i Hha3 hns R27-hha-hns) i el tipus salvatge (5K R27), com també comparar l'expressió d'aquests gens a 25°C i 33°C, es va optar pels dissenys experimentals que es mostren en les figures següents:

Experiment 1: Hibridacions dels cDNAs de les soques mutants i la soca salvatge a les dues temperatures.



Experiment 2: Hibridació dels cDNAs de la soca salvatge obtinguts a les dues temperatures estudiades.



En cada cas les fletxes en doble sentit indiquen que s'ha efectuat un "dye-swap", és a dir un intercanvi del fluorocrom utilitzat (Cy5 per Cy3 i a al revés), per controlar l'absorció diferencial dels fluorocroms.

Un cop vam tenir fet el disseny experimental, el primer que es va fer va ser el disseny del microxip, que havia de contenir els gens responsables de la transferència de R27 i tots els controls corresponents (veure apartat 2.7.4.1.1). Seguidament, es va aïllar el RNA total (veure apartat 2.7.1.2) de les següents soques: 5K R27, 5K R27-hha-hns, Hha3 hns R27 i Hha3 hns R27-hha-hns. El RNA es va aïllar de cultius d'aquestes soques crescudes en les mateixes condicions en què es duia a terme la conjugació (apartat 2.4.3.1), tant a 25°C (temperatura permissiva per a la conjugació) com a 33°C (temperatura no permissiva per a la conjugació del plàsmid salvatge amb la soca salvatge). Per tal d'eliminar les possibles restes de DNA que hi pogués haver en les mostres de RNA, es va fer una digestió amb DNaseI (apartat 2.7.3.1). Es va realitzar un marcatge indirecte del RNA (apartat 2.7.4.2), procés que inclou dos passos: en primer lloc vam passar el RNA a cDNA modificat amb amino-alils (AA), i en segon lloc vam unir els fluorocroms (Cy3 o Cy5) als amino-alils. Per a la hibridació es van barrejar de dues en dues les mostres de cDNA que es volien comparar segons s'ha mostrat en el disseny experimental. En tots els casos una marcada amb un fluorocrom i la segona marcada amb l'altre fluorocrom. Els experiments es van realitzar per triplicat per a què els resultats fossin significatius, amb una de les rèpliques corresponent al "dye-swap" (intercanvi de fluorocroms). Després de la hibridació (apartat 2.7.4.3.2) es passà a la lectura dels resultats (2.7.4.4). Es van obtenir tota una bateria de dades que es van haver de processar. A l'annex 1 apartat A hi trobem un llistat de totes les imatges obtingudes, el dia en què es van obtenir i les mostres a què corresponen.

3.2.5.2 Anàlisi de les imatges

El processat de les dades va ser molt similar per a tots dos tipus d'experiments (salvatge contra mutants i salvatge contra salvatge). Es va seguir la metodologia detallada a l'apartat 2.7.4.5.

Les imatges obtingudes van presentar una qualitat variable depenent, aparentment, del dia en que van ser obtingudes. En les imatges del primer dia van fallar els controls motiu pel qual no es van incloure en l'anàlisi davant la dificultat de normalitzar les dades sense aquests. La resta d'imatges va presentar una qualitat variable, però atès que hi havia moltes rèpliques de cada gen (16 rèpliques per gen) a cada microxip no en vam descartar cap més. Vam ponderar els punts amb baixa qualitat de forma que tinguessin menys rellevància en les anàlisis. Les imatges obtingudes després d'escanejar cada microxip les podem veure en l'Annex 1, apartat A.

Vam estudiar les correlacions entre els microxips. Com era d'esperar si estudiàvem la correlació entre tots els microxips amb tots els punts observàvem que aquesta era més gran en experiments realitzats simultàniament el mateix dia, que entre rèpliques biològiques. Aquest efecte desapareixia, o si més no es reduïa, si només estudiàvem la correlació entre microxips agafant només els gens. Si agregàvem les rèpliques dels punts promitjant-les aquests dos efectes es manifestaven més clarament. Totes les correlacions esmentades les podem veure en l'Annex 1, apartat B.

Amb les dades dels microxips es van fer uns diagnòstics inicials, que ens van donar una sèrie d'imatges per cada microxip que ens van ajudar a arribar a una conclusió final de com havíem de corregir les dades. Bàsicament es tractava de:

- “M-A plots”: on es representa, per a cada microxip, la intensitat en funció del valor relatiu de l'expressió per a:
 - Punts corresponents als gens
 - Punts corresponents als controls de calibració
 - Punts corresponents als controls de "ratio"
- “Boxplots”: que mostren la distribució dels punts de cada sector del microxip.

- “Image plots”: representen les imatges per ajudar a detectar irregularitats espacials.

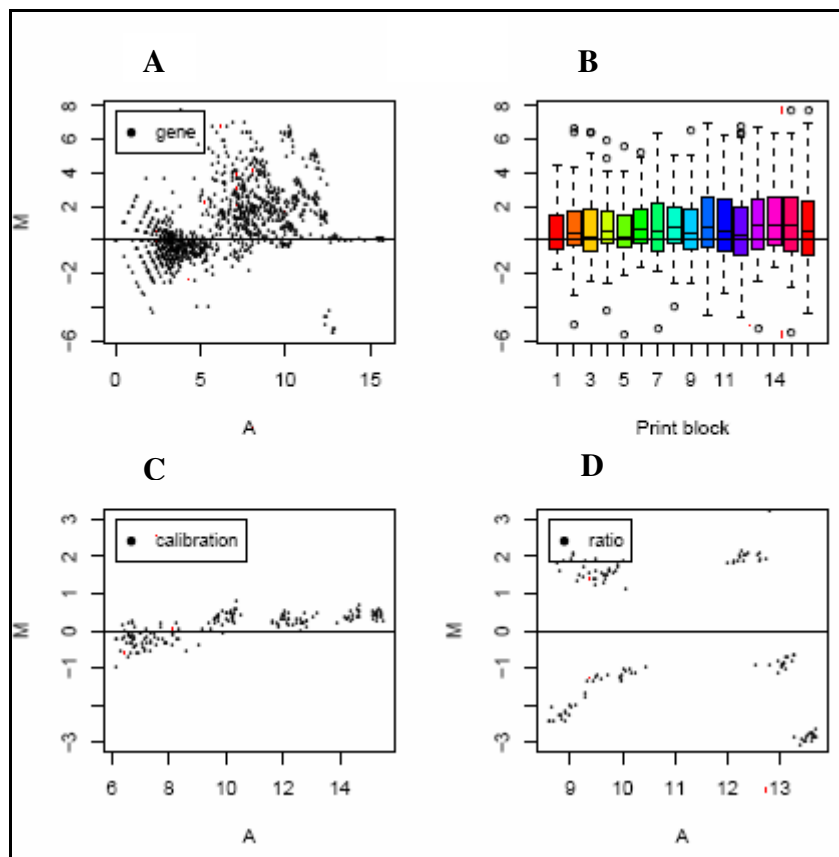


Figura 3.2.5.2a Exemple dels quatre gràfics de diagnòstic utilitzats per analitzar la qualitat d'un microxip. A: “M-APlot” dels punts corresponents als gens. B. “Boxplot”. C: “M-A plot” dels punts de calibració del microxip. D: “M-A Plot” dels punts de “ratio” d'un microxip.

En les figures 3.2.5.2a i b, podem veure dos exemples de les imatges obtingudes en els diagnòstics inicials. En l'Annex 1, apartat C, podem veure les imatges obtingudes en els diagnòstics inicials per cadascun dels microxips.

Aquets diagnòstics mostraven dues tendències que es van manifestar posteriorment:

- El mutant 5K R27-hha-hns és el que presenta menor variabilitat.
- Malgrat això, cal normalitzar tots els microxips ja que, com queda palès en observar els punts de calibració, aquests haurien d'estar centrats entorn del zero i amb molt poca dispersió i no solen quedar així.

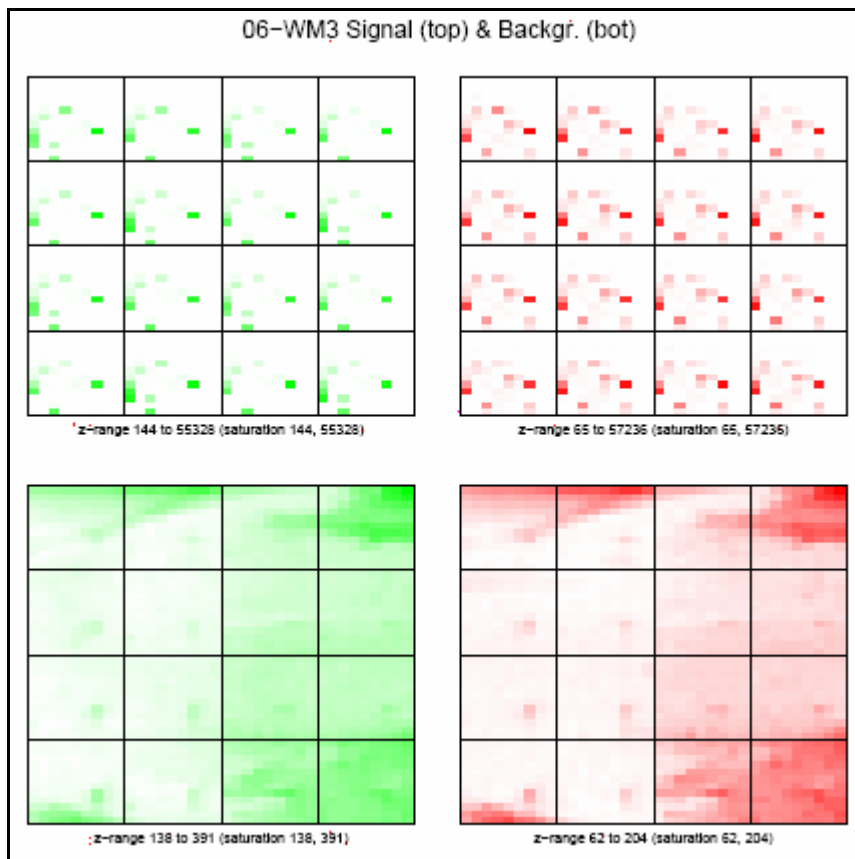


Figura 3.2.5.2b “Image plots” del senyals (imatges superiors) i del fons (imatges inferiors) del mateix microxip pels dos canals (verd i vermell).

Aquestes imatges ens van suggerir que una bona estratègia podia ser la de normalitzar les dades basant-nos només en els punts de calibració. Les imatges de la figura 3.2.5.2b mostraven la necessitat d'efectuar una correcció per al fons, ja que aquest apareix força i, a més, de manera heterogènia segons la zona del microxip.

3.2.5.3 Preprocessat: filtratge i normalització

Per al preprocessat es va seguir la metodologia descrita a l'apartat 2.7.4.5.3. L'eliminació del “background” o soroll de fons es va fer de manera que no quedessin intensitats negatives i ajustant també pels punts amb un canal buit. La figura 3.2.5.3a n'és un exemple. En l'Annex 1, apartat D, podem trobar totes les imatges de diagnòstic després de l'eliminació del soroll de fons.

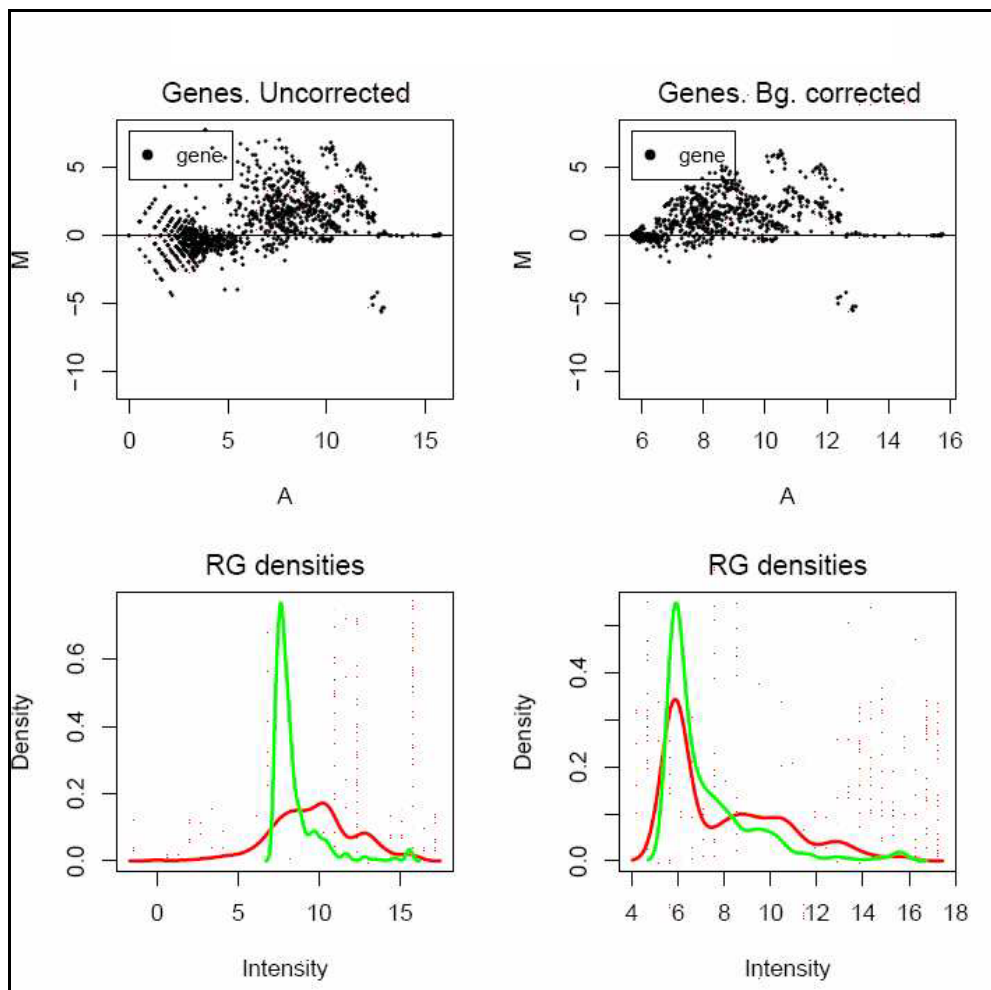


Figura 3.2.5.3a Correcció del fons per un dels microxips. A la part superior trobem els “M-A plots” dels gens abans i després de la correcció del “background”. A la part inferior, gràfic de la distribució dels punts segons la seva intensitat abans i després de la correcció del “background”, on es pot observar com s’igualen els perfils dels dos canals, verd i vermell.

Després d'eliminar el fons es va procedir a normalitzar (corregir) els valors dels gens basant-nos en els punts de calibració. La figura 3.2.5.3b en mostra un exemple, però la resta d'imatges les podem trobar a l'Annex 1, apartat E. Malgrat la normalització la majoria dels punts continuaven mostrant expressió, la qual cosa es va relacionar amb el fet que s'esperava que la majoria dels gens estiguessin expressats, ja que les mostres de RNA es van extreure de cultius en condicions òptimes per l'expressió dels gens de transferència del plàsmid R27.

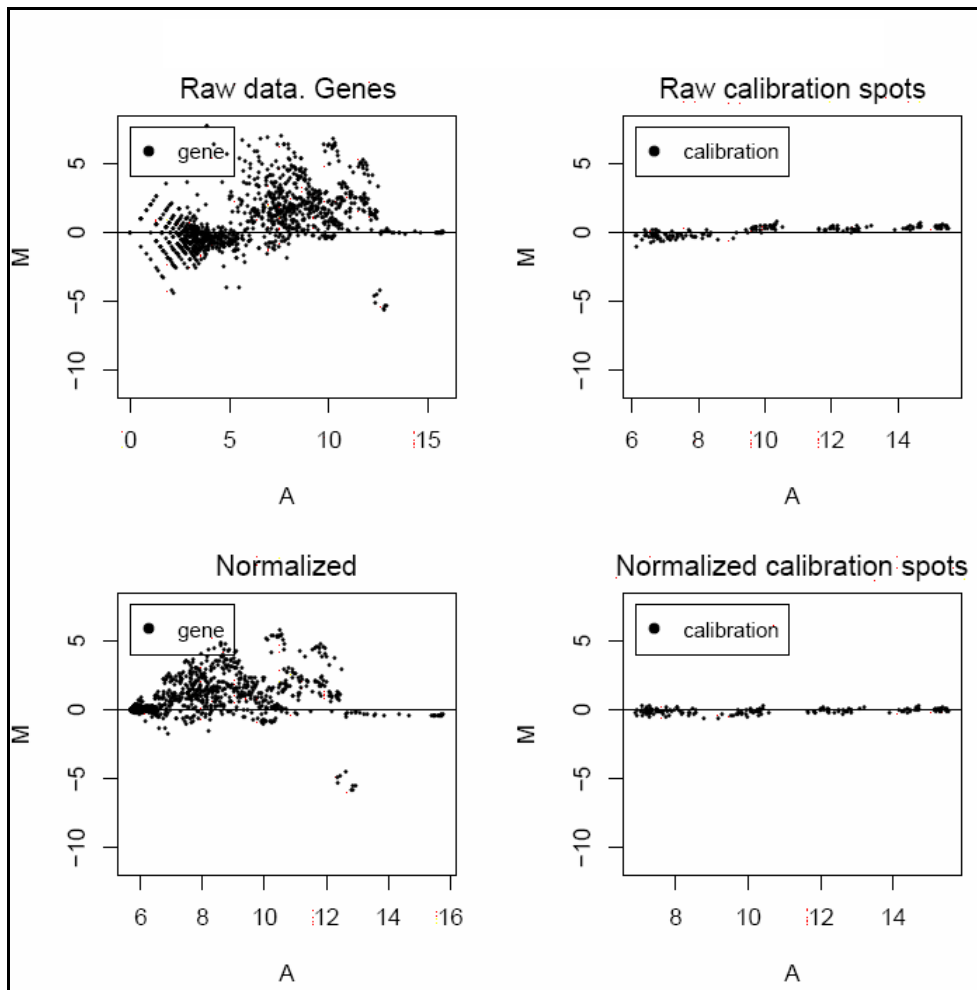


Figura 3.2.5.3b Comparació entre gens (a l'esquerra) i punts de calibració (a la dreta) abans i després de normalitzar (a dalt i a baix respectivament) mitjançant "M-A plots".

La normalització es va dur a terme dins de cada microxip (within), i en alguns casos es van ajustar tots els xips (between) malgrat que si es feia així podia haver-hi una homogeneïtzació excessiva, la qual cosa podia implicar que molts dels gens no apareguessin com expressats diferencialment.

Les figures 3.2.5.3c, 3.2.5.3d i 3.2.5.3e mostren una representació gràfica amb la què podem veure el què fa la normalització dins del mateix microxip (figura 3.2.5.3d), i la normalització entre tots els microxips (figura 3.2.5.3e), i ho podem comparar amb les dades inicials sense normalitzar (figura 3.2.5.3c). Es tracta de "Boxplots" on es representa el valor relatiu de l'expressió per cada microxip. Podem observar que la normalització dins dels microxips manté diferències importants entre xips degut al fet de que el nostres gens estan majoritàriament expressats sobretot quan

es tracta de les soques Hha3 hns R27 i de la Hha3 hns R27-hha-hns. Per aquesta raó, es vol comparar els mutants entre ells és millor fer també una normalització entre microxips, tot i que es perd part de la informació.

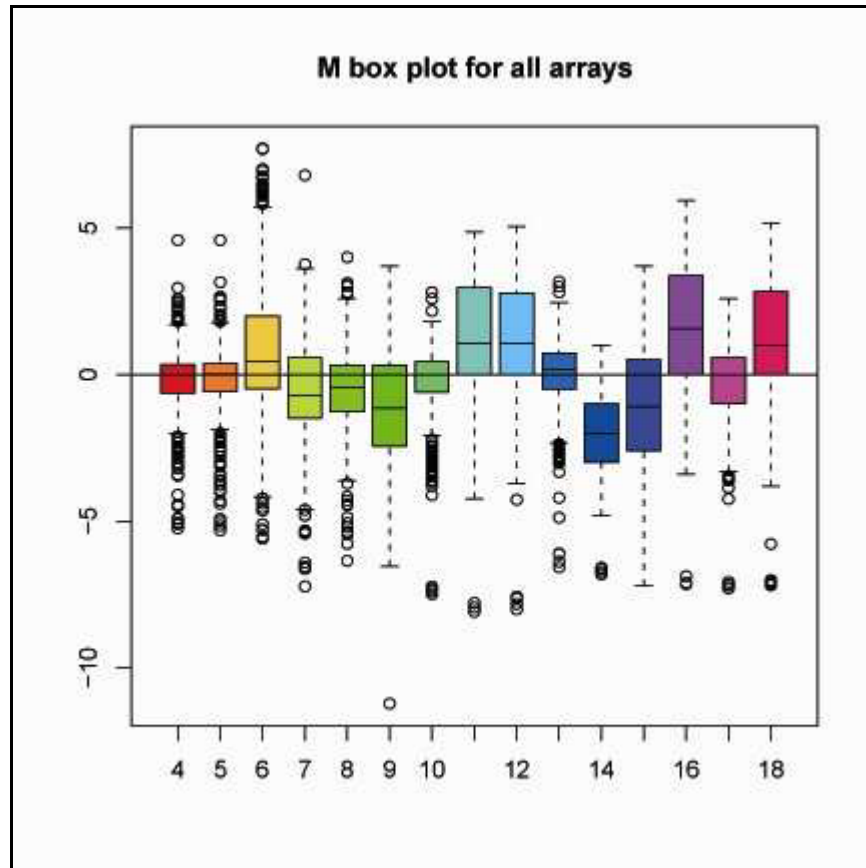


Figura 3.2.5.3c “Boxplot” del valor relatiu de l’expressió per cadascun dels microxips sense normalitzar.

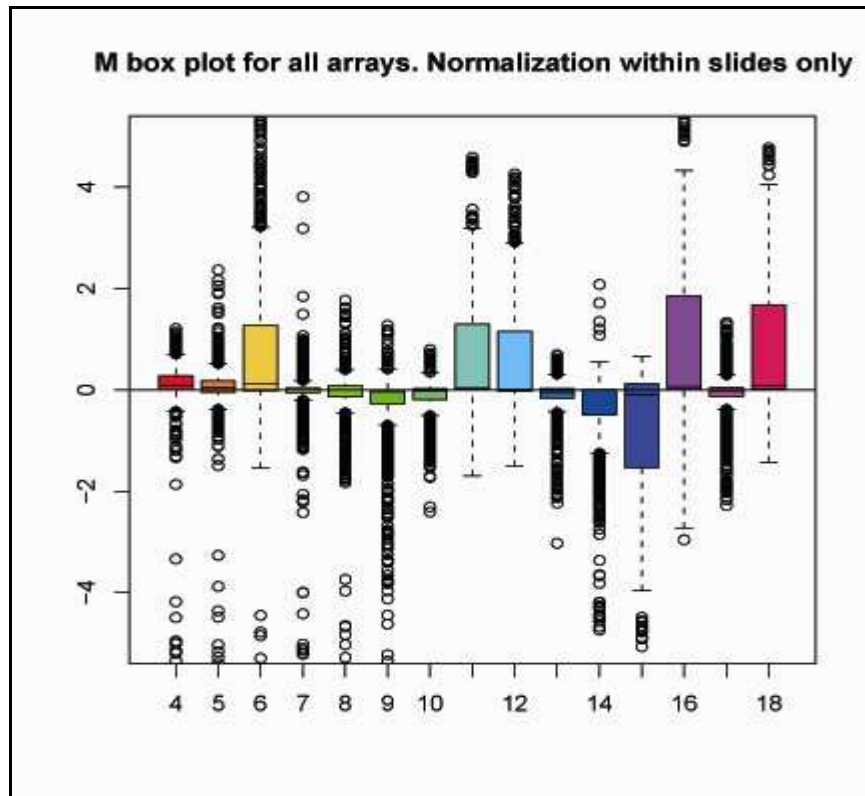


Figura 3.2.5.3d “Boxplot” del valor relatiu de l’expressió després de la normalització dins de cada microxips.

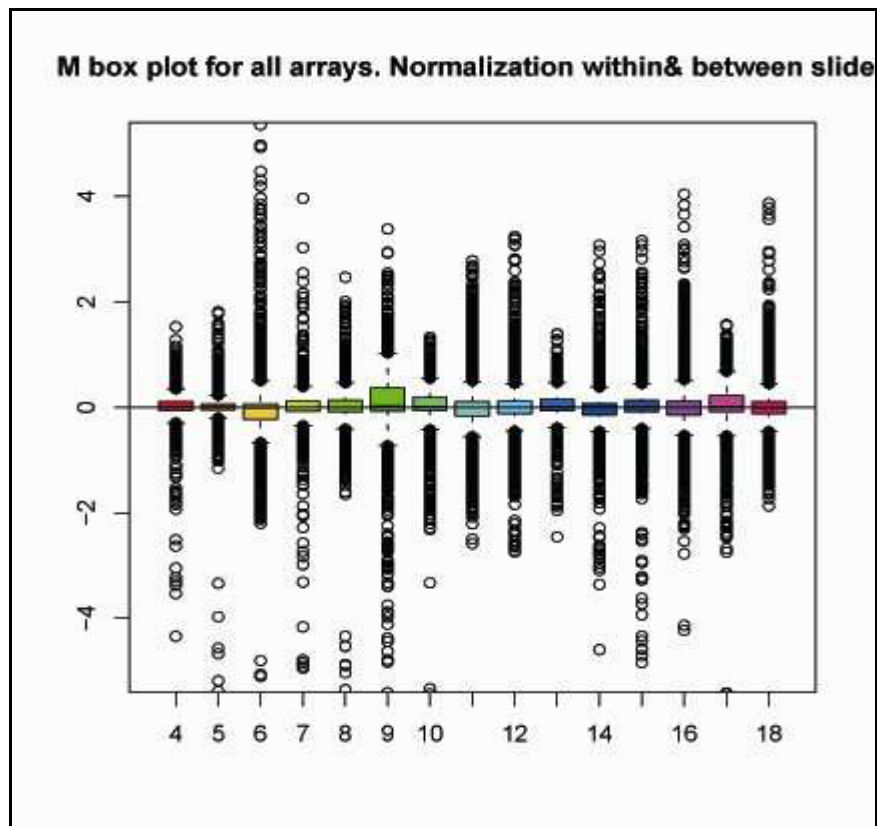


Figura 3.2.5.3e “Boxplot” del valor relatiu de l’expressió per cadascun dels microxips després de normalitzar-los entre ells.

