

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO Y DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL *fur* EN LA PATOFISIOLOGÍA DE *Escherichia coli* O157:H7

Iannelli, Daniela Noemí – L.U.: 1.089.150

Licenciatura en Biotecnología

**Tutor: Marques Da Silva, Wanderson, Instituto de Agrobiotecnología y
Biología Molecular (IABIMO) - INTA/CONICET**

**Co-Tutor: Cataldi, Angel Adrian, Instituto de Agrobiotecnología y Biología
Molecular (IABIMO) - INTA/CONICET**

**Co-Tutor: Vadillo, Martín Javier, Universidad Argentina de la
Empresa (UADE)**

Colaborador/es:

**Dr. Jinlong Bei, AGRO-Biological Gene Research Center, Guangdong Academy of
Agricultural Sciences**

2022

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| INDICE DE FIGURAS..... | 6 |
| INDICE DE TABLAS..... | 8 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 9 |
| RESUMEN..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 12 |
| 1.2. <i>E. COLI</i> O157:H7..... | 13 |
| 1.2.1. Reservorio y transmisión..... | 13 |
| 1.2.2. Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y datos epidemiológicos..... | 14 |
| 1.2.3. Diferencias genómicas entre <i>E. coli</i> comensal y <i>E. coli</i> O157:H7..... | 15 |
| 1.2.4. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7..... | 16 |
| 1.2.4.1. Toxinas Shiga..... | 16 |
| 1.2.4.3. Plásmido pO157..... | 18 |
| 1.2.4.4. Adhesinas..... | 20 |
| 1.2.5. Etapas de la patogenecis..... | 21 |
| 1.2.5.1. Adherencia Inicial..... | 21 |
| 1.2.5.2. Translocación de señales y transducción de señales..... | 21 |
| 1.2.5.3. Adherencia íntima y producción de toxina Shiga..... | 22 |
| 1.3. LA IMPORTANCIA DEL HIERRO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS..... | 23 |
| 1.3.1. Estrés nutricional generado por la biodisponibilidad de hierro..... | 24 |
| 1.3.2. Homeostasis y sistemas de adquisición de hierro en bacterias..... | 25 |
| 1.3.3. Ferric uptake regulator (<i>fur</i>) y mRNA..... | 26 |
| 1.3.4. El regulón <i>Fur</i> | 28 |
| 1.3.5. <i>Fur</i> en la virulencia y patogénesis de <i>E. coli</i> O157:H7..... | 29 |
| 2. OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL..... | 30 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO BACTERIANO..... | 31 |
| 3.2. OLIGONUCLEÓTIDOS O CEBADORES..... | 32 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.3. | GELES DE AGAROSA Y CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS | 33 |
| 3.4. | PREPARACIÓN DE <i>E. COLI</i> O157:H7 ELECTROCOMPETENTE | 33 |
| 3.5. | PREPARACIÓN DE <i>E. COLI</i> DH5A QUIMICOMPETENTES | 34 |
| 3.6. | GENERACIÓN DE UNA CEPA DE <i>E. COLI</i> O157:H7 MUTANTE PARA EL GEN <i>FUR</i> | 34 |
| 3.6.1. | <i>Generación del amplicón mutagénico</i> | 35 |
| 3.6.2. | <i>Transformación de E. coli O157:H7 mediante electroporación</i> | 36 |
| 3.6.3. | <i>Verificación de la presencia del caset de cloranfenicol en la cepa E. coli O157:H7 Rafaela II.</i> | 37 |
| 3.7. | COMPLEMENTACIÓN DE LA CEPA MUTANTE Δ <i>FUR</i> | 37 |
| 3.7.1. | <i>Amplificación de la secuencia de fur y su región promotora</i> | 37 |
| 3.7.2. | <i>Clonado de fur más su región promotora en el plásmido pGEM-Teasy</i> | 38 |
| 3.7.2.1. | <i>Ligación</i> | 38 |
| 3.7.2.2. | <i>Trasformación de E. coli DH5a mediante shock térmico</i> | 39 |
| 3.7.2.3. | <i>Verificación de la presencia del inserto Inter-fur en el vector pGEM-T easy</i> | 39 |
| 3.7.3. | <i>Subclonación de inter-fur en el plásmido pLF</i> | 40 |
| 3.7.3.1. | <i>Digestión enzimática del plásmido pGfurC y el vector pLF</i> | 40 |
| 3.7.3.2. | <i>Ligación de fur más su región promotora en el plásmido pLF</i> | 40 |
| 3.7.3.3. | <i>Trasformación de E. coli DH5a con el plásmido pLFfurC mediante shock térmico</i> | 41 |
| 3.7.3.4. | <i>Verificación de presencia del inserto Inter-fur en el plásmido pLF</i> | 41 |