3.2.5.4 Gens expressats diferencialment

Després de normalitzar les dades obtingudes dels microxips vam procedir a fer les comparacions seleccionades. Per a cada comparació individual obtinguérem una taula on apareixien els gens ordenats de major a menor expressió diferencial. En línies generals, vam considerar expressats diferencialment aquells gens on el valor de la columna "B" era superior a zero.

En l'Annex 1, apartat F, es troben totes les taules completes dels resultats per totes les comparacions fetes:

1. Gens diferencialment expressat entre cada mutant i el tipus salvatge a 25°C i a 33°C.
2. Gens diferencialment expressats entre 33°C i 25°C en cada mutant (respecte el salvatge)
3. Gens diferencialment expressats entre 25°C i 33°C en la soca salvatge.

La figura 3.2.5.4 mostra un resum de tots els resultats obtinguts en l'estudi de l'expressió dels gens de transferència de R27.

Podem observar que en les comparacions d'expressió dels gens de les tres soques mutants respecte la soca salvatge (sis primeres files de cada regió de transferència), sempre que hi ha diferències d'expressió significatives (marcades en negreta), hi ha una expressió més elevada en les soques mutants, per tant es pot dir que en línies generals les proteïnes Hha i H-NS duen a terme una repressió de l'expressió dels gens de transferència. Així mateix, veiem que les diferències d'expressió les podem observar sobretot a 25°C, temperatura en què en principi no hi ha repressió de la conjugació, però com podem veure en els mutants hi ha una major expressió de molts dels gens. Podem concloure que les proteïnes Hha i H-NS regulen l'expressió de molts dels gens de transferència del plàsmid R27.

Si ens fixem en les tres soques mutants per separat en comparació amb la soca salvatge (5K R27), veiem que les proteïnes Hha i H-NS del plàsmid R27 o del cromosoma per separat no tenen un efecte molt dràstic sobre l'expressió dels gens estudiats, sobretot en el cas de les proteïnes Hha i H-NS plasmídiques (M1/W, M2/W). De fet amb la soca 5K R27-hha-hns (M1) només trobem diferències d'expressió significatives respecte la soca salvatge en l'expressió del gen *trhA* (que codifica la pilina) a 25°C. Respecte als valors obtinguts amb la soca Hha3 hns R27

(M2) però, podem veure que a 25°C ja trobem molts més gens afectats per l'absència de les proteïnes Hha i H-NS cromosòmiques. En absència tant de les proteïnes Hha i H-NS cromosòmiques com plasmídiques (M3), podem observar moltes diferències d'expressió respecte la soca salvatge tant a 25°C com a 33°C. Una possible hipòtesi per explicar aquests resultats és que en absència de les proteïnes Hha i H-NS plasmídiques, hi ha les homòlogues cromosòmiques que poden suplir la seva funció en la regulació de la conjugació; i a l'inrevés, si falten les còpies cromosòmiques, les seves homòlogues plasmídiques complementen parcialment la regulació de la conjugació de R27. Per tal de veure l'efecte real de les proteïnes Hha i H-NS hi ha d'haver una falta de totes les còpies d'aquestes.

En la comparació de l'expressió dels gens de transferència a 33°C respecte a 25°C en cada soca per separat, no hi ha masses gens amb diferències d'expressió significatives, però en general aquestes diferències reflecteixen una major expressió dels gens a 25°C. Una excepció d'això la trobem en dos gens *trhR* i *trhY* (descrits com a possibles reguladors de la conjugació, Lawley *et al.*, 2002a), que tenen una expressió més elevada a 33°C en la soca Hha3 hns R27-hha-hns.

En resum podem dir que hem estudiat 11 gens de la regió Tra1 i que 9 d'ells mostren una repressió de la transcripció deguda directa o indirectament a les proteïnes Hha i/o H-NS. Aquests gens codifiquen les següents proteïnes: TraJ, TraI i TraH que formen part del relaxosoma; la Orf118 que en principi no és una proteïna implicada en la conjugació; TraG, que és la proteïna d'acoblament; TrhR i TrhY, possibles reguladors de la conjugació; i per últim TrhF i TrhH, possibles proteïnes de membrana externa que podrien estar implicades en l'assemblatge del pili.

De la regió de transferència Tra2 hem estudiat 24 gens, dels quals 19 presenten diferències d'expressió en alguna de les condicions estudiades, i la seva expressió podria estar influïda per les proteïnes Hha i/o H-NS. Aquests gens codifiquen per les següents proteïnes: TrhW, TrhV, TrhB i TrhE, proteïnes implicades en la síntesi del pili i/o la formació del complex Mpf; TrhI, possible DNA helicasa ATP-dependent però no essencial per a la conjugació del plàsmid; TrhN, possible proteïna estabilitzadora de l'aparellament; TrhU, possible proteïna implicada en la transferència del DNA; TrhP, peptidasa que processa la pilina; HtdK, possible proteïna determinant d'un plàsmid H; HtdA és una possible proteïna repressora de la conjugació; TrhZ, possible reguladora de la conjugació; TrhC, possible ATPasa; TrhK, proteïna de la membrana externa que funciona com a secretina; TrhA, que és la

pilina; i per últim, un conjunt de proteïnes que sembla que no estiguin implicades en la transferència del plàsmid, Orf4, Orf9, HtdT, Orf28 i Orf30.

3.2.6 ESTUDI DE LA TRANSCRIPCIÓ DE GENS DE LES REGIONS Tra1 I Tra2 DE R27 MITJANCANT RT-PCR

Per tal de confirmar les dades obtingudes a partir dels microxips vam decidir fer un anàlisi transcripcional, mitjançant la tècnica de la RT-PCR, de l'expressió d'alguns dels gens que van mostrar diferències d'expressió significatives en l'anàlisi amb microxips. Aquests gens van ser: *traJ*, *traH*, *trhR* i *trhH* de la regió Tra1; i *trhA* i *trhE* de la regió Tra2.

Vam escollir aquests gens per tenir una representació de gens de les dues regions amb diferents nivells de diferències d'expressió significatives. Per exemple, de la regió Tra1, *traJ* només presenta una expressió diferencial entre la soca Hha3 hns R27-hha-hns i la soca salvatge a 25°C; *trhR* és el gen que presenta diferències significatives d'expressió en més condicions que qualsevol altre gen de la regió Tra1; *traH* presenta diferències d'expressió força elevades en dues condicions; *trhH* en canvi, presenta diferències d'expressió en dues condicions, però en aquest cas només són de l'ordre de dues vegades. En la regió Tra2, vam escollir el gen *trhA*, que és el que presenta diferències d'expressió en més condicions que qualsevol altre gen d'aquesta regió, a més és un gen molt important ja que codifica la pilina; la majoria de gens de la regió Tra2 presenten diferències d'expressió significatives en les mateixes condicions (entre les soques Hha3 hns R27-hha-hns i 5K R27 a 25°C i 33°C, i entre les soques Hha3 hns R27 i la 5K R27 a 25°C), per tant, vam escollir el gen *trhE* com a representant de tots ells.

Es va aïllar el RNA total (apartat 2.7.1.2) de les soques 5K R27, 5K R27-hha-hns, Hha3 hns R27 i Hha3 hns R27-hha-hns crescudes en les mateixes condicions en què es duia a terme la conjugació (apartat 2.4.3.1), i es va fer tant a 25°C com a 33°C. En aquest anàlisi també vam voler avaluar la transcripció dels gens en cèl·lules que no tenien cap de les còpies del gen *hha*. S'ha demostrat que la proteïna paràloga d'Hha, YdgT, pot compensar parcialment la falta d'Hha a *E. coli* (Paytubi *et al.*, 2004). Per aquesta raó, es va aïllar també el RNA de la soca Hha3 YdgT R27-hha a partir de cultius incubats també a 25°C i a 33°C.

Per tal d'eliminar les possibles restes de DNA que hi pogués haver en les mostres de RNA, es va fer una digestió amb DNaseI (apartat 2.7.3.1). Es va

quantificar la concentració de RNA (apartat 2.7.1.3) amb un espectre i es va verificar la seva qualitat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa (apartat 2.7.2).

A la taula 3.2.6a es detalla la llista de tots els gens analitzats, els oligonucleòtids a 5' i a 3' utilitzats per cadascun d'ells, la quantitat determinada de RNA total que s'havia de posar en cada reacció que per a què aquesta no es saturés, la mida del fragment del producte de la reacció, la temperatura d'hibridació a la què es feia la reacció i el temps d'elongació. La seqüència dels oligonucleòtids la trobem a la taula 3.2.6b. El programa bàsic per dur a terme la RT-PCR està descrit a l'apartat 2.7.3.2. Els productes de la RT-PCR van ser analitzats mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 0,8% o al 2% segons la mida del fragment analitzat (apartat 2.6.6).

Com a control intern del RNA es va utilitzar el gen del rRNA 16S (*rrsH*). S'utilitzaren el oligonucleòtids 16S-1 i 16S-3. Amb les corbes de saturació es va determinar que s'havia d'afegir una quantitat de 0,5 ng de RNA total per reacció. En el programa de la RT-PCR la hibridació es feia a 58°C durant 40 segons i l'elongació es va fer durant 1 minut. El producte de la RT-PCR era de 474 pb i s'analitzava també per electroforesi en gels d'agarosa.

Taula 3.2.6a Característiques de les RT-PCR per cada gen analitzat.

Gen	Oligonucleòtid 5'	Oligonucleòtid 3'	Quantitat RNA (ng)	Mida (pb)	Temperatura hibridació	Temps elongació
<i>traJ</i>	traJ5	traJ3	400	648	54°C	1 min
<i>traH</i>	traH5	traH3	200	483	54°C	1 min
<i>trhR</i>	trhR5	trhR3	500	796	56°C	1 min
<i>trhH</i>	trhH5	trhH3	50	1407	52°C	2 min
<i>trhA</i>	trhA5	trhA3	1,25	351	56°C	1 min
<i>trhE</i>	trhE5	trhE3	100	782	56°C	1'5 min

Taula 3.2.6b Oligonucleòtids utilitzats per fer les RT-PCR.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
traH5	GTCTAAATCGAAGCTATTAAG
traH3	TCATTGTGCCACCTCTGATT
traJ5	GCGGATAATTCTGCTCGTG
traJ3	GTTTTTGAAAGTTAGACCACA
trhR5	CAGAATCAGATAACATCACG
trhR3	TCAATAATCCTTCAAGAGCAC
trhH5	GCGCGCTGATTTCCATGTT
trhH3	ACCTGTGCCACGAAGACTT
trhA5	GGAAGTGCATTGAATACTAA
trhA3	TCACAGAGGAATACCAGCAT
trhE5	GAAACTTCTCAGCAGGTTAAA
trhE3	AGTTACCTATTGACGGCGG
16S-1	GCTGCATGGCTGTCGTCAG
16S-3	CGCAGGTTCCCCTACGGTT

A la figura 3.2.6 veiem el resultat de les RT-PCR per cada gen. Podem veure com a 25°C hi ha una expressió més elevada en general que a 33°C. De fet, a 33°C hi ha gens dels quals no es detecta expressió a la soca salvatge. Una altra dada que podem extreure de les RT-PCRs i que confirma el que ja vam veure amb els microxips, és que l'expressió dels gens augmenta gradualment de la soca 5K R27 a la soca 5K R27-hha-hns, d'aquesta a la soca Hha3-hns R27, i per últim veiem la major expressió a la soca Hha3 hns R27-hha-hns.

Donada l'existència d'una proteïna paràloga a Hha al cromosoma d'*E.coli*, YdgT, vam voler analitzar l'efecte de la manca de totes les proteïnes de tipus Hha en la regulació dels gens estudiats. Els resultats suggereixen que les proteïnes tipus Hha juguen un paper important en la repressió de l'expressió d'aquests gens, ja que quan falten totes les còpies del gen, tant les cromosòmiques (*hha* i *ydgT*) com les plasmídiques (*orf182*), s'observa un augment de l'expressió de tots els gens analitzats a 25°C, i també en alguns a 33°C.

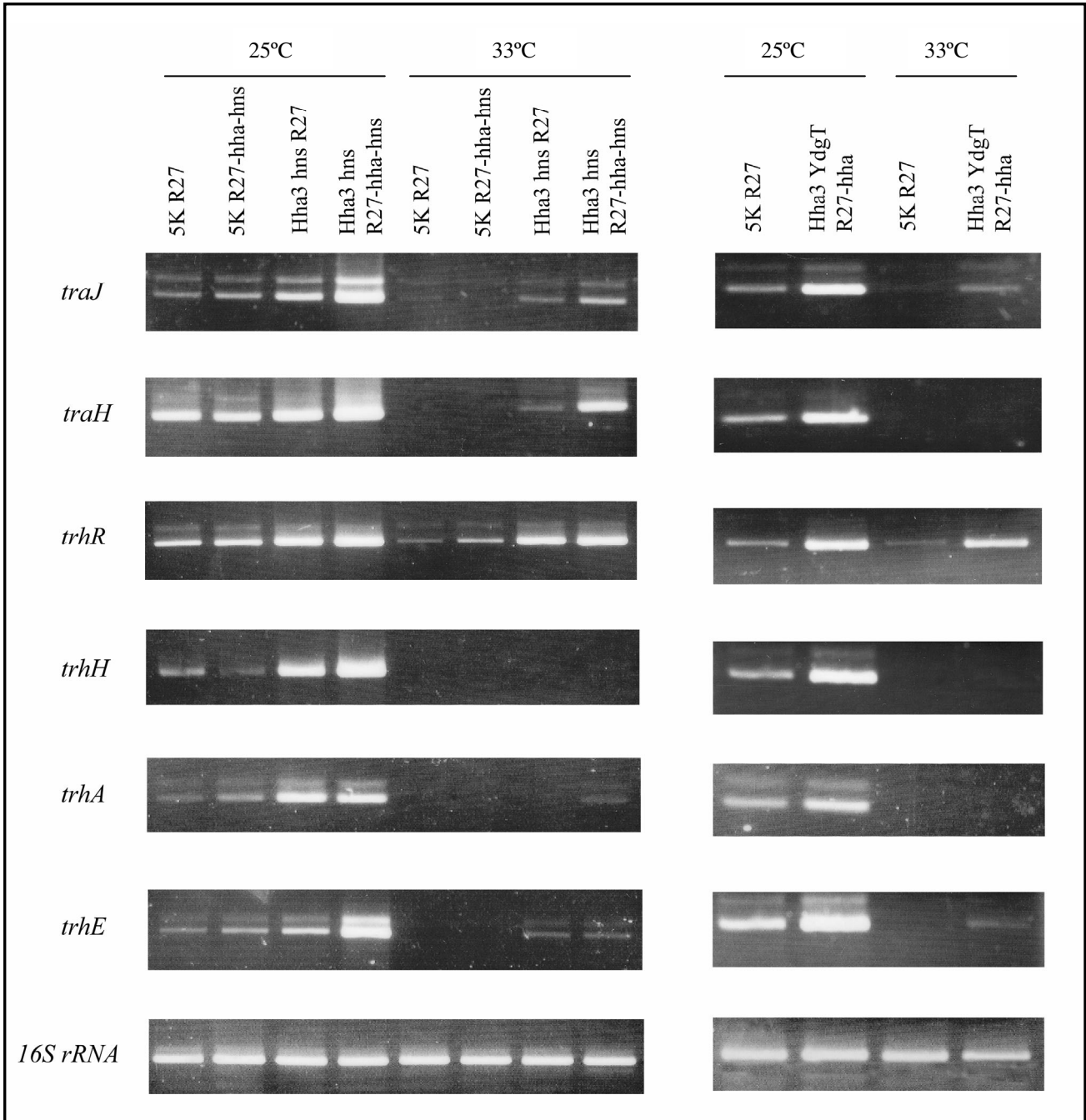


Figura 3.2.6 Resultat de les RT-PCR de cadascun dels gens analitzats

3.2.7 ASSAIGS DE RETARD EN GEL D'H-NS AMB GENS DE LES REGIONS Tra1 I Tra2 DE R27

El fet que la proteïna H-NS reprimeix la transcripció d'alguns gens responsables de la transferència per conjugació del plàsmid R27, és possible que H-NS s'uneixi preferencialment a la regió promotora d'alguns d'aquests gens. Per això

vam dur a terme assajos de retard competitiu en gel d'agarosa. Tenint en compte que no es coneixia en detall l'organització transcripcional ni de Tra1 ni de Tra2, vam decidir utilitzar els fragments de DNA corresponents als gens *traJ*, *traH*, *trhR*, *trhX* i *trhH* de la regió Tra1; i *trhA*, *trhE* i de la regió Tra2; incloent en cada fragment la regió promotora corresponent. Vam escollir els mateixos gens que vam utilitzar per l'estudi de la transcripció i a més vam afegir el gen *trhX*, per tenir un representant dels gens no essencials per a la conjugació. Un altre fet que vam tenir en compte alhora d'escollir els gens va ser que els gens *traH*, *trhR* i *trhA* semblava que estaven a l'inici de possibles operons. Tot i que no s'havia descrit fins llavors la distribució dels gens de transferència en diferents operons, sí que s'havia suggerit la possible organització dels gens de transferència en operons segons la seva distribució i direcció de transcripció (Lawley *et al.*, 2002a; 2003a).

Es van obtenir els fragments de DNA mitjançant PCR utilitzant les parelles d'oligonucleòtids descrites a la taula 3.2.7a, la seqüència dels quals està especificada a les taules 3.2.7b i 3.2.6b. El programa bàsic de PCR va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'	}	⇒ x 35 cicles
Desnaturalització: 94°C, 30''		
Hibridació: (taula 3.2.1.7a), 30''		
Elongació: 72°C, *''		
Finalització: 72°C, 10'		

(*: els temps d'elongació en cada cas s'especifiquen a la taula 3.2.7a)

Com a DNA competidor, vam fer servir fragments de DNA corresponents a la regió reguladora de l'operó *hly* del plàsmid pHly152 (els fragments S/H, S/E i S/P) que no contenen seqüències d'unió preferencial amb H-NS (Madrid *et al.*, 2002b). Aquests fragments es van obtenir per PCR. Els oligonucleòtids estan detallats a la taula 3.2.7a i la taula 3.2.7b. La temperatura d'hibridació, el temps d'elongació i la mida de cada producte de PCR estan a la taula 3.2.7a. Un cop obtinguts els fragments per PCR, eren purificats per electroelució.

Taula 3.2.7a Característiques dels fragments utilitzats als assajos de retard.

Gen/fragment	Oligonucleòtid 5'	Oligonucleòtid 3'	Mida (pb)	Temperatura hibridació	Temps elongació
<i>traJ</i>	PtraJ	traJ3	727	56°C	1 min
<i>traH</i>	PtraH	traH3	812	54°C	2 min
<i>trhR</i>	PtrhR	trhR3	1509	54°C	2 min
<i>trhH</i>	PtrhH	trhH3	1507	56°C	2 min
<i>trhA</i>	PtrhA	trhA3	895	56°C	1 min
<i>trhE</i>	PtrhE	trhE3	859	57°C	2 min
<i>trhX</i>	PtrhX	trhX3	555	56°C	1 min
S/H	HlyS	HlyH	427	58°C	1 min
S/P	HlyS	HlyP	1167	58°C	2 min
S/E	HlyS	HlyE	2302	58°C	3 min

Taula 3.2.7b Oligonucleòtids utilitzats per amplificar els diferents fragments de DNA.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
PtraH	TTTAAAAGTGGCACTATGCGT
PtraJ	CCGACAATCTGGCGCAGT
PtrhR	TTTCACGAACGGGACTTTTTT
PtrhX	GCCTAACGTAAGTAAACGA
PtrhH	ATTGCAACGAATAATGGATAAG
PtrhA	CGTTTGGCCAGAAAGCATTT
PtrhE	CGTGAAAATCGGTGTTTAGTA
HlyS	CAGACCACACCTGGAAAAAC
HlyH	GGGCTTCACTGCGAAATTCA
HlyP	GTCATGCGTGGCGACATTGA
HlyE	GACTTCGCTTGAATTCGGA

La proteïna H-NS va ser purificada, com a proteïna modificada amb una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal, amb les metodologies estàndards descrites prèviament (Nieto *et al.*, 2002).

Per la realització del retard en gel d'agarosa (apartat 2.6.8) es van fer barreges de quantitats equivalents de cada fragment corresponent al gen del plàsmid que volíem estudiar i un dels tres fragments de DNA competidor. Per a cada gen s'escollí el fragment de DNA competidor de mida més semblant. Per als gens *trhA*, *trhE* i *traH* es feu el retard amb el fragment S/P; per als gens *traJ* i *trhX* s'utilitzà el fragments S/H; i per últim per als gens *trhH* i *trhR* s'utilitzà el fragment S/E. A cada barreja de DNA se li afegiren quantitats decreixents de proteïna H-NS: 1,3 g, 0,65 g, 0,4875 g, 0,325 g i 0,1625 g. El resultat del retard competitiu es pot observar a la figura 3.2.7.

Els resultats mostren que hi ha una unió preferencial d'H-NS pels fragments utilitzats corresponents a *trhA*, *traJ*, *trhE*, *traH* i *trhX*; mentre que no s'observa aquesta preferencialitat en el cas de *trhH* i *trhR*.

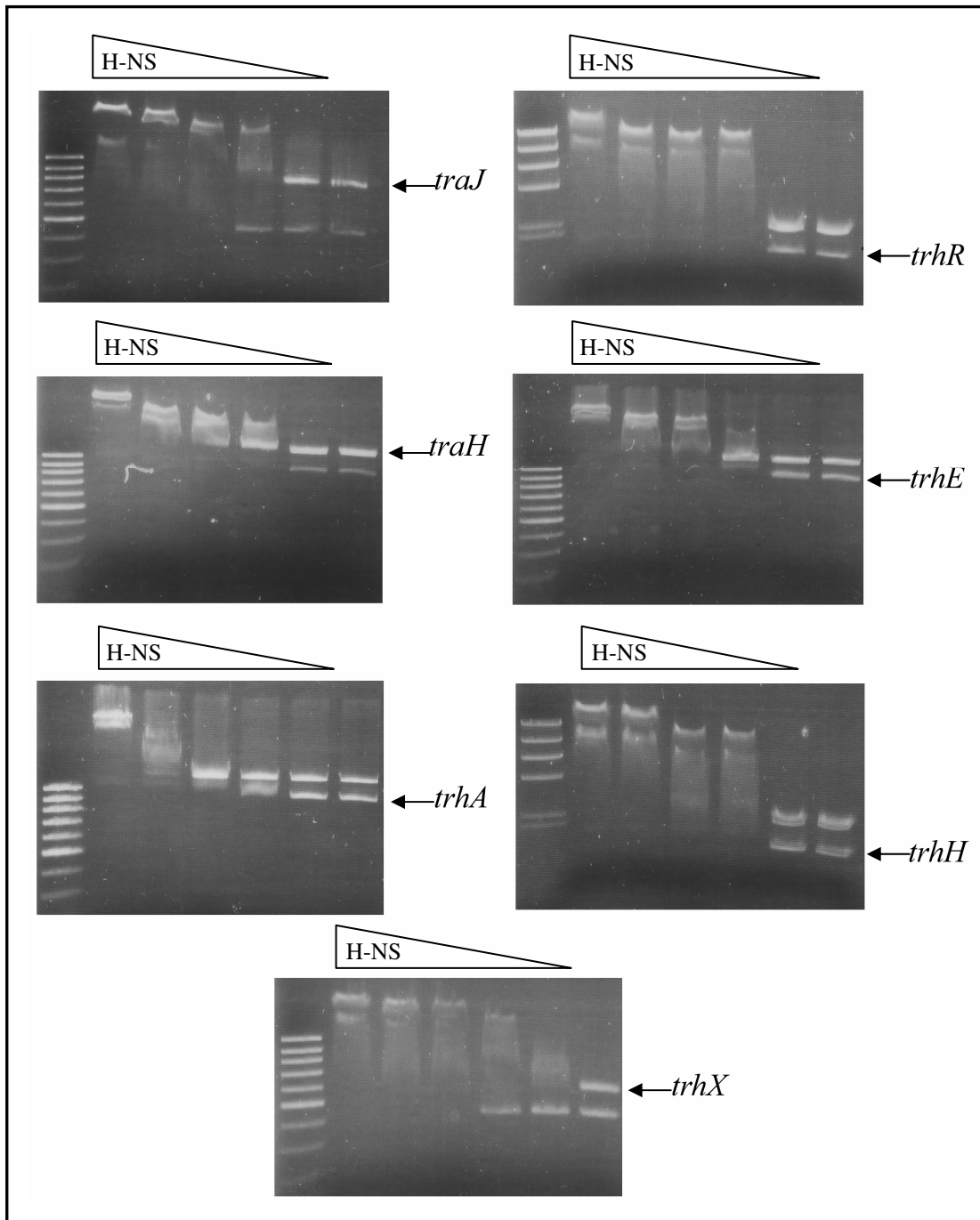


Figura 3.2.7 Efecte de la proteïna H-NS en la mobilitat electroforètica dels fragments de DNA corresponents a les regions promotores de diversos gens del plàsmid R27. El carril 1 mostra el marcador de pesos moleculars 100-bp ladder (Biotools) en tots els casos excepte en *trhR* i *trhH* que és el *HindIII* (Biotools). Les quantitats decreixents de proteïna H-NS són: 1,3 g, 0,65 g, 0,4875 g, 0,325 g, 0,1625 g i 0 g.

3.2.8 ASSAIGS DE RETARD EN GEL D'H-NS I D'HHA AMB LA REGIÓ *oriT* DE R27

Dins de la regió Tra1 de R27 s'hi troba l'origen de transferència del plàsmid (*oriT*). L'*oriT* es troba dins una regió intergènica de 757 pb on s'han identificat 285 pb que són els imprescindibles per a què actuï de regió mobilitzadora (Lawley *et al.*, 2002a). Vam voler comprovar si H-NS i Hha s'unien a aquesta regió per tal de regular la transferència del plàsmid.

El fragment de DNA utilitzat per fer aquest anàlisi es va obtenir per PCR utilitzant els oligonucleòtids 5ORIT i 123-3 (taula 3.2.1.8), amb els quals obteníem un fragment de 760 pb que contenia els 285 pb de *oriT* i part del gen *trhR*, que està just després d'*oriT*. El programa de PCR utilitzat va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'	}	⇒	x 30 cicles
Desnaturalització: 94°C, 30''			
Hibridació: 56°C, 45''			
Elongació: 72°C, 1'			
Finalització: 72°C, 10'			

Com a DNA competidor vam utilitzar el fragment S/P, obtingut tal i com s'explica en l'apartat 3.2.7.

Un cop obtinguts els fragments per PCR, purificats per electroelució per tal d'eliminar les restes de DNA motlle.

La proteïna H-NS va ser purificada tal i com s'especifica en l'apartat anterior.

La proteïna Hha també va ser purificada com a proteïna modificada amb una cua de 6 histidines a l'extrem N-terminal, utilitzant el plàsmid pET15b-HISHHA1 tal i com s'explica en l'apartat 2.8.4. El plàsmid pET15b-HISHHA1 va ser obtingut per Nacho Pons a partir del plàsmid pET-HISHHA1 (Nieto *et al.*, 2000), digerint-lo amb els enzims *PstI* i *XbaI* (apartat 2.6.3) i electroeluint el fragment de 1428 pb (apartat 2.6.7) que contenia el gen *hha* fusionat a la cua d'histidines. Aquest fragment va ser lligat (apartat 2.6.3) al plàsmid pET15b digerit amb els mateixos enzims i defosforilat (apartat 2.6.3). La lligació va ser transformada a la soca 5K d'*Escherichia coli* i es van seleccionar les colònies que contenien el plàsmid amb Ap (apartat 2.4.1.1). Es va comprovar que les colònies resultants tinguessin el plàsmid correcte digerint amb *PstI* i *XbaI* i comprovant que s'alliberava el fragment de 1428 pb.

El plàsmid pET15b-HISHHA1 va ser transformat a la soca BL21 (DE3)-Km (*hns*) per tal de dur a terme la inducció de l'expressió, l'obtenció de l'extracte cel·lular soluble i la purificació (apartat 2.8.4). Després de la purificació de la proteïna de fusió vam realitzar una electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS al 15% i tinció amb blau de Coomassie per identificar les fraccions corresponents a l'elució de la proteïna His-Hha. Vam quantificar la concentració de proteïna de la fracció escollida per Bradford (apartat 2.8.2). La concentració de la proteïna determinada va ser de 3,46 g/l.

Es va analitzar la capacitat de retardar específicament el fragment corresponent a *oriT* de les proteïnes H-NS, Hha o d'ambdues a la vegada. Per la realització del retard en gel d'agarosa es van fer barreges de quantitats equivalents del fragment corresponent a *oriT* juntament amb el fragments S/P. Es va fer un retard en el que només vam analitzar la capacitat de retardar de la proteïna H-NS, pel qual a cada barreja de DNA se li afegiren quantitats decreixents de proteïna H-NS: 1,3 g, 0,65 g, 0,4875 g, 0,325 g i 0,1625 g. Es va analitzar també la capacitat de retardar de la proteïna Hha sola i juntament amb H-NS. El resultat dels retards es pot observar a la figura 3.2.8.

Els resultats mostren una unió preferencial d'H-NS a *oriT*. A més, a baixes concentracions d'H-NS, la presència d'Hha permet la formació de complexes DNA-proteïna de baixa mobilitat diferents als que es formen amb H-NS o Hha per separat. Per tant, la presència d'Hha en les barreges de H-NS/DNA contribueix a la formació d'oligòmers més grans, tal i com es va determinar en el cas de l'operó *hly* (Nieto *et al.*, 2000).

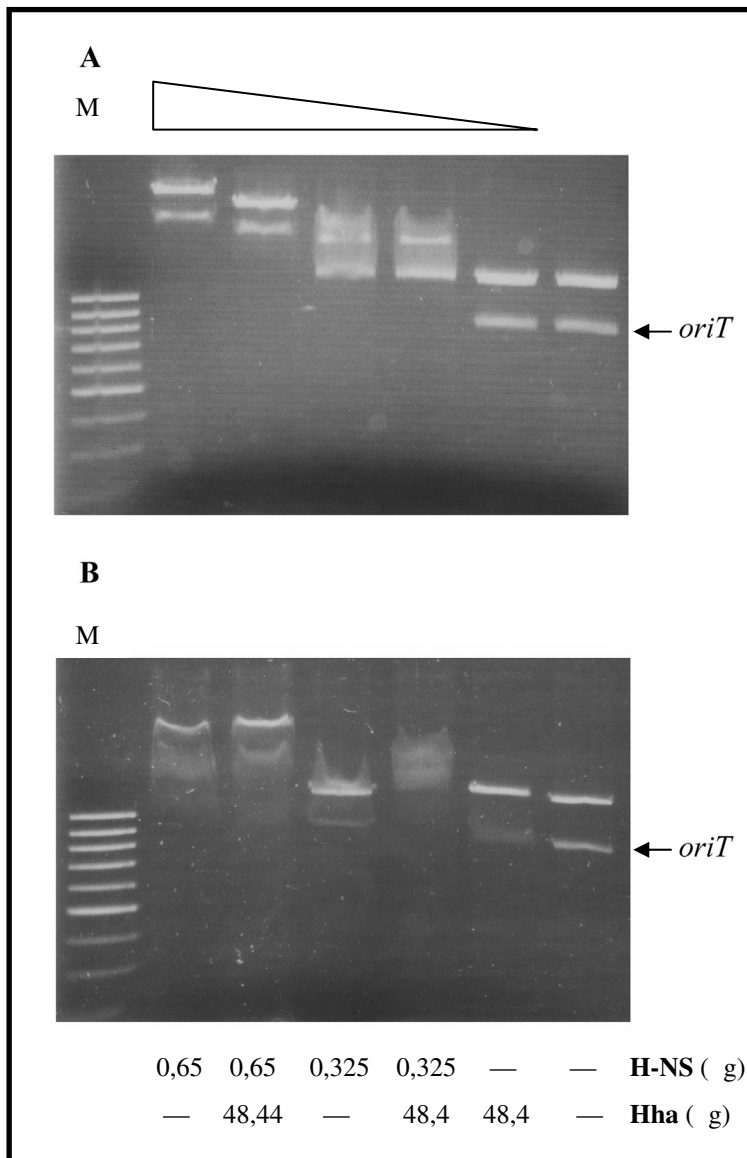


Figura 3.2.8 Efecte de les proteïnes H-NS i/o Hha en la mobilitat electroforètica del fragment de DNA corresponent a *oriT*. Els carrils M mostren el marcador de pesos moleculars 100-bp ladder (Biotools). A) Les quantitats decreixents de proteïna H-NS són: 1,3 g, 0,65 g, 0,4875 g, 0,325 g, 0,1625 g i 0 g). B) Les quantitats de les proteïnes utilitzades estan detallades a la figura.

3.2.9 OBSERVACIÓ DELS PILIS CONJUGATIUS DE SOQUES HOSTE DE R27 PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ

En els apartats anteriors s'ha demostrat que les proteïnes H-NS i Hha intervenen en la regulació de la conjugació de R27, mitjançant l'anàlisi de la freqüència de conjugació i de la transcripció dels gens implicats en la transferència en diferents fons genètics. Una altra anàlisi de com aquestes proteïnes regulen l'expressió dels gens de transferència i la conjugació és l'observació de la presència de pilis conjugatius. Les cèl·lules portadores del plàsmid R27 produeixen pilis flexibles d'uns 11 nm (Maher *et al.*, 1993; Bradley, 1980) que es poden observar amb tinció negativa per Microscòpia Electrònica de Transmissió. Tot i així, la formació de

pilis en cèl·lules portadores de R27 en condicions permissives només es donarà amb una freqüència de 10^{-3} pilis per cèl·lula (Maher *et al.*, 1993). Per aquesta raó és difícil poder calcular la freqüència de formació d'aquests pilis per observació al microscopi. Un problema afegit és que després de la manipulació dels cultius per a l'observació de pilis, aquests es poden trencar. Per tant, ens vam limitar només a l'observació de les cèl·lules i a la identificació de la presència de pilis en les preparacions.

La preparació de les mostres i l'observació dels pilis per Microscopi Electrònic de Transmissió es va fer tal i com s'explica l'apartat 2.8.9. Es van preparar cultius de la soca salvatge 5K R27 i de la soca mutant pels al·lels *hha* i *hns* cromosòmics i plasmídics, Hha3 hns R27-hha-hns, tant a 25°C com a 33°C. En les figura 3.2.9a, 3.2.9b, 3.2.9c i 3.2.9d podem observar algunes de les imatges obtingudes que reflexen els resultats.

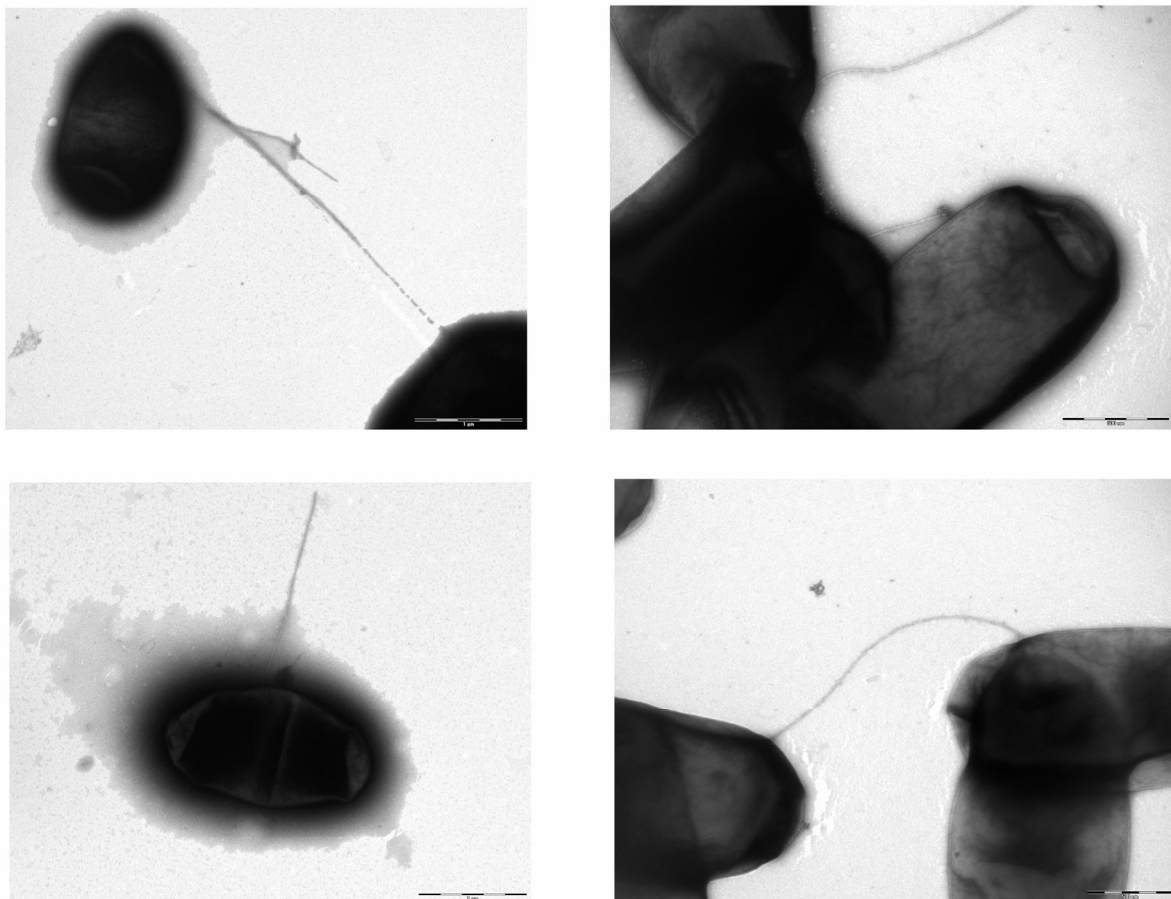


Figura 3.2.9a Observació en microscopi electrònic de transmissió de cèl·lules de la soca 5K R27 crescudes a 25°C. Les escales de les imatges de l'esquerra corresponen a 1 μ m, i les de les imatges de la dreta corresponen a 500 nm.

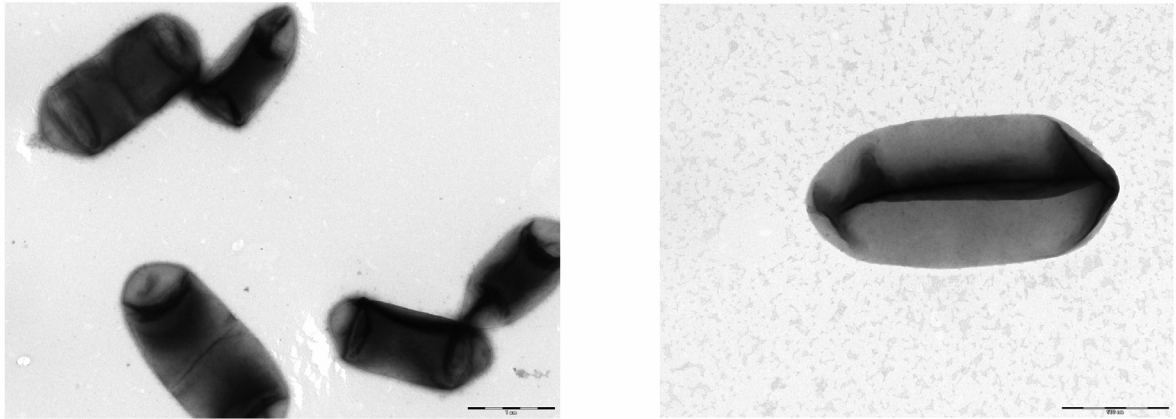


Figura 3.2.9b Imatges de cèl·lules de la soca 5K R27 cultivades a 33°C. Les escales són, per la imatge de l'esquerra, 1 µm, i per la imatge de la dreta de 500 nm.

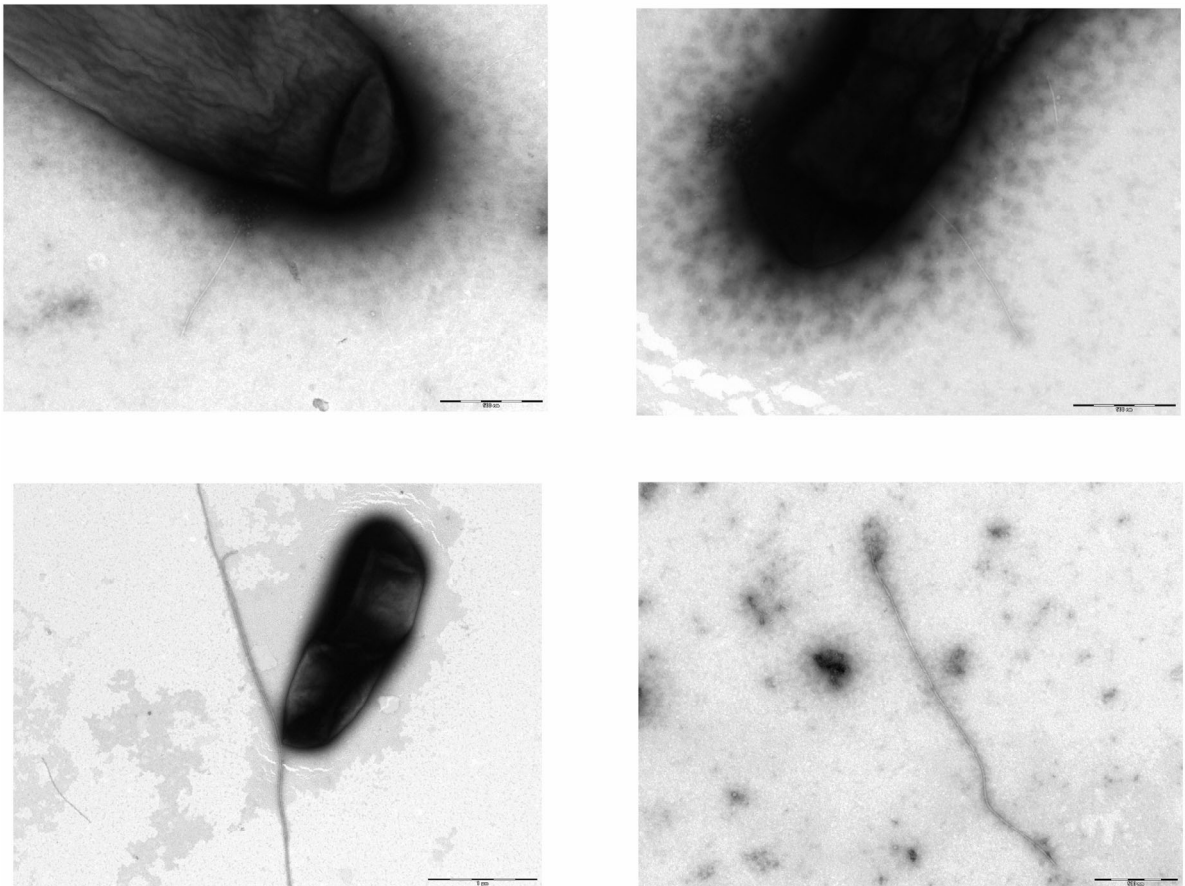


Figura 3.2.9c Observació de cèl·lules de la soca Hha3 hns R27-hha-hns crescudes a 25°C. Les escales són de 1 µm per la imatge inferior a l'esquerra, i de 500 nm per a la resta.

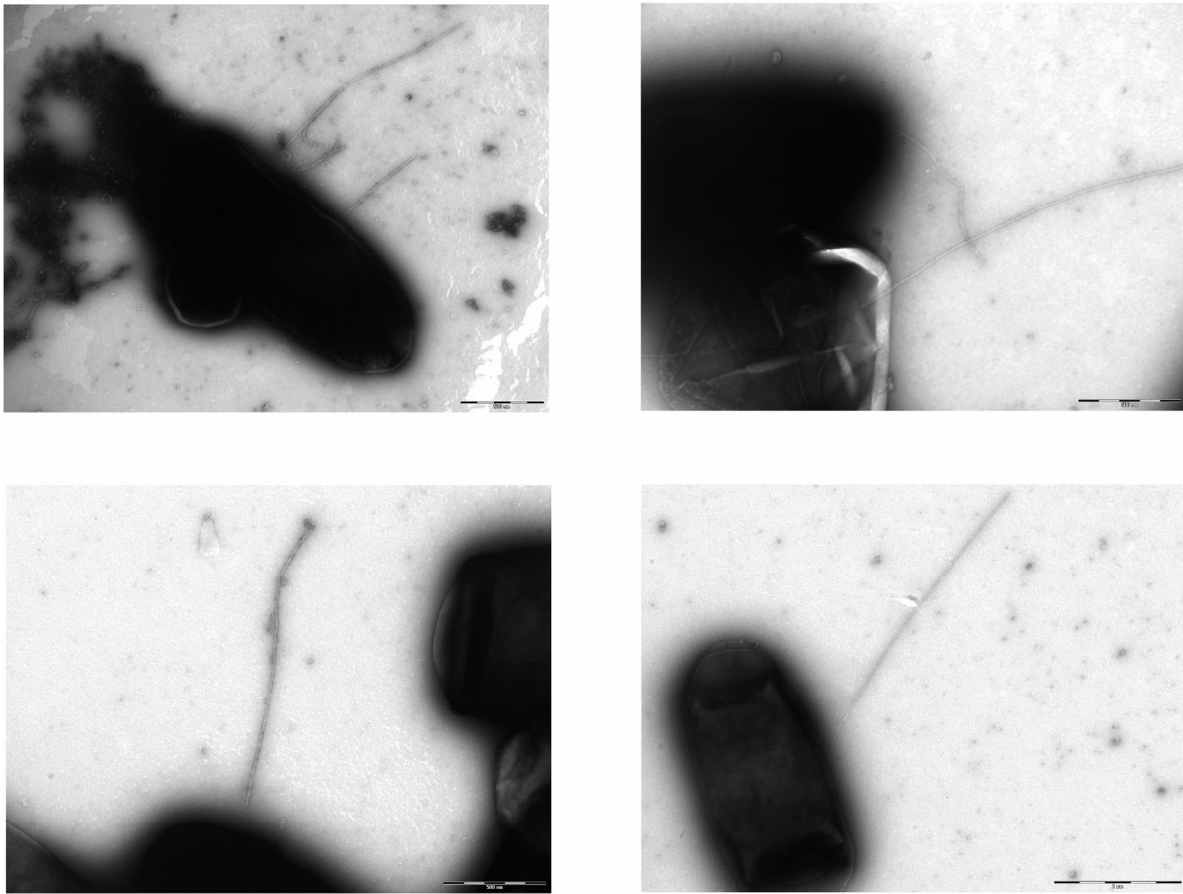


Figura 3.2.9d Cèl·lules de la soca Hha3 hns R27-hha-hns crescudes a 33°C. Les escales són de 500 nm per totes les imatges, excepte per la imatge inferior a la dreta que és de 1 µm.

Com es pot observar en les microfotografies obtingudes, la soca salvatge amb el plàsmid salvatge forma pilis quan creix a 25°C, però en canvi no se n'observen quan les cèl·lules han crescut a 33°C. Pel contrari, la soca que no té cap de les còpies dels gens *hha* i *hns* (ni cromosòmics ni plasmídics) forma pilis observables a ambdues temperatures. Fins i tot, era més fàcil observar cèl·lules amb pili quan es manipulaven cultius de la soca Hha3 hns R27-hha-hns crescuts a 33°C que no pas en cèl·lules de la soca 5K R27 cultivades a 25°C.

3.2.10 COMPLEMENTACIÓ DE LES MUTACIONS *hha* I *hns* CROMOSÒMIQUES PER LES SEVES CÒPIES PLASMÍDIQUES: *orf164* I *orf182*

Un cop comprovat que les proteïnes Hha i H-NS, tant codificades al cromosoma com al plàsmid R27, intervenen en la regulació de la transcripció de gens de transferència de R27, vam decidir estudiar si les proteïnes Hha i H-NS codificades al plàsmid eren capaces de realitzar també algunes de les funcions de les proteïnes codificades al cromosoma. Per dur a terme aquest propòsit vam analitzar si les proteïnes plasmídiques podien complementar algun dels fenotips associats a les mutacions *hha* i *hns*.

La mutació *hns* provoca a les cèl·lules una disminució de la taxa de creixement a 25°C (Dersch *et al.*, 1994). Vam analitzar quin era l'efecte de la presència de R27 (per tant, de la proteïna Orf164) sobre la termosensibilitat d'una soca *hns*. Es van seguir les corbes de creixement de les soques 5K (*wt*), 5K *hns* (*hns*), 5K *hns* R27 i 5K *hns* R27-*hns*. El creixement es va dur a terme a 25°C en agitació (200 rpm) i es va mesurar la DO a 600 nm. A la figura 3.2.10a podem veure les corbes de creixement obtingudes i podem observar que la disminució de la taxa de creixement causada per la mutació *hns* queda parcialment compensada per la presència de R27. En canvi no és així quan el gen *hns* de R27 està inactivat (R27-*hns*), donant un fenotip sensible a la temperatura característic dels mutants *hns*.

Un altre fenotip associat a la mutació *hns* és la sobreexpressió de l'operó *hly* d'*Escherichia coli* (Madrid *et al.*, 2002b). Amb la finalitat de comprovar si la còpia del gen *hns* de R27 complementava aquest fenotip vam realitzar la mesura de l'activitat hemolítica utilitzant el plàsmid pANN202-312. Aquest plàsmid conté el determinant hemolític *hlyCABD* del plàsmid pHly152 però no conté la seqüència reguladora *hlyR*. A més, a diferència del plàsmid salvatge, aquest és d'elevat número de còpies. Per totes aquestes raons, el plàsmid pANN202-312 era un bon candidat ja que la quantitat d'hemolisina que es pot produir és més elevada, i per tant les diferències més significatives. Es van transformar les soques 5K, 5K *hns*, 5K *hns* R27 i 5K *hns* R27-*hns* amb el plàsmid pANN202-312, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.4.1. Les colònies transformants es van seleccionar per la resistència al cloramfenicol en plaques d'agar sang. Vam mesurar l'activitat hemolítica (veure apartat 2.8.8.2) de sobrenedants de cultius de les soques crescudes a 37°C, on

l'expressió de l'operó *hly* és més elevada (Mouriño *et al.*, 1994). El resultat de la valoració de l'activitat hemolítica el podem veure a la figura 3.2.10a. Es pot observar que la presència del plàsmid R27, amb una còpia de la proteïna H-NS (Orf164) provoca la restauració dels nivells d'hemolisina característics de la soca salvatge. Aquesta complementació és anul·lada si el plàsmid R27 és portador de la mutació a *orf164* (R27-hns), demostrant que la complementació obtinguda és deguda a aquesta proteïna.