| 3.7.3.5. | <i>Transformación de la cepa E. coli O157:H7 Rafaela II Δfur</i> | 41 |
| 3.7.3.6. | <i>Verificación de la presencia del plásmido pLFfurC en la cepa E. coli O157:H7 Rafaela II Δfur</i> | 42 |
| 3.8. | EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS TIPO SALVAJE Y MUTANTE DE <i>E. COLI</i> O157:H7 ANTE DIFERENTES BIODISPONIBILIDADES DE HIERRO | 42 |
| 3.9. | ANÁLISIS PROTEÓMICA DIFERENCIAL CUANTITATIVA BASADO EN <i>TÁNDEM MASS TAG</i> (TMT)..... | 43 |
| 3.9.1. | <i>Extracción de proteínas a partir del lisado bacteriano total</i> | 43 |
| 3.9.2. | <i>Resolución electroforética en gel de poliacrilamida</i> | 44 |
| 3.9.3. | <i>Digestión de proteínas</i> | 44 |
| 3.9.4. | <i>Etiquetado TMT</i> | 44 |
| 3.9.5. | <i>Separación de fase invertida de pH alto</i> | 45 |
| 3.9.6. | <i>Análisis nano-HPLC-ms/ms</i> | 45 |
| 3.9.7. | <i>Análisis de datos</i> | 46 |
| 3.10. | ENSAYO DE ADHESIÓN DE LAS CEPAS TIPO SALVAJE Y MUTANTE DE <i>E. COLI</i> O157:H7 A CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES HCT-8..... | 46 |
| 3.10.1. | <i>Preparación de monocapas celulares de células HCT-8</i> | 46 |
| 3.10.2. | <i>Ensayo de adhesión celular</i> | 47 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.11. | ENSAYO DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE LAS CEPAS TIPO SALVAJE Y MUTANTE DE <i>E. COLI</i> O157:H7 A MACRÓFAGOS MURINOS RAW264.7..... | 47 |
| 3.11.1. | <i>Preparación de monocapas celulares de células RAW264.7.</i> | 47 |
| 3.11.2. | <i>Ensayo de infección.</i> | 48 |
| 3.12. | ENSAYO DE RESISTENCIA AL ESTRÉS ÁCIDO | 49 |
| 3.13. | ENSAYO DE MOTILIDADEN AGAR BLANDO | 49 |
| 3.14. | ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA | 50 |
| 3.14.1. | <i>Extracción de RNA total de las cepas de E. coli O157:H7</i> | 50 |
| 3.14.2. | <i>Ensayo de retro-transcripción</i> | 51 |
| 3.14.3. | <i>PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)</i> | 51 |
| 3.15. | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO..... | 52 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 53 |
| 4.1. | PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> DEL REGULÓN <i>FUR</i> EN <i>E. COLI</i> O157:H7 | 53 |
| 4.1.1. | <i>Predicción de las secuencias fur-box en las regiones promotoras mediante PRODORIC</i> | 54 |
| 4.1.2. | <i>Anotación funcional</i> | 56 |
| 4.1.3. | <i>Predicción de islas genómicas y secuencias de fagos en el genoma de la cepa E. coli O157:H7 Rafaela II</i> | 57 |
| 4.2. | EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> O157:H7 EN DIFERENTES DISPONIBILIDADES DE HIERRO | 63 |
| 4.3. | EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA PATOGENÉISIS DE <i>E. COLI</i> O157:H7 | 64 |
| 4.4. | GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE <i>E. COLI</i> O157:H7 Δ <i>FUR</i> | 66 |
| 4.4.1. | <i>Generación del amplicón para mutagénesis</i> | 66 |
| 4.4.2. | <i>Transformación de la cepa E. coli O157:H7 pKD46 con el amplicón para mutagénesis</i> | 67 |
| 4.5. | COMPLEMENTACIÓN DE LA CEPA MUTANTE Δ <i>FUR</i> | 68 |
| 4.5.1. | <i>Generación del inserto inter-fur</i> | 68 |
| 4.5.2. | <i>Generación del plásmido pGfurC</i> | 70 |
| 4.5.3. | <i>Generación del plásmido pLFfurC y transformación de la cepa tipo mutante de E. coli O157:H7 Δfur</i> | 71 |
| 4.6. | EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> O157:H7 Δ <i>FUR</i> , Δ <i>FUR/pFURC</i> Y Δ <i>FUR/pLF</i> EN DIFERENTES BIODIPONIBILIDADES DE HIERRO | 72 |
| 4.7. | ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO CUANTITATIVO | 73 |
| 4.8. | EL GEN <i>FUR</i> CONTRIBUYE A LA ADHESIÓN DE <i>E. COLI</i> O157:H7 A CÉLULAS EPITELIALES | 79 |
| 4.9. | EL GEN <i>FUR</i> CONTRIBUYE A LA SUPERVIVENCIA DE <i>E. COLI</i> O157:H7 A LOS MACRÓFAGOS | 81 |