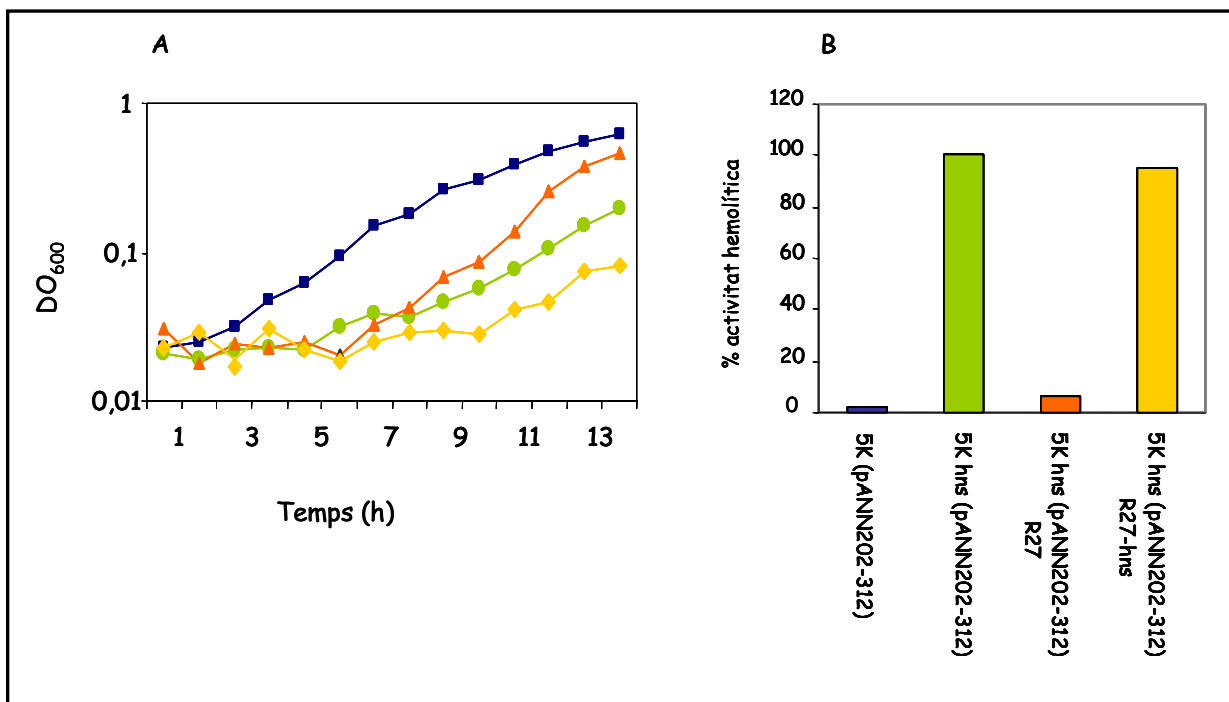


Figura 3.2.10a Complementació d'alguns fenotips de la mutació *hns*. A) Corba de creixement a 25°C de les soques 5K (■), 5K *hns* (●), 5K *hns* R27 (▲) i 5K *hns* R27-*hns* (◆). DO_{600} és la densitat òptica a 600 nm. B) Activitat hemolítica dels sobredants de les soques salvatge i mutants transformades amb el plàsmid pANN202-312. L'activitat hemolítica de la soca 5K *hns* (pANN202-312), considerada un 100%, va ser de 1327 U.

Així mateix, vam voler comprovar si l'al·lel *hha* de R27 era capaç de complementar l'efecte de la mutació cromosòmica d'*hha*. Altre cop vam utilitzar el model d'expressió dels gens *hly*, que també estan afectats per la mutació *hha* (Nieto *et al.*, 1991). Es va procedir de la mateixa manera, introduint per transformació el plàsmid pANN202-312 a les soques 5K (*wt*), Hha3 (*hha*⁻), Hha3 R27 i Hha3 R27-*hha*. Es va mesurar l'activitat hemolítica dels sobredants dels cultius de les soques obtingudes (veure apartat 2.8.8.2). El resultat el podem veure a la figura 3.2.10b, on

podem observar que el plàsmid R27 redueix parcialment la desregulació observada en la soca Hha3, restaurant en un 60% el fenotip de la soca salvatge. Aquest efecte que no és tant clar quan la complementació s'intenta amb el plàsmid R27-hha.

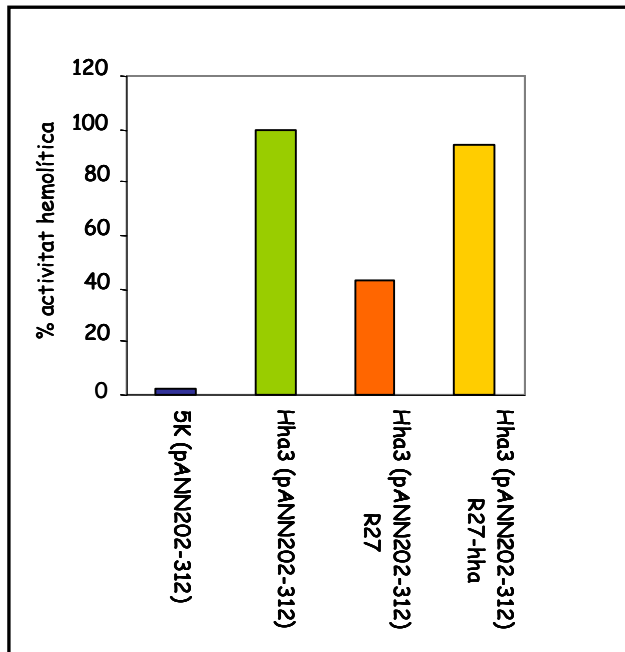


Figura 3.2.10b Complementació del fenotip hemolític de la mutació *hha* per part del plàsmid R27. L'activitat hemolítica de la soca Hha3 (pANN202-312), que vam considerar com a 100%, va ser de 436 U.

Finalment, vam comprovar si el plàsmid R27 era capaç de complementar ambdues mutacions a la vegada, *hha* i *hns*, utilitzant el mateix model de l'operó hemolític. Vam transformar el plàsmid pANN202-312 al conjunt de soques: 5K (*wt*), Hha3 *hns* (*hha*⁻ *hns*⁻), Hha3 *hns* R27 i Hha3 *hns* R27-hha-*hns*. A més de mesurar l'activitat hemolítica dels sobredants dels cultius (veure apartat 2.8.8.2), també vam seguir el creixement d'aquestes soques (en medi LB, a 37°C i a 200 rpm) mitjançant la DO a 600 nm. Aquests resultats es mostren a la figura 3.2.10c. Respecte a les corbes de creixement, la presència de R27 complementa parcialment el creixement lent de la soca Hha3 *hns* (pANN202312), encara que no s'arriba a la taxa de creixement de la soca 5K (pANN202312). Pel que fa a l'activitat hemolítica, el plàsmid R27 provoca una disminució de quatre cops la producció d'hemolisina; al contrari, el plàsmid R27-hha-*hns* pràcticament no altera els nivells d'activitat hemolítica.

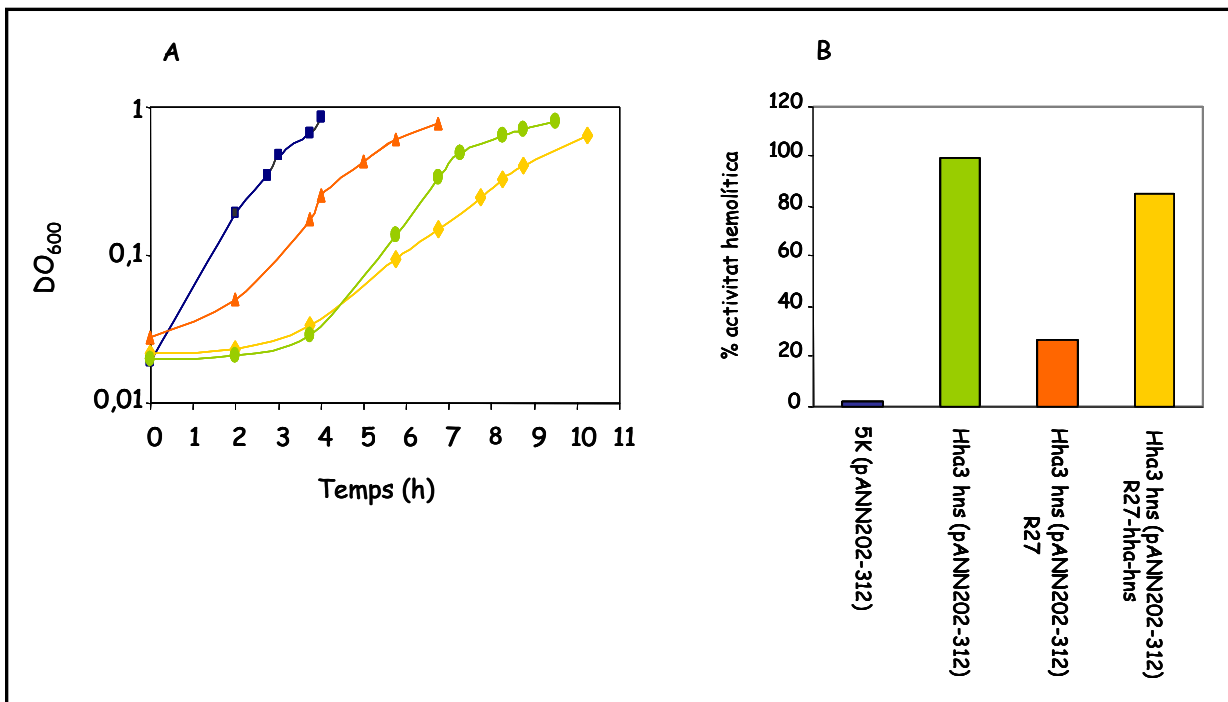


Figura 3.2.10c Complementació d'alguns fenotips de la doble mutació *hha hns*. A) Corbes de creixement de les soques 5K (pANN202-312) (■), Hha3 hns (pANN202-312) (●), Hha3 hns R27 (pANN202-312) (▲) i Hha3 hns R27-hha-hns (pANN202-312) (◆). DO₆₀₀ és la densitat òptica a 600 nm. B) Activitat hemolítica dels sobredants de cultius de les soques salvatge i mutants transformades amb el plàsmid pANN202-312. L'activitat hemolítica de la soca Hha3 hns (pANN202-312) que es va considerar el 100%, va ser de 7630 U.

3.2.11 INTERACCIÓ DE HIS-HHA AMB LA ORF164

Ha estat descrit que la proteïna Hha d'*Escherichia coli* interacciona amb la proteïna H-NS, formant un complex que intervé en la regulació de l'expressió de l'operó de l'hemolisina (Nieto *et al.*, 2000). També s'ha demostrat la unió de la proteïna YdgT (homòloga a Hha) a H-NS i al seu anàleg StpA (Paytubi *et al.*, 2004). Donada la homologia entre H-NS i Orf164, ens vam plantejar la hipòtesi d'una possible interacció entre la proteïna Orf164 i Hha. El fet que les dues proteïnes, Hha i ORF164, puguin estar en baixes concentracions a la cèl·lula, dificultant la seva detecció en gels d'acrilamida, va fer necessari dur a terme una sobreexpressió d'aquestes dues proteïnes per comprovar si posteriorment interaccionaven.

El primer que es va fer va ser clonar la proteïna Orf164 en un vector d'expressió. Vam utilitzar el plàsmid pET15b, un vector d'expressió que permet

incorporar a la proteïna clonada una cua d'histidines. Però en el aquest cas no volíem incorporar una cua d'histidines, i per tant, el que vam fer va ser clonar la seqüència del gen *orf164* entre les dianes *NcoI* i *BamHI*, eliminant així la cua d'histidines. Vam obtenir la seqüència del gen *orf164* per amplificació per PCR (apartat 2.6.4) a partir de colònia (5K R27) utilitzant dos oligonucleòtids que incorporaven dianes *NcoI* (5'ORF164) i *BamHI* (ORF164BAM), i que donaven un producte de 440 pb. La seqüència dels oligonucleòtids la podem veure a la taula 3.2.11. El programa de PCR utilitzat va ser:

Desnaturalització: 94°C, 5'	}	⇒	x 40 cicles
Desnaturalització: 94°C, 30''			
Hibridació: 56°C, 40''			
Elongació: 72°C, 1'			
Finalització: 72°C, 7'			

El producte de PCR va ser purificat per electroelució (apartat 2.6.7) i digerit amb els enzims *NcoI* i *BamHI* (apartat 2.6.3). El plàsmid pET15b també va ser digerit amb els mateixos enzims i defosforilat (apartat 2.6.3). Seguidament es va lligar el vector amb el fragment corresponent a la seqüència d'*orf164* i es va transformar a la soca 5K d'*Escherichia coli*. Es van seleccionar les colònies transformants per resistència a Ap. Es va comprovar que portaven el plàsmid correcte per PCR, utilitzant les mateixes condicions que per amplificar el fragment clonat, i per digestió del plàsmid amb els enzims *NcoI* i *BamHI* per tal d'alliberar la banda corresponent a *orf164*. El plàsmid resultant el vam anomenar pET-ORF164.

Taula 3.2.11 Oligonucleòtids utilitzats per amplificar la *orf164*.

Oligonucleòtids	Seqüència 5'-3'
5'ORF164	GTTCGGGATCCTAATTTCAACTTAG
ORF164BAM	ACTCTTAGTGAGGTCCCATGGCCG

Una vegada construït el plàsmid pET-ORF164, vam passar a la inducció de l'expressió de la proteïna ORF164 a la soca d'*Escherichia coli* BL21 (DE3)-Km, soca mutant *hns* per tal d'evitar posteriors unions de la proteïna H-NS a HisHha. A partir d'un cultiu de 500 ml vam obtenir 10 ml d'extracte cel·lular soluble (apartat 2.8.4.2).

L'extracte corresponent a la sobreexpressió de la proteïna His-Hha el vam obtenir a partir d'una inducció de la seva expressió utilitzant el plàsmid pET15b-HISHHA1 a la soca BL21 (DE3)-Km a partir de 500 ml de cultiu.

Vam abordar l'experiment per detectar la possible interacció partint de la barreja dels dos extractes obtinguts en els que s'havia sobreexpressat per una banda His-Hha, i per una altra ORF164. A la barreja dels extractes se li van afegir 500 µl de Ni-NTA agarosa. La barreja es va incubar durant 5 hores a 4°C, en agitació orbital, per tal de permetre la unió entre proteïnes, si és que existia, i deixar que His-Hha unida o no a ORF164 s'unís a la matriu d'agarosa.

A continuació es va passar a realitzar els rentats de la matriu d'agarosa i l'elució de les proteïnes tal i com està descrit a l'apartat 2.8.4.3. Les fraccions obtingudes, es van analitzar en gel de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS al 15% (apartat 2.8.5.1.1). Les fraccions corresponents a l'elució de les proteïnes retengudes per la matriu d'agarosa, van resultar força brutes, fet que dificultava la identificació de la proteïna His-Hha. Per aquesta raó vam decidir realitzar un western blotting per detectar Hha i ORF164, amb la primera i última fraccions del rentat i dues de les fraccions d'elució, amb anticossos anti-Hha i anticossos anti-H-NS (l'elevada homologia entre ambdues proteïnes feia pensar que els anticossos anti-H-NS reconeixerien la proteïna Orf164). En paral·lel vam fer una electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS al 15% (apartat 2.8.5.1.1) i tinció amb Blau de Coomassie (2.8.5.3).

A la figura 3.2.11 podem veure el resultat dels western blotting i de l'electroforesi. En el gel de poliacrilamida s'observa que les fraccions corresponents a l'elució són força brutes, tot i que l'últim rentat és net. Tot i que en el gel de poliacrilamida no es pot identificar la proteïna His-Hha, si que es pot detectar en el western blotting amb anticossos anti-Hha, i només a les fraccions corresponents a l'elució de les proteïnes unides. Es pot observar que els anticossos anti-H-NS són capaços de reconèixer la proteïna ORF164, i a més aquesta només la trobem en les fraccions d'elució, és a dir, coeluint amb HisHha. Per tant, en principi, podem dir que la proteïna ORF164 interacciona amb His-Hha. La immunodetecció amb H-NS permet la identificació de diverses bandes. Donat el pes molecular de la proteïna Orf164 al voltant de 15 kDa no podem descartar la presència de formes oligomèriques.

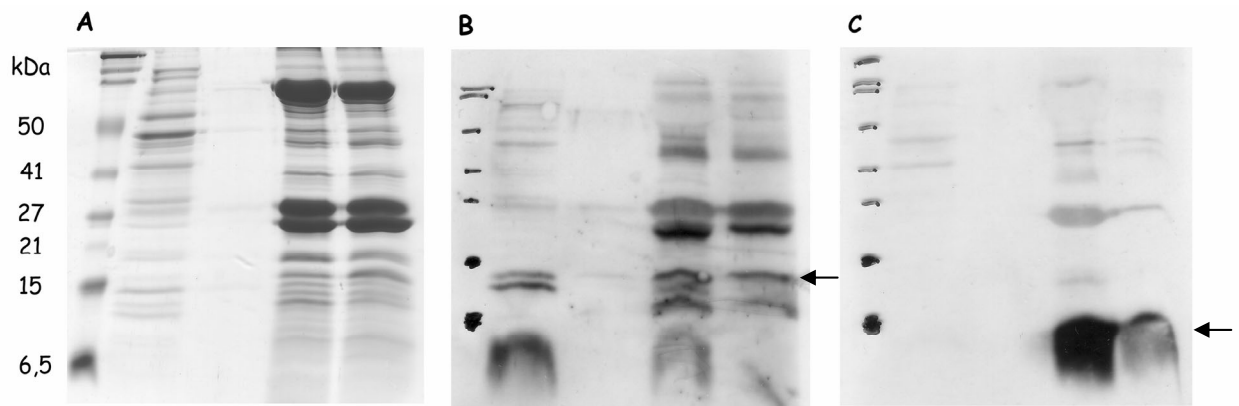


Figura 3.2.11 Interacció d'His-Hha i ORF164. A: electroforesi en Tris-Glicina-SDS i tinció amb Coomassie. B: “western blotting” amb anti-H-NS, la fletxa indica la proteïna Orf164. C: western blotting amb anti-Hha, la fletxa indica la proteïna Hha. El primer carril correspon al marcador de pesos moleculars Pre-stained Broad Range (Bio-Rad). El segon i tercer carrils corresponen a les fraccions del primer i últim rentat respectivament. El quart i cinquè carrils corresponen a dues de les fraccions d'elució.

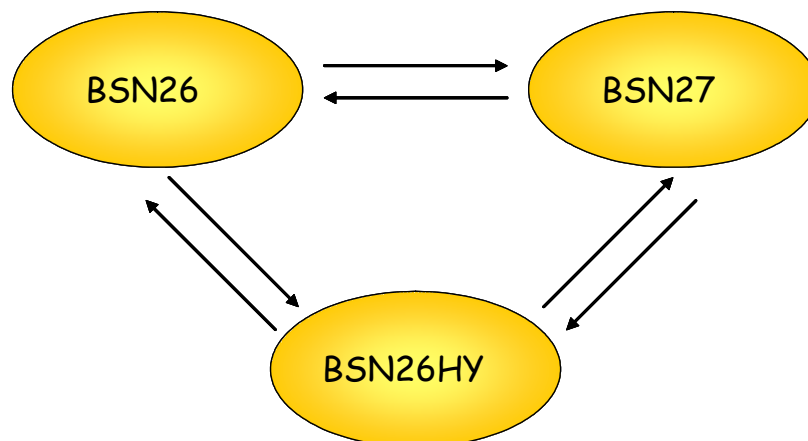
3.3 ANÀLISI TRANSCRIPTÒMIC DE L'EFECTE DE LES MUTACIONS *hns* O *hha ydgT* EN EL PATRÓ D'EXPRESSIÓ GÈNICA A *E. coli*

Els resultats referits en l'apartat anterior d'aquesta memòria reforcen la importància de la interacció del complex Hha/H-NS modulant l'expressió gènica. Per altra banda, la identificació del paràleg d'Hha, YdgT, al cromosoma d'*E. coli* va posar de manifest que els efectes d'una mutació *hha* poden quedar atenuats per una sobreexpressió d'*ydgT* (Paytubi *et al.*, 2004). Tanmateix, es va poder construir una soca *hha ydgT*. Teòricament el fenotip d'aquest mutant hauria de manifestar l'efecte real de la mutació *hha*. Per tant, vam decidir avaluar l'impacte de la proteïna Hha en la regulació gènica d'*E. coli*, i comparar-lo amb el de la mutació *hns*, per tal d'intentar establir la relació entre la regulació per H-NS i per Hha/YdgT.

L'objectiu d'aquest apartat ha estat la realització d'un estudi de l'expressió gènica global en soques d'*Escherichia coli* mutants *hns* i doble mutants *hha ydgT* per tal de determinar quins gens estan afectats en cadascun dels fons genètics així com intentar establir la relació entre la regulació per H-NS i per Hha/YdgT.

3.3.1 DISSENY EXPERIMENTAL

Atès l'interès de comparar tant els mutants amb el tipus salvatge com els mutants entre ells, es va optar per un disseny circular, com el que es mostra en la figura següent:



En cada cas les fletxes en doble sentit indiquen que s'ha efectuat un "dye-swap", és a dir intercanvi del fluorocrom utilitzat, per controlar l'absorció diferencial dels colorants.

Per a aquest estudi vam utilitzar microxips comercials de la soca d'*Escherichia coli* K12 descrits a l'apartat 2.7.4.1.2.

Es va aïllar el RNA total (veure apartat 2.7.1.2) de les soques isogèniques BSN26 (wt), BSN27 (*hns*) i BSN26HY (*hha ydgt*) crescudes en LB, a 37°C i a 200 rpm fins a una DO a 600nm de 0,5. Per tal d'eliminar les possibles restes de DNA que hi pogués haver en les mostres de RNA, es va fer una digestió amb DNasaI (apartat 2.7.3.1). Vam fer un marcatge indirecte del RNA (apartat 2.7.4.2), procés que inclou dos passos: en primer lloc passar el RNA a cDNA modificat amb amino-alils (AA), i en segon lloc unir els fluorocroms (Cy3 o Cy5) als amino-alils. Per a la hibridació vam barrejar de dues en dues les mostres de cDNA que volíem comparar segons s'ha mostrat en el disseny experimental, en tots els casos una marcada amb un fluorocrom i la segona marcada amb l'altre fluorocrom (apartat 2.7.4.3.2). La lectura dels resultats es va fer tal i com s'explica a l'apartat 2.7.4.4. Tot això es va realitzar amb dos aïllaments de RNA per cada mostra i a més, per cada aïllament de RNA es van fer dues rèpliques, una de les quals corresponia al "dye-swap" (intercanvi de

fluorocroms). Per tant, en total es van fer quatre rèpliques. A partir d'aquí vam obtenir tota una bateria de dades que es van haver de processar.

3.3.2 ANÀLISI DE LES IMATGES

Un cop avaluades les diverses imatges fent servir els criteris esmentats en l'apartat 2.7.4.5.1 vam seleccionar les més correctes per a cada condició estudiada. Aquestes imatges es mostren en l'Annex 2, apartat A, juntament amb un llistat amb les característiques de cadascuna (dia que es van obtenir i mostres a què corresponen cadascuna). Vam estudiar les correlacions entre les imatges seleccionades (taula 3.3.2) segons es descriu en l'apartat 2.7.4.5.2. La correlació entre les rèpliques biològiques, marcades amb groc a la taula són moderades (0.5-0.6), això suggereix una elevada variabilitat que podria donar lloc a alguns falsos negatius.

Taula 3.3.2 Correlacions de les imatges seleccionades.

	1-W-M1	2-W-M2	3-M2-M1	4-M1-W	5-M2-W	6-M1-M2	7-W-M1	9-M2-M1	8-W-M2	10-M1-W	11-M2-W	12-M1-M2
1-W-M1	1,00	0,55	0,75	-0,12	0,18	0,03	0,57	0,43	0,39	-0,14	0,17	0,05
2-W-M2	0,55	1,00	0,39	0,41	0,48	0,56	0,22	0,12	0,50	0,33	0,44	0,53
3-M2-M1	0,75	0,39	1,00	-0,02	0,24	-0,01	0,55	0,57	0,29	-0,09	0,28	-0,05
4-M1-W	-0,12	0,41	-0,02	1,00	0,74	0,73	-0,22	-0,17	0,09	0,69	0,59	0,62
5-M2-W	0,18	0,48	0,24	0,74	1,00	0,79	-0,10	-0,12	0,11	0,54	0,53	0,50
6-M1-M2	0,03	0,56	-0,01	0,73	0,79	1,00	-0,14	-0,28	0,22	0,50	0,38	0,59
7-W-M1	0,57	0,22	0,55	-0,22	-0,10	-0,14	1,00	0,66	0,58	-0,54	-0,10	-0,27
9-M2-M1	0,43	0,12	0,56	-0,17	-0,12	-0,28	0,66	1,00	0,27	-0,37	0,00	-0,37
8-W-M2	0,39	0,46	0,29	0,09	0,11	0,22	0,56	0,27	1,00	-0,15	-0,06	0,27
10-M1-W	-0,14	0,33	-0,09	0,69	0,54	0,50	-0,54	-0,37	-0,15	1,00	0,73	0,73
11-M2-W	0,18	0,44	0,28	0,59	0,53	0,38	-0,10	0,00	-0,06	0,73	1,00	0,51
12-M1-M2	0,05	0,53	-0,05	0,62	0,50	0,59	-0,27	-0,37	0,27	0,73	0,51	1,00

Amb les dades dels microxips es van fer uns diagnòstics inicials, que ens van donar una sèrie d'imatges per cada microxip que ens van ajudar a arribar a una conclusió final de com havíem de corregir les dades. Bàsicament es tractava de:

- “M-A plots” on es representa, per a cada xip, la intensitat en funció del valor relatiu d'expressió per a tots els punts, mostrant amb colors diferents els valors dels gens i els controls.

- “Boxplots” que mostren la distribució dels punts de cada sector del microxip.
- “Image plots”: representen les imatges per a detectar irregularitats espacials.

A la figura 3.3.2a podem observar un exemple de “Image plots” per una de les imatges dels microxips realitzats i a la figura 3.3.2b veiem el “M-A plot” i el “Boxplot” pel mateix microxip. La resta d’imatges obtingudes per cadascun dels microxips per tal de realitzar els diagnòstics inicials les podem trobar a l’Annex 2, apartat B.

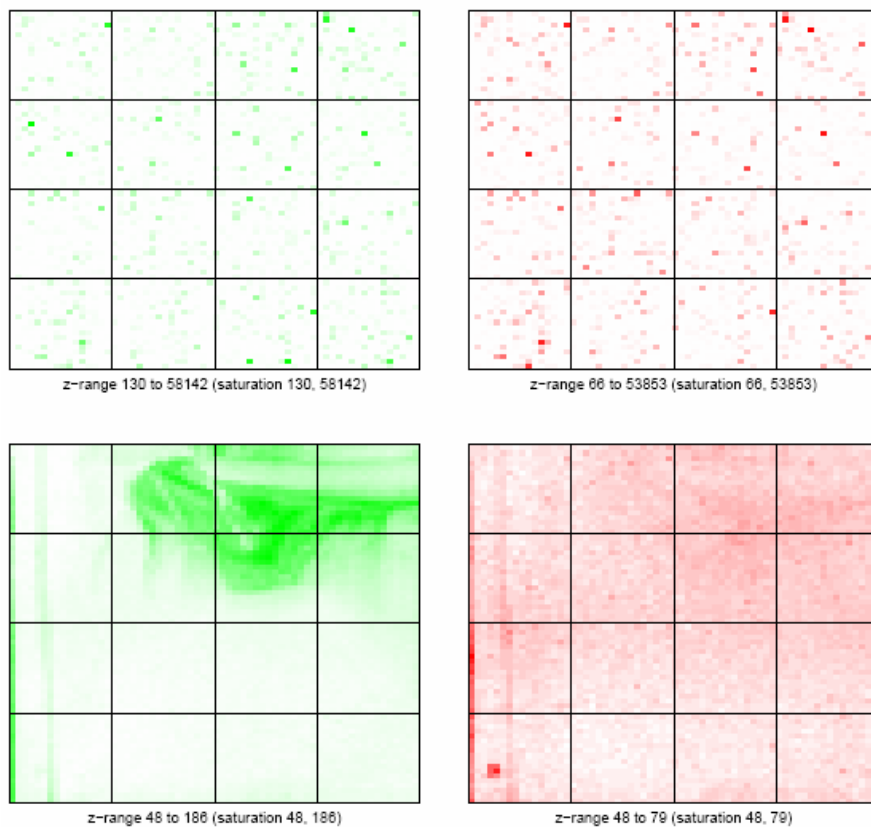


Figura 3.3.2a “Image plots” de la senyal i del soroll de fons del mateix microxip.

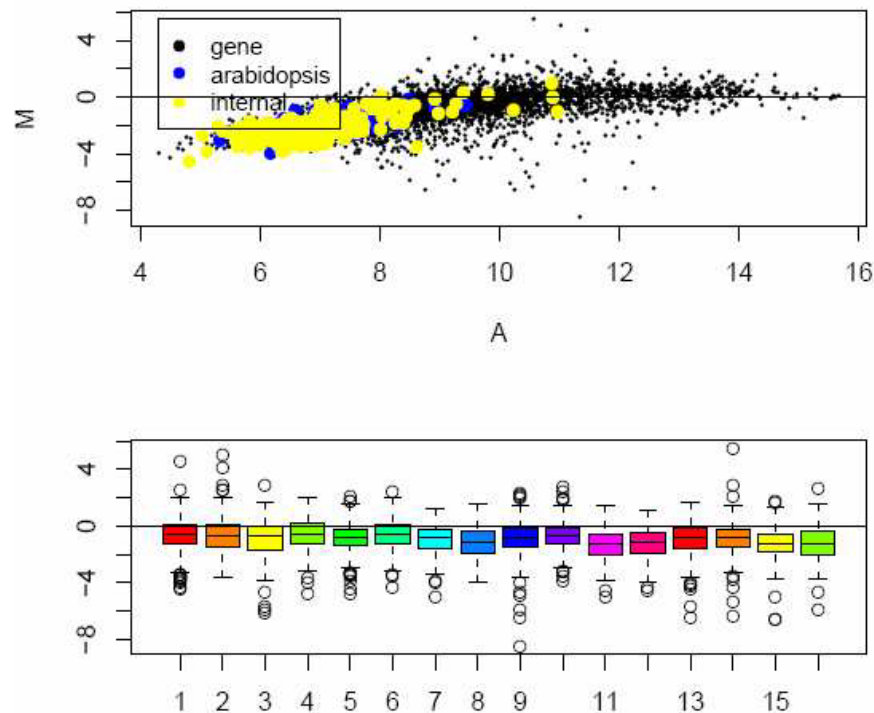


Figura 3.3.2b “M-A plot” (part superior) i “Boxplot” (part inferior) per un dels microxips.

Les imatges de la figura 3.3.2a mostren la necessitat d'efectuar una correcció per al fons, ja que aquest apareix força i, a més de manera heterogènia segons la zona del microxip. Les imatges de la figura 3.3.2b mostren la necessitat de normalitzar, ja que els punts no estan centrats simètricament en el zero.

3.3.3 PREPROCESSAT: FILTRATGE I NORMALITZACIÓ

Per al preprocessat es va seguir la metodologia descrita a l'apartat 2.7.4.5.3. L'eliminació del soroll de fons es fa de manera que no quedin intensitats negatives i ajustant també pels punts amb un canal buit. La figura 3.3.3a n'és un exemple per al cas d'un dels microxips. En l'Annex 2, apartat C, hi trobem la resta d'imatges de diagnòstic resultat de l'eliminació del soroll de fons.

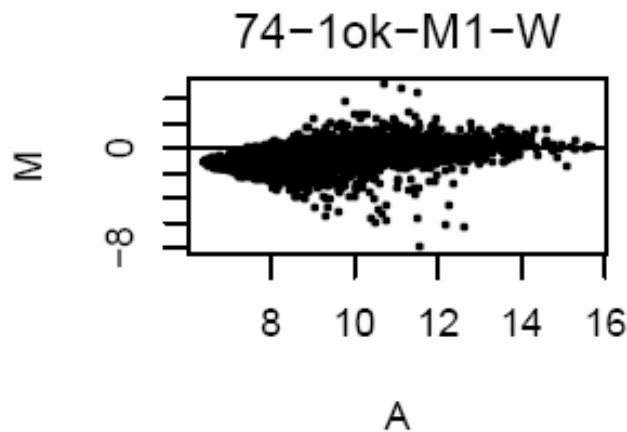


Figura 3.3.3a Resultat d'aplicar la correcció de fons sobre un dels microxips mitjançant un “M-A plot”.

Després d'eliminar el soroll de fons s'ha procedit a normalitzar els gens. Per fer-ho vam aplicar el mètode de “print-tip-loess” que efectua una correcció no lineal dependent de la intensitat en cada sector del microxip. La normalització es va dur a terme dins de cada xip (“within”). També es va provar de fer la normalització entre microxips fent servir dos mètodes diferents: “quantile” i “vsn” utilitzant tots els microxips (“between”). Si ens fixem en els “Boxplots” de la figura 3.3.3c podem observar que la millor homogenització de les dades s’obté si s’aplica només la normalització dins de cada microxip amb el mètode “print-tip-loess”, que finalment és el que vam aplicar per cada microxip. A la figura 3.3.3b veiem el “M-A plot” després de la normalització, on podem observar que el núvol de punts queda redreçat i centrat en el zero, que és l’objectiu de la normalització. Les imatges obtingudes per cadascun dels microxips les podem trobar a l’Annex 2, apartat D.

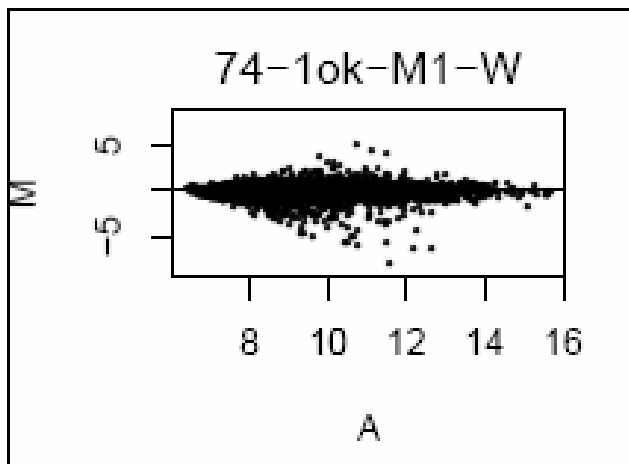


Figura 3.3.3b “M-A plot” d’un dels microxips després de la normalització.

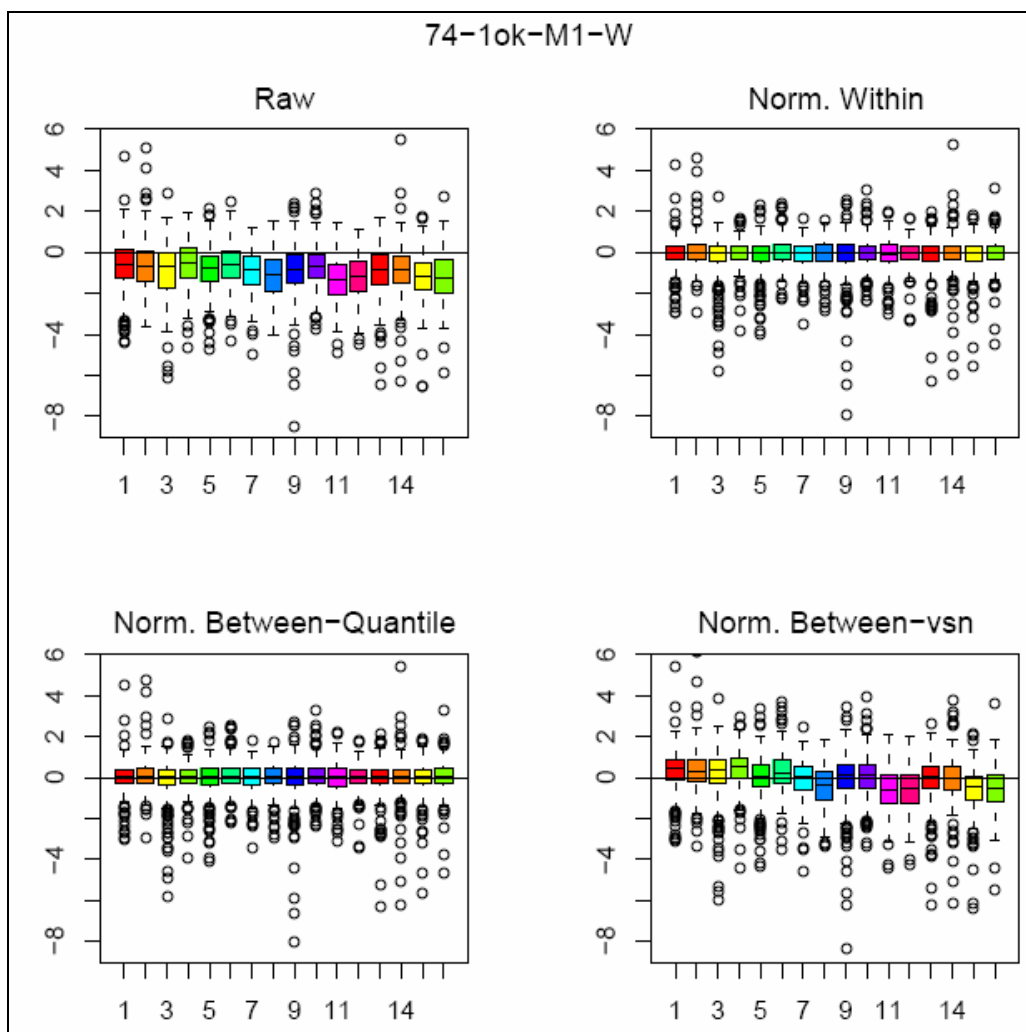


Figura 3.3.3c “Box-plots “ per a un dels microxips sense normalitzar (superior esquerra) i normalitzat amb diferents mètodes: per “print-tip-loess” dins del mateix microxip (superior dreta), “quantile” entre tots els microxips (inferior esquerra) i “vsn” entre totes els microxips (inferior dreta).

3.3.4 GENS EXPRESSATS DIFERENCIALMENT

Després de normalitzar els microxips es va procedir a fer les comparacions seleccionades. Per a cada comparació individual vam obtenir una taula on apareixen els gens que tenen diferències d'expressió significatives, ordenats de major a menor valor relatiu d'expressió. En línies generals podem considerar diferencialment expressats aquells gens on el valor de la columna "B" és superior a zero i/o el p-valor és prou petit (per exemple inferior al 1%).

Les taules 3.3.4a, 3.3.4b i 3.3.4c mostren els gens seleccionats en cada comparativa classificats segons les funcions que codifiquen. En aquestes taules només es mostren els gens, el valor relatiu de l'expressió (raó d'expressió) d'una soca respecte l'altre, i l'estadístic B. En l'Annex 2 es troben les taules amb la resta de característiques per a cada gen.

Les primeres conclusions que podem treure amb una simple observació de les taules són:

- Les comparacions entre la soca BSN27 respecte la BSN26, i entre la soca BSN26HY i la BSN27, ens duen a seleccionar un alt nombre de gens diferencialment expressats.
- Per a la comparació entre les soques BSN26HY i BSN26, el mateix criteri selecciona molt pocs gens, d'on podem concloure que la diferència entre la soca salvatge BSN26 i la soca BSN26HY (*hha ydgt*) és molt petita, i per tant més difícil de detectar en aquestes condicions experimentals.

Taula 3.3.4a Gens expressats diferencialment entre la soca BSN27 (*hns*) respecte la soca salvatge BSN26.

Funció i gens	Raó d'expressió	B
Traducció		
30s ribosomal subunit protein s22; rpsv	12.17	17.79
ribosome modulation factor; rmf	5.82	10.91
phenylalanine trna synthetase, beta-subunit; phet	1.38	0.66
acetylation of n-terminal alanine of 30s ribosomal subunit protein s5; rimj	0.63	2.41
serine trna synthetase; also charges selenocystein trna with serine; sers	0.52	4.14

Transport i metabolisme dels aminoàcids		
glutamate decarboxylase isozyme; gada	91.20	9.97
lysine decarboxylase 1; cada	40.76	12.93
transport of lysine/cadaverine; cadb	5.26	17.16
anaerobically inducible l-threonine, l-serine permease; tdcc	4.24	1.90
putative glutaminase; ybas	4.15	12.21
putative amino acid/amine transport protein; b1691	3.98	9.11
putative amino acid/amine transport protein, cryptic; yjde	3.60	8.03
methionine adenosyltransferase 1 (adomet synthetase); methyl and propylamine donor, corepressor of met genes; metk	3.02	5.46
putative oxidoreductase; b2146	2.87	10.14
atp-binding component of transport system for glycine, betaine and proline; prov	1.96	9.17
arginine 3rd transport system periplasmic binding protein; arti	1.71	2.39
atp-binding component of 3rd arginine transport system; artp	1.66	4.41
s-adenosylmethionine decarboxylase; sped	1.57	1.00
alanine racemase 1; alr	0.71	1.84
branched-chain amino-acid aminotransferase; ilve	0.69	2.11
putative transport system permease protein; yhdy	0.66	0.48
aminopeptidase n; pepn	0.62	1.61
glutathione synthetase; gshb	0.62	1.34
aminomethyltransferase (t protein; tetrahydrofolate-dependent) of glycine cleavage system; gcvt	0.60	4.02
2-amino-3-ketobutyrate coa ligase (glycine acetyltransferase); kbl	0.59	1.16
proline dipeptidase; pepq	0.58	4.23
glutamate-aspartate symport protein; gltp	0.58	2.82
histidine-binding periplasmic protein of high-affinity histidine transport system; hisj	0.56	1.39
asparagine synthetase a; asna	0.53	0.04
in glycine cleavage complex, carrier of aminomethyl moiety via covalently bound lipoyl cofactor; gcvh	0.53	1.32
ilvb operon leader peptide; ivbl	0.52	2.22
putative sulfatase; b1498	0.49	2.03
l-serine dehydratase (deaminase), l-sd2; sdab	0.47	1.06
chorismate synthase; aroc	0.47	1.87
glutamine synthetase; glna	0.42	8.20
aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit; pyrb	0.40	5.15
low affinity tryptophan permease; tnab	0.39	2.68
aspartate carbamoyltransferase, regulatory subunit; pyri	0.38	6.30
probable serine transporter; sdac	0.36	0.43
transport system permease (serine?); dsdx	0.34	3.80
aspartate ammonia-lyase (aspartase); aspa	0.31	14.26
d-serine dehydratase (deaminase); dsda	0.28	5.19
tryptophanase; tnaa	0.28	4.50
Transport i metabolisme dels sucres		
putative nucleotide di-p-sugar epimerase or dehydratase; wcag	5.44	19.64
trehalose-6-phosphate synthase; otsa	3.93	9.72
putative kinase; yeic	3.42	0.84

putative transport system permease protein; ydez	3.24	10.29
trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic; otsb	3.20	12.02
transaldolase a; tala	2.91	6.56
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gapc	2.62	3.87
putative transport system permease; yjhf	2.47	0.96
glycogen biosynthesis, rpos dependent; glgs	2.46	0.19
transketolase 2 isozyme; tktb	2.26	1.82
gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating; gnd	2.06	5.53
pts system, fructose-specific iia/fpr component; frub	2.01	3.60
l-idonate dehydrogenase; idnd	2.00	1.01
cytoplasmic alpha-amylase; amya	2.00	7.56
pts system, glucose-specific iibc component; ptsg	1.86	1.79
putative transport protein; yqce	1.82	5.71
putative isomerase; ybhe	1.75	4.09
gluconate kinase, thermosensitive glucokinase; idnk	1.65	0.00
putative transport protein; yegb	1.62	2.51
putative aldolase; b1773	1.55	4.03
pts system n-acetylgalactosamine-specific iic component 1; agac	1.51	1.76
xylose-proton symport; xyle	1.46	3.93
ketodeoxygluconokinase; kdgk	0.68	3.61
pts system, glucitol/sorbitol-specific iic component, one of two; srla	0.65	0.44
pep-dependent phosphotransferase enzyme iv for cellobiose, arbutin, and salicin; cela	0.64	0.17
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase a; gapa	0.59	1.55
fructose-bisphosphate aldolase, class ii; fba	0.57	2.75
galactose-1-phosphate uridylyltransferase; galt	0.57	2.26
ribokinase; rbsk	0.57	2.20
transketolase 1 isozyme; tkta	0.54	3.76
part of maltose permease, inner membrane; malg	0.54	0.36
d-ribose high-affinity transport system; membrane-associated protein; rbsd	0.52	3.96
galactose-1-epimerase (mutarotase); galm	0.51	4.35
galactitol-specific enzyme iia of phosphotransferase system; gata	0.46	5.97
facilitated diffusion of glycerol; glpf	0.46	5.38
putative tagatose 6-phosphate kinase 1; gatz	0.42	1.75
galactokinase; galk	0.39	9.13
pts system galactitol-specific enzyme iic; gatc	0.37	7.27
galactitol-1-phosphate dehydrogenase; gatd	0.34	8.87
galactitol-specific enzyme iib of phosphotransferase system; gatb	0.32	9.00
part of maltose permease, periplasmic; malf	0.27	3.36
glucitol (sorbitol)-6-phosphate dehydrogenase; srlc	0.23	16.44
uptake of c4-dicarboxylic acids; dcta	0.21	2.05
d-ribose periplasmic binding protein; rbsb	0.20	13.14
pts system, glucitol/sorbitol-specific iib component and second of two iic components; srle	0.19	10.51
pts system, glucitol/sorbitol-specific enzyme iia component; srlb	0.16	14.69
periplasmic protein of mal regulon; malm	0.14	9.00
atp-binding component of transport system for maltose; malk	0.14	5.95

trehalase 6-p hydrolase; trec	0.14	19.20
phage lambda receptor protein; maltose high-affinity receptor; lamb	0.14	6.68
periplasmic maltose-binding protein; substrate recognition for transport and chemotaxis; male	0.13	10.84
galactose-binding transport protein; receptor for galactose taxis; mglb	0.11	9.24
pts system enzyme ii, trehalose specific; treb	0.03	24.84
Regulators		
positive regulator for ctr capsule biosynthesis, positive transcription factor; rcsa	7.68	18.76
haemolysin expression modulating protein; hha	6.67	0.51
putative homeobox protein; b0753	5.51	16.09
positive regulation of bgl operon; bglg	4.93	13.23
putative arac-type regulatory protein; ybcm	4.52	0.73
putative arac-type regulatory protein; b1499	4.19	13.52
regulator of gltbdf operon, induction of ntr enzymes; gltf	4.00	10.66
global regulator, starvation conditions; dps	3.78	5.20
probable transcriptional activator for leuabcd operon; leuo	3.63	12.04
regulator for xapa; xapr	3.46	14.13
trp repressor binding protein; affects association of trp repressor and operator; wrba	2.97	0.48
dna-binding protein; h-ns-like protein; chaperone activity; rna splicing?; spa	2.68	7.71
putative deor-type transcriptional regulator; b1284	2.63	6.37
putative regulator; yjhi	2.60	1.38
activator of ntrl gene; osme	2.57	4.18
sequence similarity to shigella regulator; citb	2.54	5.58
putative 2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon; csgd	2.23	0.30
putative sensor-type protein; cita	2.15	3.31
putative regulator; wcaa	2.04	4.85
putative 2-component sensor protein; yedv	1.99	0.28
putative transcriptional regulator; yeil	1.89	5.87
putative regulator; yjjq	1.84	5.74
putative regulator; yiit	1.72	4.03
nadh dehydrogenase transcriptional regulator, lysr family; lrha	1.72	0.74
transcriptional activator of cad operon; cade	1.67	1.95
cation transport regulator; chab	1.65	5.06
cation transport regulator; chac	1.64	2.31
hnr protein; hnr	1.62	1.45
response transcriptional regulatory protein (rstb sensor); rsta	1.62	1.21
putative transcriptional regulator lysr-type; yiaa	1.59	0.92
transcriptional regulator of cai operon; caif	1.51	3.69
nitrate/nitrite sensor, histidine protein kinase acts on narl regulator; narx	1.47	1.55
pleiotrophic regulation of anaerobic respiration: response regulator for nar, frd, dms and tor genes; narl	1.45	1.08
cold shock protein; cspc	1.40	0.63

histidine protein kinase sensor for glng regulator (nitrogen regulator ii, nrii); glnl	0.68	1.23
catabolite repression sensor kinase for phob; alternative sensor for pho regulon; crec	0.67	1.57
putative transcriptional regulator; yidf	0.67	0.42
regulator of flagellar biosynthesis, acting on class 2 operons; transcriptional initiation factor; flhd	0.66	1.46
cyclic amp receptor protein; crp	0.62	4.67
phage shock protein: activates phage shock-protein expression; pspc	0.61	0.21
positive regulator of the fuc operon; fucr	0.61	3.00
sensor kinase for hydg, hydrogenase 3 activity; hydh	0.61	6.20
regulator for gut (srl), glucitol operon; srlr	0.58	2.80
regulator of melibiose operon; melr	0.58	2.09
universal stress protein; broad regulatory function?; uspa	0.58	2.74
putative 2-component transcriptional regulator; yjdg	0.58	4.93
putative 2-component sensor protein; yjdh	0.55	3.64
regulator for sos(lexa) regulon; lexa	0.51	5.92
transcription regulator; yifda	0.45	6.71
response regulator for gln (sensor glnl) (nitrogen regulator i, nri); glng	0.38	3.60
putative yhbh sigma 54 modulator; yfia	0.33	6.50
transcriptional regulator; lldr	0.16	7.32
dna-binding protein hlp-ii (hu, bh2, hd, ns); pleiotropic regulator; hns	0.03	24.29
Síntesi de membranes, paret i altres estructures extracel·lulars		
putative colanic acid polymerase; wcad	13.61	22.21
gdp-mannose mannosyl hydrolase; wcah	9.80	19.60
udp-glucose 6-dehydrogenase; ugd	7.37	19.87
gdp-d-mannose dehydratase; gmd	5.44	10.64
outer membrane protein x; ompx	5.21	10.71
putative colanic acid biosynthesis glycosyl transferase; wcae	4.93	12.99
putative adhesion and penetration protein; b1202	4.08	14.63
putative transferase; wcaf	4.04	15.17
cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase; cfa	4.00	15.55
curlin major subunit, coiled surface structures; cryptic; csga	3.53	5.94
mannose-1-phosphate guanyltransferase; cpsb	3.19	8.72
curli production assembly/transport component, 2nd curli operon; csgg	2.85	4.65
curli production assembly/transport component, 2nd curli operon; csgf	2.77	1.67
putative galactokinase (ec 2.7.1.6).; wcah	2.66	8.46
involved in lipopolysaccharide biosynthesis; htrl	2.42	3.11
putative polysaccharide export protein; wza	2.15	6.72
minor curlin subunit precursor, similar ro csga; csgb	2.02	4.13
probable export protein; wzxc	1.95	4.71
d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase; penicillin-binding protein 6; dacc	1.89	6.73
putative colanic acid biosynthesis glycosyl transferase; wcal	1.88	2.90
putative function in exopolysaccharide production; yccz	1.80	6.75
putative glycosyl transferase; wcac	1.77	3.15
probable protein-tyrosine-phosphatase; wzb	1.73	1.13
penicillin-binding protein 7; pbpg	0.70	1.22