| | | |
|---------------------------|--|------------|
| 4.10. | EVALUACIÓN DEL ROL DE <i>FUR</i> EN LA RESISTENCIA DE <i>E. COLI</i> O157:H7 AL ESTRÉS ÁCIDO | 83 |
| 4.11. | EVALUACIÓN DEL ROL DE <i>FUR</i> EN LA MOTILIDAD DE <i>E. COLI</i> O157:H7 | 85 |
| 4.12. | ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA QRT-PCR..... | 88 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 90 |
| 6. | ANEXO I..... | 91 |
| 7. | ANEXO II..... | 113 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 153 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: SITIOS DE COLONIZACIÓN DE <i>E. COLI</i> PATOGENA(CROXEN M. A., 2010)..... | 13 |
| FIGURA 2: VÍAS DE TRANSMISIÓN DE EHEC AL HUMANO. | 14 |
| FIGURA 3: CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES CODIFICADOS EN LAS ISLAS-O. | 16 |
| FIGURA 4: ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL LOCUS DE BORRAMIENTO DE ENTEROCITOS (LEE)..... | 18 |
| FIGURA 5: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA FORMACIÓN DE LESIONES A/E. | 23 |
| FIGURA 6: SISTEMAS BACTERIANOS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.. | 26 |
| FIGURA 7: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA REGULACIÓN FUR Y RYHB. | 27 |
| FIGURA 8: DETERMINANTES DE VIRULENCIA REGULADOS POR FUR Y RYHB EN BACTERIAS PATÓGENAS. | 28 |
| FIGURA 9: ESTRATEGIA DE MUTAGÉNESIS BASADA EN EL SISTEMA A RED PARA GENERAR UNA CEPA KNOCK-OUT DEL GEN FURADAPTADO DE DATSENKO & WANNER, 2000. | 35 |
| FIGURA 10: MAPA DEL VECTOR PGEM®-TEASY..... | 39 |
| FIGURA 11: ESQUEMA DEL PROCESO DE LA ESTRATEGIA BIOINFORMÁTICA. | 53 |
| FIGURA 12: ANÁLISIS COMPARATIVO IN-SILICO DE REGIONES FUR-BOX EN K-12 Y RAFAELA II POR PRODORIC.54 | |
| FIGURA 13: PREDICCIÓN DE PROCESOS BIOLÓGICOS REGULADOS POR FUR EN K-12 Y RAFAELA II..... | 57 |
| FIGURA 14: EL HIERRO CONTRIBUYE PARA EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> O157:H7..... | 64 |
| FIGURA 15: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR A DISTINTAS BIODISPONIBILIDADES DE HIERRO. | 65 |
| FIGURA 16: AMPLIFICACIÓN DEL CASSET DE RESISTENCIA A CLORANFENICOL DEL PLÁSMIDO PKD3. | 66 |
| FIGURA 17: VERIFICACIÓN DE LA MUTAGÉNESIS DEL GEN FUR EN <i>E. COLI</i> RAFAELA II.. | 67 |
| FIGURA 18: IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE FUR..... | 69 |
| FIGURA 19. AMPLIFICACIÓN DEL GEN FUR + SU REGIÓN PROMOTORA POR PCR..... | 70 |
| FIGURA 20: VERIFICACIÓN POR PCR DEL CLONADO DE INTER-FUR EN PGEM-T EASY. | 71 |
| FIGURA 21: DIGESTIÓN DE DEL PLÁSMIDO PGFURC Y EL VECTOR PLF.. | 71 |
| FIGURA 22: VERIFICACIÓN POR PCR DEL CLONADO DE INTER-FUR EN PLF. | 72 |
| FIGURA 23: ANÁLISIS DEL PERFIL DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> O157:H7 Y LA CEPA ISOGÉNICA Δ FUR..... | 73 |