n-acetylneuraminate lyase (aldolase); catabolism of sialic acid; not k12?; nana	0.68	0.24
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase; plsc	0.65	2.63
sialic acid transporter; nant	0.63	0.08
n-acetylmuramoyl-l-alanine amidase ii; a murein hydrolase; amib	0.63	1.34
probably hexose transferase; lipopolysaccharide core biosynthesis; rfak	0.62	2.16
glutamate racemase, required for biosynthesis of d-glutamate and peptidoglycan; muri	0.62	1.59
outer membrane phospholipase a; plda	0.53	1.13
l-glutamine:d-fructose-6-phosphate aminotransferase; glms	0.49	6.33
oligopeptide transport; periplasmic binding protein; oppa	0.17	14.22
Motilitat		
putative fimbrial-like protein; ycbq	21.27	21.03
putative fimbrial-like protein; b1504	5.78	14.92
putative fimbrial protein; yadk	5.24	7.25
putative outer membrane protein; ycbs	4.50	12.07
putative fimbrial protein; yadl	4.12	3.98
homolog of salmonella fimh protein; b0941	3.65	4.46
putative fimbrial-like protein; ygil	3.22	8.38
putative fimbrial-like protein; b0943	2.90	11.25
periplasmic protein related to spheroblast formation; spy	2.17	6.23
putative adhesin; similar to fimh protein; b1502	1.87	1.69
putative type-1 fimbrial protein; yeha	1.76	2.41
putative fimbrial-like protein; sfma	1.67	0.07
putative fimbrial-like protein; yadc	1.59	2.05
Proteases, xaperones i modificadors post-traduccionals		
possible chaperone; b1600; ydgf	4.68	10.44
curved dna-binding protein; functions closely related to dnaj; cbpa	4.64	12.53
putative chaperone; ycbr	4.27	6.57
protein disulfide isomerase ii; dsbc	3.32	4.51
possible chaperone; b1599; ydge	2.70	5.37
periplasmic serine protease do; heat shock protein htra; htra	2.12	1.98
nickel incorporation into hydrogenase-1 proteins; hyaf	1.87	1.67
heme exporter protein b, cytochrome c-type biogenesis protein; ccmb	1.62	7.08
putative o-sialoglycoprotein endopeptidase; ygjd	1.60	0.58
glutaredoxin 2; grxb	1.55	0.08
pyruvate formate lyase activating enzyme 1; pfla	1.45	2.29
l-isoaspartate protein carboxylmethyltransferase type ii; pcm	0.69	3.18
heat shock protein, integral membrane protein; htpx	0.65	1.60
phage lambda replication; host dna synthesis; heat shock protein; protein repair; grpe	0.53	1.89
heat shock protein hslvu, proteasome-related peptidase subunit; hslv	0.52	3.59
dna-binding, atp-dependent protease la; heat shock k-protein; lon	0.45	7.72
chaperone hsp90, heat shock protein c 62.5; htpg	0.43	7.42
heat shock protein; clpb	0.42	6.13
heat shock protein hslvu, atpase subunit, homologous to chaperones; hslu	0.38	11.62

groel, chaperone hsp60, peptide-dependent atpase, heat shock protein; mopa	0.34	7.69
chaperone hsp70; dna biosynthesis; autoregulated heat shock proteins; dnak	0.31	15.40
groes, 10 kd chaperone binds to hsp60 in pres. mg-atp, suppressing its atpase activity; mopb	0.28	8.52
heat shock protein; ibpa	0.21	8.96
heat shock protein; ibpb	0.19	3.93
Producció i conversió d'energia		
probable third cytochrome oxidase, subunit ii; appb	5.89	12.50
putative cytochrome; b1057	4.46	14.46
putative oxidoreductase, major subunit; b1501	4.15	8.63
probable third cytochrome oxidase, subunit i; appc	2.75	3.81
pyruvate oxidase; poxb	2.71	9.91
atp-binding component of cytochrome-related transport; cydc	2.62	7.31
cryptic nitrate reductase 2, alpha subunit; narz	2.35	4.59
cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit ii; cydb	2.30	4.44
putative enzyme; yfde	2.07	4.17
cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit i; cyda	2.06	1.56
probable flavoprotein subunit, carnitine metabolism; fixa	2.04	4.07
putative oxidoreductase; yncb	1.97	6.48
hydrogenase-1 large subunit; hyab	1.96	6.03
putative tartrate dehydrogenase; yeau	1.95	0.21
putative oxidoreductase; ybdr	1.88	2.38
putative oxidoreductase; yjgb	1.76	5.33
formate acetyltransferase 1; pflb	1.73	2.57
putative oxidoreductase; ydjj	1.68	4.86
probable flavoprotein subunit, carnitine metabolism; fixb	1.64	0.50
putative oxidoreductase, fe-s subunit; b1671	1.55	2.51
putative oxidoreductase; ycjq	1.42	0.18
ferredoxin-type protein: electron transfer; napg	0.72	0.07
phosphoenolpyruvate carboxylase; ppc	0.68	2.67
putative reductase; b3001	0.61	2.88
putative oxidoreductase; yqhd	0.60	3.36
nadh dehydrogenase i chain l; nuol	0.59	2.68
fumarate reductase, anaerobic, flavoprotein subunit; frda	0.59	1.14
putative enzyme; b0872	0.56	0.71
membrane-bound atp synthase, f1 sector, alpha-subunit; atpa	0.55	1.38
fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide; frdd	0.54	7.45
membrane-bound atp synthase, f1 sector, gamma-subunit; atpg	0.51	5.58
nadh dehydrogenase i chain g; nuog	0.50	5.37
nadh dehydrogenase i chain f; nuof	0.48	2.17
nadh dehydrogenase i chain a; nuoa	0.46	1.28
fumarase c= fumarate hydratase class ii; isozyme; fumc	0.46	1.96
nadh dehydrogenase i chain i; nuoi	0.45	6.32
chorismate lyase; ubic	0.43	7.34
putative multimodular enzyme; b2463	0.42	5.97
membrane-bound atp synthase, f1 sector, beta-subunit; atpd	0.42	10.23

formate dehydrogenase, cytochrome b556 (fdo) subunit; fdoi	0.42	2.35
membrane-bound atp synthase, f1 sector, epsilon-subunit; atpc	0.42	3.34
nadh dehydrogenase i chain h; nuoh	0.41	11.08
nadh dehydrogenase i chain e; nuoe	0.41	5.41
fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide; frdc	0.40	14.55
nadh dehydrogenase i chain b; nuob	0.40	3.33
aconitate hydratase b; acnb	0.38	4.43
malate dehydrogenase; mdh	0.37	4.81
formate dehydrogenase-o, major subunit; fdog	0.36	10.14
succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit; sdha	0.36	0.72
phosphoenolpyruvate carboxykinase; pcka	0.35	9.03
glycerol kinase; glpk	0.34	4.30
fumarase a = fumarate hydratase class i; aerobic isozyme; fuma	0.32	2.33
glycerophosphodiester phosphodiesterase, periplasmic; glpq	0.29	3.91
2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydrolipoyltranssuccinase e2 component); such	0.28	5.40
fumarate reductase, anaerobic, iron-sulfur protein subunit; frdb	0.25	13.14
l-lactate dehydrogenase; lldd	0.25	4.26
succinyl-coa synthetase, alpha subunit; succd	0.25	15.24
2-oxoglutarate dehydrogenase (decarboxylase component); suca	0.21	11.67
succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit; sdhd	0.21	1.75
aldehyde dehydrogenase, nad-linked; alda	0.18	1.44
citrate synthase; glta	0.17	5.68
succinate dehydrogenase, cytochrome b556; sdhc	0.16	2.50
l-lactate permease; lldp	0.12	1.75
succinate dehydrogenase, iron sulfur protein; sdhb	0.12	7.99
coa-linked acetaldehyde dehydrogenase and iron-dependent alcohol dehydrogenase; pyruvate-formate-lyase deactivase; adhe	0.05	10.25
Transport i metabolisme dels nucleòtids		
putative alpha helical protein; ybel	9.66	16.72
probable adenine deaminase (synthesis xanthine); yicp	4.54	15.27
thymidine phosphorylase; deoa	2.27	5.85
homolog of salmonella utp--glucose-1-p uridyltransferase, probably a udp-gal transferase; galf	1.87	1.42
thiamin biosynthesis, thiazole moiety; thie	0.64	0.26
orotate phosphoribosyltransferase; pyre	0.62	1.87
2':3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase; cpdb	0.62	2.74
diadenosine tetraphosphatase; apha	0.60	1.27
deoxyuridinetriphosphatase; dut	0.56	1.33
anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase; nrdd	0.56	5.55
thymidine kinase; tdk	0.41	5.97
Replicació, recombinació i reparació del DNA		
integration host factor (ihf), beta subunit; site-specific recombination; himd	2.40	12.56
excinuclease abc, subunit c; repair of uv damage to dna; uvrc	1.92	7.44
exonuclease viii, ds dna exonuclease, 5' --> 3' specific; rece	1.57	1.13
dna-binding protein hu-alpha (hu-2); hupa	0.61	2.29

dna strand exchange and renaturation, dna-dependent atpase, dna- and atp-dependent coprotease; reca	0.61	0.09
dna biosynthesis; dna primase; dnag	0.61	4.33
dna-damage-inducible protein; dind	0.60	2.09
dna-binding protein hu-beta, ns1 (hu-1); hupb	0.58	3.49
dna-damage-inducible protein f; dinf	0.55	7.44
negative modulator of initiation of replication; seqa	0.54	2.85
host restriction; endonuclease r; hsdR	0.44	9.13
Metabolisme i transport de lípids		
putative sugar transferase; b2254	5.10	10.46
putative enzyme; ydif	3.04	2.16
putative acyl coenzyme a dehydrogenase; aidb	2.77	12.11
putative oxidoreductase; ygha	2.51	4.25
putative oxidoreductase; b1695	2.46	2.37
gamma-glutamate-cysteine ligase; gsha	2.23	9.55
molybdopterin biosynthesis, protein c; moac	1.76	2.80
putative enzyme; b2889	1.49	0.38
2-octaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone --> 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone; ubie	0.66	0.46
putative dihydroxyacetone kinase (ec 2.7.1.2); b1199	0.64	1.43
putative oxidoreductase; ucpa	0.36	4.02
Metabolisme i transport de compostos inorgànics		
catalase; hydroperoxidase hpII(iii); kate	4.40	17.23
nitrite extrusion protein 2; naru	3.68	10.16
bacterioferrin, an iron storage homoprotein; bfr	2.66	4.14
putative potassium channel protein; kch	2.31	3.52
probable formate transporter (formate channel 1); foca	2.00	1.49
copper homeostasis protein; cutc	1.91	6.82
mg ²⁺ transport atpase, p-type 1; mgta	1.88	3.71
superoxide dismutase precursor (cu-zn); sodc	1.65	3.29
na ⁺ /h antiporter, ph dependent; nhaa	1.64	3.54
ferritin-like protein; yeci	1.60	0.24
Síntesi, transport i metabolisme de metabòlits secundaris i toxines		
hemolysin e; hlye	16.38	14.53
nad-dependent 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, dehydroxylation of bile acids; hdha	5.87	16.12
biotin biosynthesis; reaction prior to pimeloyl coa; bioc	2.67	11.80
multidrug resistance protein y; emry	2.08	4.14
enzyme in alternate path of synthesis of 5-aminolevulinate; hema	1.82	2.92
vitamin b12 transport; btue	1.75	1.15
detox protein; cchb	1.66	2.61
porphobilinogen deaminase = hydroxymethylbilane synthase; hemeC	0.68	0.27
outer membrane receptor for transport of vitamin b12, e colicins, and bacteriophage bf23; btub	0.57	6.48
2-keto-4-pentenoate hydratase; mhpd	0.44	6.96
Altres funcions		
outer membrane protein induced after carbon starvation; slp	14.31	12.77

phosphoanhydride phosphorylase; ph 2.5 acid phosphatase; periplasmic; appa	2.84	11.18
mg-dependent dnase; yjjv	2.47	5.86
Gens de funció desconeguda i proteïnes hipotètiques		
putative structural proteins; ycif	44.43	20.43
orf, hypothetical protein; ycie	35.75	24.07
acid sensitivity protein, putative transporter; xasa	34.85	16.00
orf, hypothetical protein; ydei	22.22	23.75
orf, hypothetical protein; yhim	21.89	19.07
orf, hypothetical protein; ygck	17.79	10.49
putative enzyme; yjcp	16.51	15.33
osmotically inducible lipoprotein; osmb	10.23	20.53
orf, hypothetical protein; b1481	10.09	15.63
orf, hypothetical protein; ycdf	7.83	18.29
orf, hypothetical protein; ycac	6.62	14.67
orf, hypothetical protein; b2757	6.48	10.19
orf, hypothetical protein; hded	6.26	5.25
orf, hypothetical protein; yjha	5.97	13.69
orf, hypothetical protein; ycig	5.93	8.29
orf, hypothetical protein; yiag	5.86	16.46
orf, hypothetical protein; yccd	5.81	14.80
orf, hypothetical protein; ybjj	5.39	7.97
orf, hypothetical protein; yeaq	5.17	13.66
orf, hypothetical protein; yeai	5.17	10.70
orf, hypothetical protein; yhie	5.16	5.76
orf, hypothetical protein; ycdu	4.94	9.52
orf, hypothetical protein; ydit	4.91	13.66
orf, hypothetical protein; yedu	4.90	4.64
orf, hypothetical protein; b2085	4.82	12.48
orf, hypothetical protein; b2809	4.67	12.10
orf, hypothetical protein; wcam	4.57	13.43
orf, hypothetical protein; yjht	4.25	12.03
osmotically inducible protein; osmc	4.24	13.58
orf, hypothetical protein; b1550	4.22	7.33
putative enzyme; b2253	4.15	7.51
putative transport system permease protein; yhiv	4.15	13.92
putative transmembrane subunit; ybif	3.86	11.67
orf, hypothetical protein; ydej	3.70	10.26
orf, hypothetical protein; ynae	3.59	6.66
putative enzyme; b1497	3.58	15.75
orf, hypothetical protein; yjhs	3.50	10.58
orf, hypothetical protein; yehe	3.47	11.95
orf, hypothetical protein; b1625	3.40	1.45
orf, hypothetical protein; b2359	3.40	13.19
orf, hypothetical protein; b1365	3.36	6.53
hyperosmotically inducible periplasmic protein; osmy	3.35	2.35
orf, hypothetical protein; elab	3.35	5.38
orf, hypothetical protein; b2097	3.33	11.96

orf, hypothetical protein; b2084	3.33	8.19
orf, hypothetical protein; yaib	3.31	11.82
acid shock protein; asr	3.20	11.64
orf, hypothetical protein; ykfe	3.18	14.08
orf, hypothetical protein; yhjr	3.16	2.12
orf, hypothetical protein; b1450	3.14	12.47
putative transformylase; b2255	2.96	14.33
orf, hypothetical protein; yeag	2.92	8.66
orf, hypothetical protein; ycdq	2.90	9.61
orf, hypothetical protein; yjbe	2.87	10.41
orf, hypothetical protein; crca	2.87	3.67
orf, hypothetical protein; yjdk	2.86	6.81
putative vimentin; yjda	2.85	7.62
orf, hypothetical protein; b1810	2.76	8.34
orf, hypothetical protein; b2755	2.72	6.85
orf, hypothetical protein; yccj	2.71	1.56
orf, hypothetical protein; ycdp	2.69	3.37
orf, hypothetical protein; yqjd	2.65	4.27
orf, hypothetical protein; yjju	2.62	9.13
orf, hypothetical protein; ygau	2.62	2.28
orf, hypothetical protein; yhif	2.60	11.49
cold shock-like protein; cspi	2.59	7.85
putative ribosomal protein; ycdv	2.56	11.95
orf, hypothetical protein; b1626	2.55	0.44
orf, hypothetical protein; ycep	2.49	6.11
orf, hypothetical protein; yqje	2.49	4.93
orf, hypothetical protein; yfjj	2.45	13.44
orf, hypothetical protein; b2083	2.45	4.19
orf, hypothetical protein; yeah	2.43	5.57
orf, hypothetical protein; ygag	2.42	6.77
orf, hypothetical protein; yjen	2.41	1.01
putative outer membrane lipoprotein; b2505	2.41	11.24
orf, hypothetical protein; ygam	2.40	4.88
orf, hypothetical protein; b2060	2.40	3.48
orf, hypothetical protein; ybge	2.39	4.21
orf, hypothetical protein; ydeh	2.37	5.48
putative lyase/synthase; yjhh	2.33	0.48
orf, hypothetical protein; ybfg	2.31	10.52
orf, hypothetical protein; ynhe	2.31	7.95
orf, hypothetical protein; yeaj	2.31	9.06
orf, hypothetical protein; yecf	2.29	6.82
orf, hypothetical protein; b1172	2.27	4.91
orf, hypothetical protein; b1330	2.26	4.21
orf, hypothetical protein; yiis	2.26	4.98
orf, hypothetical protein; ygiw	2.24	4.21
orf, hypothetical protein; yjbq	2.22	6.62
putative regulator; ybbu	2.18	10.32
putative receptor protein; b2372	2.17	6.50

putative atp-binding component of a transport system; ynhd	2.16	5.17
orf, hypothetical protein; yqjc	2.13	0.06
orf, hypothetical protein; yjbf	2.13	6.93
orf, hypothetical protein; ydce	2.11	1.10
orf, hypothetical protein; yjyy	2.07	6.56
orf, hypothetical protein; yjfl	2.04	1.41
putative general secretion pathway for protein export (gsp); yhee	2.04	2.46
orf, hypothetical protein; b2760	2.02	6.07
orf, hypothetical protein; ybga	2.01	4.37
putative carbamoyl transferase; ygew	2.01	2.02
orf, hypothetical protein; b2080	2.00	6.35
orf, hypothetical protein; ygbf	2.00	4.87
orf, hypothetical protein; b2071	2.00	5.36
orf, hypothetical protein; yecd	1.99	4.14
orf, hypothetical protein; b2275	1.97	4.34
orf, hypothetical protein; b1821	1.97	3.83
orf, hypothetical protein; yhco	1.97	3.28
orf, hypothetical protein; ycei	1.96	2.93
orf, hypothetical protein; b2758	1.96	4.21
orf, hypothetical protein; b1490	1.94	3.10
orf, hypothetical protein; b1680	1.94	4.79
orf, hypothetical protein; phna	1.94	2.19
orf, hypothetical protein; ypha	1.93	4.68
orf, hypothetical protein; ycgw	1.92	1.82
orf, hypothetical protein; ybhh	1.88	7.37
orf, hypothetical protein; yqeh	1.88	4.25
orf, hypothetical protein; b1824	1.87	7.24
orf, hypothetical protein; b2257	1.86	1.09
orf, hypothetical protein; yhfl	1.86	3.45
orf, hypothetical protein; ydgq	1.81	4.12
orf, hypothetical protein; b1367	1.81	3.44
putative transport protein; ytfl	1.80	2.20
putative enzyme; b2374	1.77	0.69
orf, hypothetical protein; yrbl	1.76	5.02
orf, hypothetical protein; b1825	1.75	5.16
orf, hypothetical protein; b1957	1.75	2.70
orf, hypothetical protein; ytfе	1.73	3.25
orf, hypothetical protein; year	1.71	6.63
orf, hypothetical protein; ybhm	1.70	2.02
orf, hypothetical protein; b1631	1.69	4.48
putative reductase; b1971	1.68	4.07
orf, hypothetical protein; yjbr	1.68	4.27
orf, hypothetical protein; ycbw	1.67	5.90
orf, hypothetical protein; b0834	1.66	0.18
orf, hypothetical protein; b1668	1.65	2.84
orf, hypothetical protein; ycce	1.65	0.07
orf, hypothetical protein; b1044	1.64	0.14
orf, hypothetical protein; ydgo	1.64	2.90

orf, hypothetical protein; b2250	1.63	2.17
orf, hypothetical protein; b1724	1.62	3.64
orf, hypothetical protein; b2384	1.62	4.83
orf, hypothetical protein; ymca	1.61	4.31
putative general secretion pathway for protein export (gsp) (type ii traffic warden atpase); yheg	1.61	0.60
putative polyprotein; b1045	1.59	4.78
orf, hypothetical protein; ynha	1.58	1.81
orf, hypothetical protein; yiam	1.57	3.87
orf, hypothetical protein; yjdc	1.57	3.64
orf, hypothetical protein; yqhe	1.57	3.70
orf, hypothetical protein; -	1.56	0.48
orf, hypothetical protein; b1685	1.56	1.28
putative atp-binding component of a transport system; ycbe	1.56	1.25
putative transport protein; yggb	1.55	3.25
orf, hypothetical protein; ybaq	1.54	1.42
putative transport system permease protein; yehz	1.54	1.11
orf, hypothetical protein; yfao	1.54	1.74
orf, hypothetical protein; yedi	1.53	0.61
orf, hypothetical protein; yihi	1.53	1.37
putative transport system permease protein; yehy	1.52	0.56
orf, hypothetical protein; yggh	1.51	1.21
orf, hypothetical protein; b2256	1.51	0.11
membrane-associated protein; uidc	1.51	2.49
orf, hypothetical protein; b1762	1.50	1.78
putative transcriptional regulator; ybbi	1.49	1.89
orf, hypothetical protein; yeak	1.49	0.86
orf, hypothetical protein; ycea	1.49	2.13
orf, hypothetical protein; b2353	1.49	1.28
two-module transport protein; yick	1.49	1.61
putative peptide transporter; yjdl	1.48	0.58
orf, hypothetical protein; yjim	1.48	2.86
orf, hypothetical protein; ycgj	1.46	1.87
orf, hypothetical protein; yjej	1.46	1.03
putative atp-binding component of a transport system; yehx	1.46	2.44
putative actin; ygge	1.43	0.66
putative transport; ybby	1.42	3.03
orf, hypothetical protein; b0968	1.38	0.29
putative factor; ychp	1.34	0.85
orf, hypothetical protein; ygfb	0.74	0.21
orf, hypothetical protein; yceh	0.74	1.29
orf, hypothetical protein; ycin	0.73	0.15
orf, hypothetical protein; yigp	0.72	0.42
orf, hypothetical protein; -	0.72	0.12
a protaminelike protein; tpr	0.70	0.69
putative histone; b3837	0.70	1.38
orf, hypothetical protein; b2619	0.69	1.25
orf, hypothetical protein; ygfy	0.68	3.09

orf, hypothetical protein; ygbp	0.67	2.75
oligopeptidase a; prlc	0.67	0.97
orf, hypothetical protein; yjgf	0.66	2.08
putative membrane transport protein; b1433	0.66	2.93
orf, hypothetical protein; b2896	0.66	1.08
orf, hypothetical protein; yigr	0.65	3.47
orf, hypothetical protein; yiuu	0.65	1.65
orf, hypothetical protein; ydja	0.65	0.80
orf, hypothetical protein; yjes	0.65	1.26
orf, hypothetical protein; smp	0.64	2.05
putative aminotransferase; b2290	0.64	1.49
orf, hypothetical protein; yqia	0.64	1.84
putative atp-binding component of a transport system; ybjz	0.63	0.80
orf, hypothetical protein; ygah	0.63	1.27
orf, hypothetical protein; yjeb	0.62	0.89
orf, hypothetical protein; ybae	0.62	2.58
orf, hypothetical protein; b1445	0.62	2.07
orf, hypothetical protein; b3472	0.62	3.58
putative enzyme; ygca	0.62	4.41
orf, hypothetical protein; yqha	0.61	1.04
orf, hypothetical protein; ygjr	0.61	2.42
orf, hypothetical protein; yabb	0.60	2.84
putative phosphatase; yihx	0.60	1.00
small membrane protein a; smpa	0.59	0.13
orf, hypothetical protein; yhfa	0.59	4.51
putative resistance protein; yggt	0.59	0.50
putative aminotransferase; yfho	0.58	0.23
orf, hypothetical protein; yhgi	0.57	3.21
putative transcriptional regulator; yhdm	0.57	0.25
orf, hypothetical protein; yfiq	0.57	0.75
orf, hypothetical protein; yead	0.57	4.47
putative regulator; yehi	0.57	3.91
orf, hypothetical protein; yjhq	0.57	7.30
orf, hypothetical protein; yhcb	0.56	6.40
orf, hypothetical protein; yhdn	0.56	0.06
orf, hypothetical protein; yjig	0.55	3.22
orf, hypothetical protein; yfed	0.55	0.02
putative oxidoreductase; yigc	0.55	7.17
orf, hypothetical protein; ybed	0.55	3.02
orf, hypothetical protein; ydch	0.51	3.54
orf, hypothetical protein; ytfj	0.50	2.23
orf, hypothetical protein; ychh	0.46	5.16
orf, hypothetical protein; b0725	0.45	1.12
phage shock protein; pspe	0.43	6.20
orf, hypothetical protein; ygad	0.42	7.36
orf, hypothetical protein; yjix	0.42	4.50
orf, hypothetical protein; yaaf	0.40	8.84
orf, hypothetical protein; yfec	0.39	8.77

orf, hypothetical protein; yeaa	0.35	1.08
orf, hypothetical protein; yjfo	0.35	1.46
orf, hypothetical protein; yjfn	0.31	3.40
orf, hypothetical protein; yjje	0.28	13.30

En la comparació entre els patrons d'expressió de la soca BSN27 respecte la BSN26 hem trobat un total de 580 gens expressats diferencialment, dels quals un 60,8% es troben sobreexpressats a la soca *hns*. Tot i així, si som més restrictius i només ens fixem en aquells que com a mínim estan expressats el doble o menys de la meitat en la soca BSN27 respecte la BSN26, queden només 311 gens, dels quals un 68,4% estan sobreexpressats a la soca *hns*. Tots aquests gens són possibles candidats a estar regulats directa- o indirectament per la proteïna H-NS. Alguns d'aquests gens es poden agrupar per la seva funció, d'altres no tenen cap connexió amb cap més gen regulat per H-NS. Exemples de grups de gens són:

1. Gens relacionats amb la síntesi, transport i degradació d'aminoàcids: hi ha força gens en aquest grup, 14 dels quals estan sobreexpressats en el mutant *hns* i 22 s'hi troben menys expressats. De tots ells podem destacar els següents. El gen *tnaA*, que codifica la triptofanasa, es troba menys expressat a la soca mutant *hns* (raó d'expressió de 0'28). La proteïna TnaA s'ha identificat com una de les diferències en el patró proteic entre la soca salvatge i la soca mutant *hha* o la soca *hha ydgT*, trobant-se menys expressada en aquests mutants (Paytubi *et al.*, 2004; Paytubi, 2004). Els gens *cadA* (lisina descarboxilasa) i *cadB* (transportador de lisina/cadaverina) estan fortament desreprimits en el mutant *hns* (raons d'expressió de 40'76 i 5'26, respectivament), i també han estat prèviament descrits per Shi *et al.* (1993) com a gens reprimits per H-NS. A més, en aquest estudi hem trobat també sobreexpressat *cadC* (activador transcripcional de l'operó *cad*) en el mutant *hns*. El gen *kbl* (que intervé en la degradació de la treonina) el trobem més expressat en la soca salvatge (raó d'expressió de 0'59). Aquest gen va ser descrit per Landgraf *et al.* (1994) com a reprimat per H-NS. El gen *gadA* (glutamat descarboxilasa), descrit com a reprimat per H-NS (De Biase *et al.*, 1999), el trobem fortament desreprimat en el mutant *hns* (raó d'expressió de 91'20). Podem destacar també els gens que codifiquen la subunitat catalítica (*pyrB*) i la subunitat reguladora (*pyrI*) de l'aspartat carbamoiltransferasa, els dos subexpressats en la soca *hns*. Un altre gen que trobem reprimat per H-NS és l'activador transcripcional de l'operó *leuABCD* de síntesi de la leucina, el gen *leuO*

(raó d'expressió de 3'63), que també va ser identificat prèviament com a regulat per H-NS (Hommais *et al.*, 2001). Per últim també cal destacar els gens *glnL* i *glnG* que formen el sistema de dos components que regula la síntesi de la glutamina (en la que està implicada la proteïna *glnA*); aquests tres gens, implicats en el metabolisme del nitrogen, es troben menys expressats a la soca BSN27 (raons d'expressió de 0'68, 0'38 i 0'42, respectivament).