| FIGURA 24: VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LAS EXTRACCIONES PROTEICAS MEDIANTE SDS-PAGE 12%.... | 74 |
| FIGURA 25: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR HEATMAPSPLOT TOP 300..... | 75 |
| FIGURA 26: ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE REGULADAS ENTRE LOS DOS ENSAYOS EXPERIMENTALES RAFAELA II LB+PBD VS LB Y Δ FUR VS RAFAELA II (SALVAJE)..... | 76 |
| FIGURA 27: ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE TÉRMINOS GO DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN <i>E. COLI</i> O157:H7 RAFAELA II LB+BPD VS LB. | 77 |
| FIGURA 28: ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE TÉRMINOS GO DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN <i>E. COLI</i> O157:H7 RAFAELA II Δ FUR VS RAFAELA II. | 78 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 29: EL GEN FUR ES ESTÁ INVOLUCRADO EN EL PROCESO DE ADHESIÓN DE <i>E. COLI</i> O157:H7 A CÉLULAS INTESTINALES EPITELIALES..... | 80 |
| FIGURA 30: SUPERVIVENCIA DE LA <i>E. COLI</i> O157:H7 LUEGO LA INCUBACIÓN CON MACRÓFAGOS..... | 82 |
| FIGURA 31: SUPERVIVENCIA DE LA <i>E. COLI</i> O157:H7 AL ESTÉS ÁCIDO..... | 84 |
| FIGURA 32: LA AUSENCIA DEL GEN FUR REDUCE LA MOTILIDAD DE <i>E. COLI</i> O157:H7.. | 86 |
| FIGURA 33: ANÁLISIS DEL ROL DE FUR EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE STC _E Y FLIC _C MEDIANTE RT-QPCR. RTQ-PCR DEL GEN STC _E Y FLIC _C DE <i>E. COLI</i> O157:H7 RAFAELA II (SALVAJE), Δ FUR Y Δ FUR/pFURC EN MEDIO LB..... | 89 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| TABLA 1: CASOS, TASAS Y DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO PARA STEC. ARGENTINA. PERÍODO 2016-2020. (MINISTERIO DE SALUD, 2021)..... | 15 |
| TABLA 2: CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO..... | 31 |
| TABLA 3: VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO..... | 32 |
| TABLA 4: OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO..... | 32 |
| TABLA 5: PROGRAMA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CASET DE RESISTENCIA A CLORANFENICOL. | 35 |
| TABLA 6: PROGRAMA DE PCR PARA LA VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL CASET DE CLORANFENICOL. | 37 |
| TABLA 7: FACTORES DE VIRULENCIA CON POSIBLES SECUENCIAS FUR-BOX..... | 55 |
| TABLA 8: LOCALIZACIÓN DE GENES CON PREDICCIÓN POSITIVA PARA REGIONES FUR-BOX EXCLUSIVOS DE RAFAELA II. | 58 |
| TABLA 9. GENES DE <i>E. COLI</i> O157:H7 INVOLUCRADOS EN LA SUPERVIVENCIA AL ESTRÉS ÁCIDO. | 85 |
| TABLA 10. GENES DE <i>E. COLI</i> O157:H7 INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN, SÍNTESIS Y ENSAMBLADO FLAGELAR. | 86 |
| TABLA 11: PREDICCIÓN DE GENES DE <i>E. COLI</i> O157:H7 RAFAELA II CON SECUENCIAS FUR-BOX EN SU REGIÓN PROMOTORA MEDIANTE PRODORIC..... | 91 |
| TABLA 12: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL..... | 113 |