2. Gens que formen, ensambren i transporten a l'exterior de la cèl·lula el "curli": *csgF*, *csgG*, *csgA* i *csgB* que es troben sobreexpressats en mutants *hns* (raons d'expressió de 2'27, 2'85, 3'53 i 2'02, respectivament). CsgA i CsgB són les subunitats del "curli", mentre que CsgF i CsgG corresponen a components del segon operó del "curli", implicats en l'assemblatge i transport. El gen *csgD*, descrit com a possible regulador transcripcional del segon operó del "curli", també està sobreexpressat en la soca *hns*. Fins ara només els gens *csgA* i *csgB* havien estat descrits com a regulats per H-NS (Arnqvist *et al.*, 1994).

3. Gens que codifiquen proteïnes associades al nucleòide: en aquest grup hi trobem els dos gens que codifiquen per les dues subunitats de la proteïna HU, *hupB* i *hupA*, que estan menys expressats en la soca *hns* respecte la salvatge. Trobem sobreexpressats a la soca BSN27 el gen *hha*, que codifica la proteïna Hha (Nieto *et al.*, 1991) i el gen *stpA*, que codifica l'anàleg d'H-NS, StpA (Zhang *et al.*, 1996). En tots dos casos (*stpA* i *hha*) ja s'havia descrit una sobreexpressió en mutants *hns* d'aquestes dues proteïnes (Hommais *et al.*, 2001; Sondén i Uhlin, 1996). També es troba sobreexpressat en el mutant *hns* el gen *himD*, que codifica la subunitat de la proteïna IHF.

4. Gens que s'indueixen després d'un xoc tèrmic ("heat shock"): es tracta en molts casos de xaperones i proteases, que s'expressen menys en mutants *hns*. Són les xaperones codificades pels gens: *dnaK*, *hspG*, *grpE*, *mopA*, *mop*, *hslU*, *ibpA* i *ibpB*. També hi trobem les proteases codificades per: *hslV*, *clpB*, *hspX* i *lon*. Els dos únics gens d'aquest grup que estan més expressats en el mutant *hns* són *htrA* i *cbpA*. La sobreexpressió del gen *htrA*, que codifica una proteasa, en mutants *hns* ja s'ha descrit en aquest mateix treball (apartat 3.1.2.3). El gen *cbpA* codifica una proteïna que s'uneix al DNA corbat i actua de xaperona juntament amb DnaK. La repressió de l'expressió de *cbpA* per H-NS ja ha estat descrita (Yamashino *et al.*, 1994; 1995).

5. Gens que s'indueixen després d'un xoc fred ("cold shock"): els gens *cspI* i *cspC*, que codifiquen proteïnes de la família CspA (Phadtare *et al.*, 1999), estan

sobreexpressats en el mutant *hns*. CspC és un antiterminador transcripcional que afecta l'expressió de *rpoS* i *uspA*, gens relacionats amb l'estrès (Bae *et al.*, 2000; Phadtare i Inouye, 2001). La sobreexpressió de *cspI* i *cspC* ja ha estat descrita a mutants *hns* (Hommais *et al.*, 2001).

6. Gens que s'expressen en funció de l'osmolaritat: els gens *osmY*, *osmC*, *osmB* i *osmE*, que són induïts en condicions d'alta osmolaritat, estan sobreexpressats en la soca mutant *hns*. OsmC és una proteïna de l'envolta, de funció desconeguda, amb expressió depenent de la osmolaritat i la fase de creixement, i ja s'ha descrit prèviament la seva regulació per H-NS (Gutierrez *et al.*, 1991; Hengge-Aronis, 1996; Bouvier *et al.*, 1998). OsmY és una proteïna periplasmàtica induïble per estrès hiperosmòtic (Yim i Villarejo, 1992) que també ha estat descrita anteriorment com a regulada per H-NS (Barth *et al.*, 1995). El gen *proV* (sistema transportador de prolina/glicina betaïna) es troba desreprimat en la soca mutant *hns* (raó d'expressió de 1,96). L'operó *proU*, del qual forma part *proV*, es troba reprimat en condicions de baixa osmolaritat i s'indueix en augmentar l'osmolaritat del medi. La proteïna H-NS intervé ajustant la repressió de l'expressió, de manera que en un mutant *hns* es produeix una desrepressió en condicions no inductores. Aquest efecte d'H-NS ja ha estat descrit prèviament (Lucht *et al.*, 1994).

7. Gens que s'indueixen en un xoc àcid: són els gens *xasA* i *asr* que es troben sobreexpressats en el mutant *hns*. La proteïna XasA (o GadC) forma part del sistema Gad (GadB, GadA i GadC) i ha estat identificada com a proteïna necessària per a la supervivència a pH àcid (Hersh *et al.*, 1996). Asr, induïble a pH àcid, però no imprescindible per a la supervivència a pH àcid, és de funció desconeguda. La seva transcripció és depenent de fase de creixement i requereix el factor sigma alternatiu ^S. Ja s'ha descrit la regulació negativa d'H-NS sobre la transcripció d'*asr* (Šeputien *et al.*, 2004). En aquest apartat també hi podem incloure els gens *cadA*, *cadB* i *gadA*, que tot i estar relacionats amb la síntesi, transport i degradació d'aminoàcids (veure punt número 1), s'indueixen en un xoc àcid i estan implicats en la resistència a pH baix (Giangrossi *et al.*, 2005).

8. Gens relacionats amb la detoxificació: com el gen que codifica la catalasa (*katE*); el gen que codifica el precursor de la superòxid dismutasa (*sodC*), implicada en la protecció en contra de les fonts exògenes de superòxid i peròxid d'hidrogen i amb una expressió induïda per RpoS en la fase estacionària (Strohmeier Gort *et al.*, 1999); el gen *cchB* relacionat amb el metabolisme de xenobiòtics que, de

fet, a *Salmonella* Typhimurium sembla que està relacionat amb la utilització de la etanolamina (Stojiljkovic *et al.*, 1995); el gen que codifica la proteïna de tolerància del coure (*cutC*) (Gupta *et al.*, 1995); el gen *hdhA*, relacionat amb la degradació d'àcids biliars; i per últim, també trobem gens que duen a terme funcions de transport d'antibiòtics, toxines i compostos mutagènics, com els gens *emrY*, *yhiV*, *ydgE* i *ydgF*. Els gens *ydgE* i *ydgF* estan descrits també com a possibles xaperones, a més, *ydgF* va ser identificat també per Hommais *et al.* (2001) com a gen sobreexpressat en el mutant *hns*. Tots aquest gens estan sobreexpressats en la soca BSN27.

9. Gens implicats en la resposta SOS: codifiquen proteïnes encarregades de la reparació del DNA. Hi trobem els gens *dinD*, *dinF* i *recA*, que estan menys expressats a la soca BSN27, i el gen *uvrC* que hi està sobreexpressat. Dins d'aquest grup també hi ha el gen *lexA*, que és el regulador del reguló de la resposta SOS i que està menys expressat a la soca BSN27.

10. Gens que codifiquen proteïnes de les fímbries: tots aquests gens estan sobreexpressats a la soca BSN27. Es tracta dels gens *b0941*, *yadK*, *yadL*, *b0943*, *b1504*, *sfmA*, *yadC*, *ycbQ*, *ygiL*, *b1502* i *yehA*, descrits com possibles proteïnes de les fímbries.

11. Gens que s'activen per una infecció per fags: en aquest grup hi trobem dos gens que es troben menys expressats en el mutant *hns* i que formen part de l'operó *pspABCDE*, que s'indueix després de la infecció per fags filamentosos i altres tipus d'estrès (Model *et al.*, 1997). Són el gen *pspC*, que activa l'expressió de proteïnes necessàries en una infecció per fags (Weiner *et al.*, 1995), i el gen *pspE*, que codifica una rodanasa (Adams *et al.*, 2002) que és una de les proteïnes regulades pel producte de *pspC*.

12. Gens que codifiquen proteïnes responsables de l'entrada, transport i degradació de la maltosa (operó *mal*): tots ells estan menys expressats a la soca BSN27 que a la BSN26. Es tracta dels gens *malK*, *malG*, *malF*, *malE*, *malM* i *lamB*. La regulació de l'operó de la maltosa per H-NS i el seu anàleg, StpA, ja ha estat descrita (Johansson *et al.*, 1998).

13. Gens relacionats amb l'entrada, transport i degradació del galactitol: són els gens *gatA*, *gatB*, *gatC* i *gatD* que es troben menys expressats en el mutant *hns*. *gatA*, *gatB* i *gatC* formen part del sistema fosfotransferasa (PTS) del galactitol, i *gatD* codifica una deshidrogenasa NAD-depenent (Nobelmann i Lengeler, 1996).

Hommais *et al.* (2001) però, va trobar *gatC* lleugerament sobreexpressat (raó d'expressió de 1,42) en el mutant *hns*.

14. Alguns gens responsables del transport i degradació de la galactosa: tots ells es troben menys expressats en la soca mutant *hns*, són els gens *galK*, *galM*, *galT* i *mglB*.

15. Gens de transport i degradació del glucitol i del sorbitol: són gens que estan menys expressats a la soca BSN27. Es tracta dels gens *srlA*, *srlB* i *srlE*, que formen part del sistema PTS del glucitol/sorbitol, del gen *srlD* i del *srlR*, que és el regulador de l'operó *gut* (*srl*) o operó de degradació del glucitol i del sorbitol.

16. Gens de degradació i síntesi de la trealosa: es tracta de dos gens de degradació de la trealosa, *treC* i *treB* (enzims del sistema PTS de la trealosa), que estan menys expressats a la soca BSN27 (raons d'expressió de 0'14 i de 0'03, respectivament); i de dos gens de la síntesi d'aquest sucre, *otsA* i *otsB*, que al contrari que els dos primers, estan sobreexpressats a la soca BSN27 (raons d'expressió de 3'93 i 3'2, respectivament). El gen *otsA* va ser descrit com a reprimat per H-NS per Barth *et al.* (1995). Els gens *otsA* i *otsB* estan implicats en l'osmoprotecció a *Escherichia coli*, i la seva expressió s'indueix en un medi amb alta osmolaritat i amb falta d'altres osmoprotector (Larsen *et al.*, 1987).

17. Gens relacionats amb el transport i metabolisme de la ribosa: són els gens *rbsD* (codifica un transportador de membrana interna de la ribosa), *rbsB* i *rbsK* (codifica la riboquinasa) que estan menys expressats en la soca BSN27 (0'52, 0'2, i 0,57, respectivament). El gen *rbsB* codifica la proteïna periplasmàtica d'unió a ribosa, implicada en el sistema de transport d'elevada afinitat per la ribosa, i va ser identificada com a proteïna sobreexpressada en mutants *hha* (Paytubi, 2004).

18. Gens de la síntesi de la càpsula: cal destacar el gen *rcaA* (sobreexpressat a la soca BSN27 amb una raó d'expressió de 7'68), que codifica el regulador positiu de la biosíntesi de la càpsula i és un dels gens que ja havia estat descrit anteriorment com a reprimat per H-NS (Sledjeski i Gottesman, 1995). A més, també hi trobem els gens *wcaD*, *wcaH*, *ugd*, *gmd*, *wcaE*, *wcaF*, *cpsB*, *wcaK*, *wzxC*, *wcaL*, *wcaC* i *wzb*, implicats en la síntesi de l'àcid colànic que forma la càpsula (Stevenson *et al.*, 1996). Tots aquests gens estan sobreexpressats a la soca BSN27.

19. Gens relacionats amb la síntesi de la paret cel·lular: tots ells menys expressats a la soca BSN27: *nanA* (implicat en el catabolisme de l'àcid siàlic) i *nanT* (transportador de l'àcid siàlic), *amiB* (mureïna hidrolasa), *murI* (relacionat amb la

síntesi de d-glutamat i del peptidoglicà), *glmS* (glucosamina 6-fosfat sintasa, component de l'oligopèptid permeasa) i *oppA*.

20. Gens induïts en condicions anaeròbiques: els gens *narX* i *narL*, que formen el sistema de dos components de resposta als nivells de nitrat, estan sobreexpressats a la soca *hns*. *narL* codifica un regulador pleiotropic de la respiració anaeròbica, regulant els gens *nar*, *frd*, *dms* i *tor*. El gen *narX* codifica un sensor dels nivells de nitrat i actua fosforilant NarL. *narZ*, *narU* són també gens regulats per NarL, i es troben sobreexpressats a la soca *hns*. Un altre conjunt de gens regulats per NarL són els de l'operó *frdABCD* que codifiquen la fumarat reductasa, transportador terminal d'electrons en anaerobiosi, però en aquest cas aquests gens es troben menys expressats en la soca BSN27 respecte la BSN26.

21. Altres gens que codifiquen reguladors transcripcionals i post-transcripcionals: a part dels reguladors esmentats fins ara, també trobem altres reguladors entre les proteïnes codificades pels gens amb expressió diferencial entre la soca salvatge i la soca *hns*. En alguns casos són reguladors hipotètics, putatius o no es coneix quina regulació exerceixen, Val la pena mencionar alguns reguladors afectats per la presència/absència d'H-NS. Aquells que estan menys expressats en la soca BSN27 són: *creC* (o *phoM*), que codifica el sensor del reguló *pho* format per més de 40 gens que s'indueixen quan hi ha falta de fòsfor; *crp*, que codifica la proteïna responsable de la regulació per catabòlit; el gen *seqA* codifica un regulador negatiu de l'inici de la replicació; *fucR*, el regulador positiu de l'operó *fuc* (operó per la degradació de la fucosa); *yfiA* codifica una proteïna de la família dels moduladors⁵⁴; *flhD* codifica un activador transcripcional, que juntament amb *flhC* actua com a activador de la transcripció dels gens de classe 2 de la síntesi del flagel. L'activació per H-NS d'aquest gen ja havia estat descrita (Kutsukake, 1997); *melR*, activador transcripcional de l'operó *melAB* (operó per la degradació de la melobiosa); *uspA*, que codifica una proteïna de resposta a diversos tipus d'estrès (universal stress protein A). Els reguladors que estan sobreexpressats a la soca BSN27 són: *chaB* i *chaC*, que codifiquen dues subunitats que formen un regulador del transport de cations; *bglG*, que és el regulador positiu de l'operó *bgl* (operó per la degradació de -glucòsids), també havia estat descrit com a reprimint per H-NS (Higgins *et al.*, 1988); *xapR* és el regulador positiu de l'expressió del gen *xapA* (xantosina fosforilasa) i *xapB* (xantosina permeasa); *gltF*, regulador de l'operó *glt* (codifica la glutamat sintasa); *citA* i *citB*, que formen el sistema de dos components que regula

l'expressió dels gens implicats en la fermentació del citrat; *caiF*, que codifica un regulador transcripcional de l'operó *cai* (operó pel metabolisme de la carnitina); *dps*, gen que codifica una proteïna d'unió al DNA inespecífica que actua com a protector del DNA i com a regulador global en condicions d'estarvació (Almiron *et al.*, 1992); i per últim el gen *wrbA*, que s'uneix al repressor de l'operó *trp* (operó del triptòfan), estabilitzant o incrementant la formació de complexos entre aquest repressor i l'operador de l'operó, funcionant com un element accessori en el bloqueig de la transcripció (Yang *et al.*, 1993).

22. *sucA* i *sucB*, dos gens que codifiquen dues subunitats de la 2-oxoglutarat deshidrogenasa que estan menys expressats a la soca BSN27.

23. Dos gens que codifiquen les subunitats i de la format deshidrogenasa (*fdoI* i *fdoG*, respectivament) també estan menys expressades a la soca BSN27.

24. Quatre gens que codifiquen les subunitats , , i de l'ATP sintasa associada a membrana, que estan menys expressats a la soca mutant *hns*. Són els gens *atpA*, *atpC*, *atpD* i *atpG*.

25. Vuit gens que codifiquen subunitats de l'enzim NADH deshidrogenasa que estan menys expressats a la soca mutant *hns*. Són els gens *nuoA*, *nuoB*, *nuoE*, *nuoF*, *nuoG*, *nuoH*, *nuoI* i *nuoL*.

26. Els gens *fixA* i *fixB*, possibles subunitats d'un enzim del metabolisme anaeròbic de la carnitina, que estan sobreexpressats a la soca BSN27.

27. Els gens *appB* i *appC* codifiquen les dues subunitats de la tercera citocrom oxidasa, i estan sobreexpressades en el mutant *hns*.

28. Els gens que codifiquen quatre subunitats de la succinat deshidrogenasa i que es troben menys expressats en la soca BSN27, són els gens *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* i *sdhD*.

29. Dos gens que codifiquen les subunitats I i II de la citocrom d oxidasa, *cydA* i *cydB*, que els trobem sobreexpressats a la soca BSN27. Ja s'ha descrit que H-NS és un repressor de l'expressió de l'operó *cydAB* (Govantes *et al.*, 2000).

30. Altres gens interessants que estan sobreexpressats en l'absència d'H-NS són *rpsV*, que codifica la proteïna associada al ribosoma SRA induïda en fase estacionària; el gen *bfr*, que codifica una bacterioferrina; el gen *hlyE* que codifica l'hemolisina E (o ClyA), silenciada a *E. coli* K12 que s'activa per la sobreexpressió de SlyA, mentre que és silenciada per H-NS (Westermarck *et al.*, 2000). La seva

expressió també està regulada per CRP i FNR (Westermarck *et al.*, 2000; Wyborn *et al.*, 2004). Els gens *slp*, *ompX* i *appA* estan sobreexpressats a la soca BSN27 (raons d'expressió de 14'31, 5'21 i 2'84) i ja han estat descrits anteriorment per Hommais *et al.*, (2001) com a regulats negativament per H-NS; *slp* codifica una proteïna de membrana externa que s'indueix en condicions d'estarvació i en creixement lent ajudant a estabilitzar la membrana; *ompX*, que codifica una proteïna de membrana externa; i el gen *appA* codifica una fosfatasa àcida activada en situacions de falta de fòsfor. Finalment, dos gens que podrien estar relacionats amb la virulència, b1502 que codifica una putativa adhesina, i b1202 que codifica un putativa proteïna d'adhesió i penetració, també estan sobreexpressats a la soca BSN27 amb unes raons d'expressió de 1'87 i 4'08, respectivament.

Aquests resultats ens confirmen que H-NS afecta l'expressió de gens implicats en l'adaptació als canvis ambientals, com poden ser els canvis de pH, osmolaritat, temperatura i falta de nutrients; però també afecta l'expressió de gens dels metabolisme central, com poden ser la degradació de sucres i aminoàcids i també gens que codifiquen funcions de producció i conversió de l'energia.

Taula 3.3.4b Gens expressats diferencialment entre la soca BSN26HY (*hha⁻ ydgT⁻*) respecte la soca BSN27 (*hns⁻*).

Funció i gens	Raó d'expressió	B
Traducció		
ribosome modulation factor; <i>rmf</i>	0.17	8.60
30s ribosomal subunit protein s22; <i>rpsv</i>	0.14	11.50
Transport i metabolisme dels aminoàcids		
probable serine transporter; <i>sdac</i>	4.00	1.56
aspartate ammonia-lyase (aspartase); <i>aspa</i>	3.04	10.86
tryptophanase; <i>tnaa</i>	2.97	0.67
transport system permease (serine?); <i>dsdX</i>	2.75	1.03
l-serine dehydratase (deaminase), l- <i>sd2</i> ; <i>sdab</i>	2.49	1.23
glutamine synthetase; <i>glnA</i>	2.32	5.47
aminomethyltransferase (t protein; tetrahydrofolate-dependent) of glycine cleavage system; <i>gcvt</i>	1.67	1.92
acetylornithine deacetylase; <i>arge</i>	1.57	1.45
atp-binding component of transport system for glycine, betaine and proline; <i>prov</i>	0.59	3.55
putative oxidoreductase; b2146	0.45	4.06
putative amino acid/amine transport protein; b1691	0.38	2.31
putative amino acid/amine transport protein, cryptic; <i>yjde</i>	0.35	3.15
putative glutaminase; <i>ybas</i>	0.35	5.76

putative glutamine synthetase (ec 6.3.1.2); b1297	0.33	0.04
transport of lysine/cadaverine; cadb	0.23	12.64
lysine decarboxylase 1; cada	0.05	7.39
glutamate decarboxylase isozyme; gada	0.04	3.11
Transport i metabolisme dels sucres		
pts system enzyme ii, trehalose specific; treb	33.36	21.87
periplasmic maltose-binding protein; substrate recognition for transport and chemotaxis; male	7.93	8.20
periplasmic protein of mal regulon; malm	6.78	6.13
phage lambda receptor protein; maltose high-affinity receptor; lamb	5.78	2.83
trehalase 6-p hydrolase; trec	5.75	14.47
galactose-binding transport protein; receptor for galactose taxis; mglb	5.64	3.82
atp-binding component of transport system for maltose; malk	5.10	1.58
pts system, glucitol/sorbitol-specific enzyme iia component; srlb	4.59	9.23
d-ribose periplasmic binding protein; rbsb	4.48	9.61
part of maltose permease, periplasmic; malf	3.61	1.00
pts system, glucitol/sorbitol-specific iib component and second of two iic components; srle	3.49	4.56
sn-glycerol-3-phosphate permease; glpt	3.37	1.02
galactitol-specific enzyme iib of phosphotransferase system; gatb	3.04	6.25
glucitol (sorbitol)-6-phosphate dehydrogenase; srlc	2.98	9.74
galactitol-1-phosphate dehydrogenase; gatd	2.81	5.94
pts system galactitol-specific enzyme iic; gatc	2.78	5.27
putative tagatose 6-phosphate kinase 1; gatz	2.41	0.07
galactitol-specific enzyme iia of phosphotransferase system; gata	2.19	3.73
d-ribose high-affinity transport system; membrane-associated protein; rbsd	1.91	0.03
pep-dependent phosphotransferase enzyme iv for cellobiose, arbutin, and salicin; cela	1.90	1.91
galactose-1-epimerase (mutarotase); galm	1.87	1.31
transketolase 1 isozyme; tkta	1.80	1.26
galactokinase; galk	1.80	1.00
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase a; gapa	1.74	0.26
xylose-proton symport; xyle	0.70	1.23
cytoplasmic alpha-amylase; amya	0.61	1.35
formate acetyltransferase 1; pflb	0.60	0.11
transaldolase a; tala	0.42	1.93
trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic; otsb	0.38	6.98
putative transport system permease protein; ydez	0.34	6.59
trehalose-6-phosphate synthase; otsa	0.31	5.14
putative nucleotide di-p-sugar epimerase or dehydratase; wcag	0.21	15.39
Reguladors		
dna-binding protein hlp-ii (hu, bh2, hd, ns); pleiotropic regulator; hns	45.88	21.83
transcriptional repressor of rpib expression; rpir	4.67	3.97
putative yhbh sigma 54 modulator; yfia	3.92	6.64
transcriptional regulator; lldr	3.23	0.17
regulator of melibiose operon; melr	2.15	3.80
transcription regulator; yifda	1.97	1.23

putative 2-component sensor protein; yjdh	1.75	0.78
valine trna synthetase; vals	1.66	0.58
putative 2-component transcriptional regulator; yjdg	1.61	1.16
cyclic amp receptor protein; crp	1.49	0.53
sensor protein phoq; phoq	0.73	0.22
cation transport regulator; chab	0.67	0.33
transcriptional regulator of cai operon; caif	0.64	2.50
putative regulator; yiit	0.63	0.39
putative regulator; yjjq	0.57	2.42
dna-binding protein; h-ns-like protein; chaperone activity; rna splicing?; stpa	0.50	1.17
putative regulator; wcaa	0.47	3.36
putative deor-type transcriptional regulator; b1284	0.46	1.51
putative transcriptional regulator; ygev	0.46	3.16
activator of ntrl gene; osme	0.44	0.69
regulator of gltbdf operon, induction of ntr enzymes; gltf	0.37	3.89
global regulator, starvation conditions; dps	0.33	1.01
putative arac-type regulatory protein; b1499	0.33	7.50
regulator for xapa; xapr	0.32	10.14
probable transcriptional activator for leuabcd operon; leuo	0.29	8.76
positive regulation of bgl operon; bglg	0.27	7.94
putative homeobox protein; b0753	0.20	12.50
positive regulator for ctr capsule biosynthesis, positive transcription factor; rcsa	0.16	14.61
Síntesi de membranes, paret i altres estructures extracel·lulars		
oligopeptide transport; periplasmic binding protein; oppa	4.23	8.78
l-glutamine:d-fructose-6-phosphate aminotransferase; glms	2.19	5.25
probably hexose transferase; lipopolysaccharide core biosynthesis; rfak	1.83	2.82
d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase; penicillin-binding protein 6; dacc	0.64	0.66
putative function in exopolysaccharide production; yccz	0.61	2.52
probable export protein; wzxc	0.51	2.57
putative polysaccharide export protein; wza	0.51	2.93
mannose-1-phosphate guanyltransferase; cpsb	0.44	2.12
putative galactokinase (ec 2.7.1.6).; wcak	0.42	4.49
outer membrane protein x; ompx	0.33	3.35
putative adhesion and penetration protein; b1202	0.31	9.30
cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase; cfa	0.31	10.50
putative transferase; wcaf	0.27	11.34
putative colanic acid biosynthesis glycosyl transferase; wcae	0.27	7.84
gdp-d-mannose dehydratase; gmd	0.18	8.05
udp-glucose 6-dehydrogenase; ugd	0.17	15.43
gdp-mannose mannosyl hydrolase; wcah	0.12	15.77
putative colanic acid polymerase; wcad	0.11	16.95
Motilitat		
periplasmic protein related to spheroblast formation; spy	0.54	1.52
putative fimbrial-like protein; ygil	0.46	1.24
putative fimbrial-like protein; b0943	0.45	4.94
putative outer membrane protein; ycbs	0.29	6.85

putative fimbrial-like protein; b1504	0.22	9.97
putative fimbrial-like protein; ycbq	0.06	17.18
Proteases, xaperones i modificadors post-traduccionals		
heat shock protein; ibpb	7.22	3.88
heat shock protein; ibpa	5.39	7.35
groes, 10 kd chaperone binds to hsp60 in pres. mg-atp, suppressing its atpase activity; mopb	3.27	5.30
groel, chaperone hsp60, peptide-dependent atpase, heat shock protein; mopa	3.03	5.64
chaperone hsp70; dna biosynthesis; autoregulated heat shock proteins; dnaK	2.58	9.69
heat shock protein hslvu, atpase subunit, homologous to chaperones; hslu	2.42	7.88
dna-binding, atp-dependent protease la; heat shock k-protein; lon	2.30	5.92
chaperone hsp90, heat shock protein c 62.5; htpg	2.00	2.78
heat shock protein hslvu, proteasome-related peptidase subunit; hslv	1.89	1.15
heat shock protein; clpb	1.88	0.34
pyruvate formate lyase activating enzyme 1; pfla	0.67	1.05
heme exporter protein b, cytochrome c-type biogenesis protein; ccmb	0.60	5.37
nickel incorporation into hydrogenase-1 proteins; hyaf	0.42	3.04
putative chaperone; ycbr	0.32	1.58
curved dna-binding protein; functions closely related to dnaj; cbpa	0.27	7.79
possible chaperone; b1600; ydgf	0.24	6.73
Producció i conversió d'energia		
coa-linked acetaldehyde dehydrogenase and iron-dependent alcohol dehydrogenase; pyruvate-formate-lyase deactivase; adhe	22.98	8.31
succinate dehydrogenase, iron sulfur protein; sdhb	4.42	1.53
glycerol kinase; glpk	3.97	5.04
glycerophosphodiester phosphodiesterase, periplasmic; glpq	3.93	2.96
2-oxoglutarate dehydrogenase (decarboxylase component); suca	3.32	5.70
fumarate reductase, anaerobic, iron-sulfur protein subunit; frdb	3.00	7.45
succinyl-coa synthetase, alpha subunit; succd	2.75	8.11
nadh dehydrogenase i chain h; nuoh	2.69	9.79
membrane-bound atp synthase, f1 sector, epsilon-subunit; atpc	2.60	2.22
2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydrolipoyltranssuccinase e2 component); such	2.53	0.01
nadh dehydrogenase i chain b; nuob	2.43	0.92
membrane-bound atp synthase, f1 sector, beta-subunit; atpd	2.42	7.88
phosphoenolpyruvate carboxykinase; pcka	2.35	3.92
nadh dehydrogenase i chain e; nuoe	2.22	1.93
nadh dehydrogenase i chain i; nuoi	2.22	3.88
formate dehydrogenase-o, major subunit; fdog	2.20	4.50
membrane-bound atp synthase, f1 sector, gamma-subunit; atpg	2.14	4.78
nadh dehydrogenase i chain g; nuog	2.05	3.44
nadh dehydrogenase i chain m; nuom	1.97	0.30
fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide; frdc	1.96	7.61
nadh dehydrogenase i chain l; nuol	1.92	3.11
putative multimodular enzyme; b2463	1.86	0.15

chorismate lyase; ubic	1.74	0.42
fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide; frdd	1.69	3.04
putative oxidoreductase; yqhd	1.67	1.49
phosphoenolpyruvate carboxylase; ppc	1.49	0.92
putative oxidoreductase; yncb	0.58	1.57
hydrogenase-1 large subunit; hyab	0.57	1.57
pyruvate oxidase; poxb	0.46	4.33
cryptic nitrate reductase 2, alpha subunit; narz	0.43	2.33
atp-binding component of cytochrome-related transport; cydc	0.43	3.47
probable third cytochrome oxidase, subunit i; appc	0.38	1.18
putative oxidoreductase, major subunit; b1501	0.33	3.12
putative cytochrome; b1057	0.31	8.48
nitrite reductase (nad(p)h) subunit; nird	0.28	0.44
probable third cytochrome oxidase, subunit ii; appb	0.25	6.54
Transport i metabolisme dels nucleòtids		
thymidine kinase; tdk	2.74	5.17
diadenosine tetraphosphatase; apha	2.18	3.85
deoxyuridinetriphosphatase; dut	2.12	2.19
2':3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase; cpdb	1.57	0.19
anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase; nrdd	1.56	0.54
thymidine phosphorylase; deoa	0.55	0.27
probable adenine deaminase (synthesis xanthine); yicp	0.25	11.42
putative alpha helical protein; ybel	0.11	13.27
Replicació, recombinació i reparació del DNA		
facilitated diffusion of glycerol; glpf	2.85	6.58
dna-binding protein hu-alpha (hu-2); hupa	1.93	3.51
host restriction; endonuclease r; hsdR	1.67	1.29
dna-binding protein hu-beta, ns1 (hu-1); hupb	1.65	0.63
dna biosynthesis; dna primase; dnag	1.63	2.05
dna-damage-inducible protein f; dinf	1.58	1.85
excinuclease abc, subunit c; repair of uv damage to dna; uvrc	0.60	2.28
integration host factor (ihf), beta subunit; site-specific recombination; himd	0.43	9.27
Metabolisme i transport de lípids		
d-serine dehydratase (deaminase); dsda	2.84	0.85
outer membrane receptor for transport of vitamin b12, e colicins, and bacteriophage bf23; btub	1.74	3.80
gamma-glutamate-cysteine ligase; gsha	0.50	5.20
molybdopterin biosynthesis, protein c; moac	0.50	3.01
putative oxidoreductase; ygha	0.40	2.13
putative acyl coenzyme a dehydrogenase; aidb	0.36	9.27
putative sugar transferase; b2254	0.27	5.00
Metabolisme i transport de compostos inorgànics		
fructose-bisphosphate aldolase, class ii; fba	1.97	2.60
superoxide dismutase precursor (cu-zn); sodc	0.61	0.97
probable formate transporter (formate channel 1); foca	0.43	1.52
bacterioferrin, an iron storage homoprotein; bfr	0.43	0.55
nitrite extrusion protein 2; naru	0.39	3.68

catalase; hydroperoxidase hp11(iii); kate	0.27	12.62
Síntesi, transport i metabolisme de metabòlits secundaris i toxines		
2-keto-4-pentenoate hydratase; mhp1	3.42	9.68
biotin biosynthesis; reaction prior to pimeloyl coa; bioc	0.35	9.80
nad-dependent 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, dehydroxylation of bile acids; hdha	0.23	10.96
hemolysin e; hlye	0.08	10.16
Altres funcions		
mg-dependent dnase; yj1v	0.48	1.19
phosphoanhydride phosphorylase; ph 2.5 acid phosphatase; periplasmic; appa	0.40	6.83
outer membrane protein induced after carbon starvation; slp	0.16	5.24
Gens de funció desconeguda i proteïnes hipotètiques		
putative atp-binding component of a transport system; yjcw	3.80	2.46
orf, hypothetical protein; yjfn	2.92	0.54
orf, hypothetical protein; yj1c	2.77	7.67
orf, hypothetical protein; yfec	2.61	6.51
orf, hypothetical protein; yj1x	2.58	3.18
orf, hypothetical protein; yfed	2.30	1.49
orf, hypothetical protein; ychh	2.20	3.07
putative transport protein; yhip	2.16	3.25
orf, hypothetical protein; ygad	2.13	3.43
phage shock protein; pspe	2.09	2.45
small membrane protein a; smpa	2.06	1.45
orf, hypothetical protein; yhcb	2.00	6.13
orf, hypothetical protein; yaaf	1.94	2.34
orf, hypothetical protein; yj1g	1.85	1.55
orf, hypothetical protein; ybed	1.78	0.47
putative oxidoreductase; yj1c	1.77	4.19
orf, hypothetical protein; yhgi	1.77	1.37
orf, hypothetical protein; b3472	1.74	3.10
orf, hypothetical protein; ygah	1.74	1.24
orf, hypothetical protein; yhfa	1.67	2.10
orf, hypothetical protein; yj1u	1.67	1.48
putative enzyme; ygca	1.64	2.51
orf, hypothetical protein; yead	1.61	0.57
orf, hypothetical protein; b1445	1.61	0.11
orf, hypothetical protein; yj1f	1.58	1.27
putative membrane transport protein; b1433	1.57	1.81
orf, hypothetical protein; ygbp	1.54	1.58
orf, hypothetical protein; yj1h	1.47	0.65
orf, hypothetical protein; ycin	1.47	0.17
putative peptidase; pepb	1.46	0.34
orf, hypothetical protein; ycbw	0.68	0.51
putative polyprotein; b1045	0.68	0.69
orf, hypothetical protein; ycea	0.68	0.09
orf, hypothetical protein; yj1m	0.66	1.48
orf, hypothetical protein; b1724	0.65	0.37

orf, hypothetical protein; yrbl	0.65	0.07
orf, hypothetical protein; ymca	0.65	1.16
orf, hypothetical protein; year	0.64	2.33
orf, hypothetical protein; b2384	0.63	2.34
orf, hypothetical protein; b1007	0.62	0.90
putative atp-binding component of a transport system; ycbe	0.61	0.42
putative transport system permease protein; yehz	0.60	0.83
putative transport protein; yggb	0.60	3.04
orf, hypothetical protein; b2071	0.59	0.10
orf, hypothetical protein; ybhh	0.59	2.78
orf, hypothetical protein; yjbr	0.59	2.29
orf, hypothetical protein; b1957	0.58	0.59
orf, hypothetical protein; b1593	0.57	1.17
orf, hypothetical protein; ytfe	0.57	1.38
orf, hypothetical protein; ypha	0.57	0.92
orf, hypothetical protein; b2080	0.56	1.97
putative transport protein; ytfl	0.56	0.26
orf, hypothetical protein; ycdq	0.55	0.45
orf, hypothetical protein; yjyy	0.55	2.02
putative atp-binding component of a transport system; ynhd	0.54	0.69
orf, hypothetical protein; yecf	0.52	1.96
orf, hypothetical protein; yjbq	0.51	2.16
orf, hypothetical protein; yhco	0.51	1.12
putative outer membrane lipoprotein; b2505	0.51	5.31
orf, hypothetical protein; yfjj	0.51	7.05
orf, hypothetical protein; b1330	0.51	0.27
orf, hypothetical protein; yeaj	0.50	4.08
orf, hypothetical protein; ygiw	0.50	0.43
putative regulator; ybbu	0.50	6.06
putative vimentin; yjda	0.50	0.59
orf, hypothetical protein; ygbf	0.50	2.66
orf, hypothetical protein; b2257	0.49	0.66
orf, hypothetical protein; yiis	0.49	1.49
orf, hypothetical protein; ygam	0.48	0.71
orf, hypothetical protein; yhif	0.48	5.41
orf, hypothetical protein; yjbf	0.48	4.17
orf, hypothetical protein; ynhe	0.48	4.01
orf, hypothetical protein; yjdk	0.48	0.64
orf, hypothetical protein; ybfg	0.46	6.78
orf, hypothetical protein; b1810	0.45	3.05
orf, hypothetical protein; b2755	0.44	2.16
orf, hypothetical protein; yeah	0.43	2.59
orf, hypothetical protein; yjhs	0.43	3.10
orf, hypothetical protein; yjju	0.43	4.94
orf, hypothetical protein; yeag	0.42	3.62
putative ribosomal protein; ycdv	0.42	8.36
orf, hypothetical protein; b1172	0.42	3.48
orf, hypothetical protein; b2083	0.42	1.85

orf, hypothetical protein; b2084	0.41	2.36
acid shock protein; asr	0.40	5.77
orf, hypothetical protein; yaib	0.40	5.61
orf, hypothetical protein; b1550	0.39	0.21
putative transformylase; b2255	0.39	9.63
orf, hypothetical protein; b1450	0.38	7.46
orf, hypothetical protein; yehe	0.38	6.07
orf, hypothetical protein; b2359	0.38	7.55
orf, hypothetical protein; b2097	0.37	6.81
orf, hypothetical protein; yjbe	0.34	8.10
orf, hypothetical protein; elab	0.32	2.38
orf, hypothetical protein; yjht	0.32	6.20
putative transport system permease protein; yhiv	0.31	8.48
putative enzyme; b2253	0.30	2.99
orf, hypothetical protein; yccj	0.30	1.56
putative transmembrane subunit; ybif	0.30	7.49
osmotically inducible protein; osmc	0.29	8.65
orf, hypothetical protein; ycdy	0.29	3.75
orf, hypothetical protein; ykfe	0.28	12.47
orf, hypothetical protein; ydej	0.28	7.43
orf, hypothetical protein; wcam	0.28	8.51
orf, hypothetical protein; b2085	0.27	7.34
orf, hypothetical protein; b2757	0.26	3.48
orf, hypothetical protein; crca	0.25	4.62
putative enzyme; b1497	0.25	14.06
orf, hypothetical protein; yjha	0.25	7.74
orf, hypothetical protein; yiag	0.25	10.49
orf, hypothetical protein; ydit	0.24	9.38
orf, hypothetical protein; ybjj	0.24	3.51
orf, hypothetical protein; yedu	0.22	1.90
orf, hypothetical protein; yeaq	0.22	9.81
orf, hypothetical protein; b2809	0.22	9.28
orf, hypothetical protein; yccd	0.21	10.54
orf, hypothetical protein; ycac	0.19	9.97
orf, hypothetical protein; yeai	0.18	8.43
orf, hypothetical protein; ycig	0.18	5.27
orf, hypothetical protein; ygck	0.17	2.00
orf, hypothetical protein; ycdf	0.17	13.34
osmotically inducible lipoprotein; osmb	0.15	14.94
orf, hypothetical protein; b1481	0.13	11.18
putative enzyme; yjcp	0.09	10.77
orf, hypothetical protein; yhim	0.07	14.29
orf, hypothetical protein; ydei	0.06	19.34
acid sensitivity protein, putative transporter; xasa	0.06	10.06
orf, hypothetical protein; ycie	0.04	19.69
putative structural proteins; ycif	0.04	15.65

Pel que fa a la comparació entre la soca BSN26HY (*hha ydgT*) respecte la soca BSN27 (*hns*) trobem un total de 320 gens expressats diferencialment. D'aquests n'hi ha 306 que coincideixen amb els gens diferencialment expressats en la comparació entre la soca BSN27 i la soca salvatge (a la taula 4, apartat E, de l'Annex 2 hi trobem el llistat dels 306 gens amb les raons d'expressió per les dues comparacions), i a més, la majoria de les raons d'expressió d'aquests gens en les dues condicions són molt semblants. Aquest resultat suggereix que la soca BSN26HY es comporta com la soca salvatge pel que fa l'expressió d'aquests 305 gens en les condicions estudiades. Entre els 14 gens que tindrien una regulació diferent a la soca BSN26HY respecte la soca BSN27, i que no coincideixen amb els gens diferencialment expressats en la comparació entre la soca BSN27 i la soca salvatge, trobem *argE* (acetilornitina deacetilasa), *glpT* (glicerol-3-fosfat permeasa), *rpiR* (repressor transcripcional de *rpiB*), *valS* (valina tRNA sintetasa), *nuoM* (cadena M de la NADH deshidrogenasa) i *nirD* (subunitat de la nitrit reductasa). La resta corresponen a hipotètiques proteïnes.

Tanmateix, hi ha d'altres gens que no trobem com a diferencialment expressats entre les soques BSN26HY i BSN27, i que sí ho estan a la soca BSN27 respecte la BSN26. Per tant, el resultat sembla indicar que en altres aspectes, el patró d'expressió gènica de la soca BSN26HY és similar al de la soca BSN27, tot i que en la major part dels casos es tracta de gens amb raons d'expressió per sota de 2 o per damunt de 0,5 (és a dir, per sota del doble o per damunt de la meitat), o gens de funció desconeguda. Aquests gens són els que estan detallats a la taula 5 de l'apartat E de l'Annex2.

Per tal d'esbrinar quin gens estan afectats específicament per les mutacions *hha* i *ydgT* ens hem de fixar en la comparació entre la soca BSN26HY respecte la soca salvatge (taula 3.3.4c). Podem observar que només hi ha 22 gens expressats diferencialment en la soca BSN26HY respecte la soca salvatge, 18 dels quals es troben sobreexpressats a la soca *hha ydgT*. Dotze d'aquests gens també els trobem com a diferencialment expressats a la soca BSN27 respecte la soca salvatge, i ho estan en la mateixa direcció, és a dir, en tots els casos es troben sobreexpressats o subexpressats en les soques mutants *hns* i *hha ydgT*. Tot i així, no sempre hi ha valors semblants en la raó d'expressió en les dues comparacions; de fet, es pot dir que en la comparació BSN27/BSN26 les diferències d'expressió són més acusades. Aquests 12 gens són candidats a estar regulats per H-NS, Hha i YdgT:

- *yeiC*, que codifica una hipotètica quinasa, pertanyent a la família de quinases de carbohidrats *pfkB*.

- *ygcK*, proteïna hipotètica de funció desconeguda.
- *yhiE*, també anomenat *gadE*, que codifica una proteïna que s'expressa a pH àcid i activa l'expressió de l'operó *gadA/BC*, un dels tres sistemes induïbles de resistència a l'àcid a *Escherichia coli* (Ma *et al.*, 2003). El sistema *gad* està sotmès a un complex circuit de regulació, en el que s'ha descrit que a més de GadE, entre d'altres, també hi intervé H-NS (Giangrossi *et al.*, 2005). La sobreexpressió de *gadE* en mutants *hns* ha estat descrita prèviament en l'estudi de Hommais *et al.*, (2001).
- *ydcE*, una hipotètica proteïna que ha estat descrita com una 4-oxalocrotonat tautomerasa (Almud *et al.*, 2002).
- *htrL*, que codifica una proteïna implicada en la biosíntesi de LPS.
- *cspI*, proteïna que s'indueix per xoc fred, i que pertany a la família CspA (Wang *et al.*, 1999).
- *ydcQ*, que codifica una possible glicosil transferasa implicada en la biosíntesi de la paret cel·lular.
- *cutC*, un transportador de coure responsable de l'homeostasi d'aquest metall i la seva detoxificació.
- b1824, que codifica la hipotètica proteïna YobF, de funció desconeguda.
- *sucD*, que codifica la cadena alfa de la succinil-CoA sintetasa, enzim del cicle dels àcids tricarbòxílics.
- *pspC*, que codifica el regulador positiu de l'operó *psp*, induït en resposta al xoc tèrmic, a l'etanol, al xoc osmòtic i a la infecció per fags filamentosos.
- b1489, orf que codificaria una possible fosfodiesterasa.

A més d'aquests gens, que presenten una expressió alterada també en mutants *hns*, hi ha altres gens que s'han trobat diferencialment expressats només a la soca BSN26HY:

- *ompC*, que codifica una proteïna de membrana externa, una porina que forma porus de difusió passiva que permeten el pas de materials hidrofòbics de baix pes molecular. La sobreexpressió d'aquesta proteïna en mutants *hha ydgT* ja ha estat descrita (Paytubi, 2004). Per una altra banda, tot i que en aquest estudi no hem trobat una expressió diferencial d'*ompC* entre les soques *hns* i salvatge, també s'ha descrit com a sobreexpressada en mutants *hns* (Hommais *et al.*, 2001).

- b2351, o *yfdH*, una hipotètica bactoprenol glicosil transferasa, implicada en la biosíntesi de glicà. La sobreexpressió d'aquest gen ha estat també descrita en mutants *hns* (Hommais *et al.*, 2001).

- *yjcW*, un putatiu transportador ABC implicat en el transport i el metabolisme de carbohidrats.

- b2352, o *yfdI*, hipotètica lligasa.

- *rhcC*, que codifica una proteïna de l'element *rhc*, repeticions en el genoma d'*Escherichia coli* (Zhao *et al.*, 1993). Altres proteïnes d'aquest tipus (RhsA i RhsD) han estat descrites com sobreexpressades en mutants *hns* prèviament (Hommais *et al.*, 2001).

- *ydgR*, proteïna identificada recentment com a transportadora de pèptids pertanyent al reguló OmpR-depenent (Goh *et al.*, 2004).

- *yeiN*, hipotètica proteïna de funció desconeguda.

- *rseA*, que codifica un factor anti sigma E, el factor sigma implicat en la resposta a estrès.

- *rpoE*, que codifica el factor sigma E. Els gens *rseA* i *rpoE* formen part d'un mateix operó.

- b2997, descrita com la subunitat petita de la hidrogenasa HYD2.

Taula 3.3.4c Gens expressats diferencialment a la soca BSN26HY (*hha*⁻ *ydgt*⁻) respecte la soca salvatge BSN26. Per als gens que també es troben diferencialment expressats en la comparació entre la soca BSN27 i la soca BSN26 també s'indiquen les raons d'expressió (M1W).

Descripció i gen	Raó d'expressió	B	Raó d'expressió <i>hns</i> /wt
outer membrane protein 1b (ib;c); ompc	19.10	0.29	
putative kinase; yeic	3.25	0.98	3.42
putative glycan biosynthesis enzyme; b2351	3.12	0.99	
orf, hypothetical protein; ygck	3.07	0.10	17.79
putative regulator; yhie; gade	2.49	0.06	5.16
putative atp-binding component of a transport system; yjcw	2.48	0.97	
putative ligase; b2352	2.28	0.95	
rhsc protein in rhs element; rhsc	2.17	0.14	
putative transport protein; ydgr	2.07	0.55	
orf, hypothetical protein; yein	2.00	0.74	
orf, hypothetical protein; ydce	1.89	0.23	2.11
involved in lipopolysaccharide biosynthesis; htrI	1.89	0.33	2.42

cold shock-like protein; cspi	1.67	1.17	2.42
orf, hypothetical protein; ycdq	1.60	0.56	2.90
sigma-e factor, negative regulatory protein; rsea	1.50	1.09	
copper homeostasis protein; cutc	1.49	1.66	1.91
rna polymerase, sigma-e factor; heat shock and oxidative stress; rpoe	1.44	0.78	
orf, hypothetical protein; b1824	1.43	1.27	1.87
succinyl-coa synthetase, alpha subunit; succd	0.68	0.16	0.25
putative hydrogenase subunit; b2997	0.64	0.43	
phage shock protein: activates phage shock-protein expression; pspc	0.63	0.20	0.61
putative sulfatase; b1498	0.56	0.55	0.49