Agradecimientos

La finalización del presente trabajo final para obtener el título de Licenciatura en Biotecnología no hubiese sido posible sin el apoyo de un gran grupo de personas que me alentaron a seguir adelante y que me enseñaron que los errores sirven para prender y crecer.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis tutores, el Dr. Wanderson Marques Da Silva y el Dr. Angel Cataldi por darme la posibilidad de formar parte de su grupo de investigación sabiendo los horarios limitados que tenía para ir al laboratorio. Quiero agradecerles por todo el conocimiento que me brindaron y por acompañarme en mis primeros pasos como profesional presentando el trabajo realizado en seminarios y congresos.

Gracias a mi familia, Claudio, Nancy, Kevin, Vera y Miriam por haberme soportado en noches enteras de estudio y estrés a lo largo de la carrera. A su vez, este trabajo no hubiese sido posible sin su aliento constante, durante los últimos dos años vivieron el día a día de mi proyecto final como si hubiesen estado en la mesada al lado mio. Gracias a mi abuela Beatriz por haberme enseñado a cuestionar mi entorno, que un tropezón no es caída y que no importa cuanto tardemos, lo importante es que llegemos. El apoyo incondicional de mi familia fue el gran impulso que se lleva el mérito de cada meta cumplida a lo largo de mi vida.

También quiero agradecerles a mis compañeros de la facultad, Micaela, Joaquín, Carla, Luz, Micaela, Paula y Juan que con el tiempo se transformaron en amigos y compañeros de vida. Un camino en donde más de una vez aparecieron catástrofes climáticas ustedes lo llenaron de ambulancias y chalecos salva vidas. Estoy inmensamente agradecida por todo su apoyo desde el primer hasta el último día de universidad.

Por ultimo, quiero agradecerle a la Universidad Argentina de la Empresa y a todos los docentes de la carrera de Biotecnología por incentivar me a aprender y formarme como profesional.

Resumen

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 es un patógeno zoonótico capaz de causar diarrea severa y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. Estudios han demostrado que la expresión de estos factores de virulencia y procesos involucrados en la patogénesis de *E. coli* O157:H7 está directamente relacionada a diferentes estímulos ambientales (temperatura, cationes, pH y osmolaridad) y nutricionales. *Ferric uptake regulator* (*fur*) es un regulador transcripcional bacteriano involucrado en la regulación de la adquisición y metabolismo del hierro. Además de eso, *fur* regula directa o indirectamente genes relacionados a diferentes procesos biológicos. Estudios han demostrado que tanto Fur como el hierro juegan un rol importante en la fisiología y patogénesis de diferentes bacterias, con respecto a *E. coli* O157:H7 todavía hay poco conocimiento de la asociación del *fur* con su patogénesis. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar el regulón Fur en *E. coli* O157:H7 *in silico* y a nivel proteómico, además de evaluar la relación de este regulador transcripcional con los procesos involucrados con la patofisiología de *E. coli* O157:H7. El análisis *in silico* permitió la predicción de 427 genes con secuencias fur-box en sus regiones promotoras. Luego se vio que 47 genes se encuentran ubicados en islas genómicas y/o secuencias de fagos que están insertadas en el genoma de la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II. A partir del análisis proteómico comparativo cuantitativo realizado con la cepa mutante para el gen *fur* y con la cepa Rafaela II en diferentes disponibilidades de hierro, fue observada una diferencia de abundancia de proteínas involucradas en procesos claves para la patogénesis de *E. coli* O157:H7 como la respuesta a estímulos generada por antibióticos y el mantenimiento de la localización bacteriana. Al evaluar el impacto de la mutación del gen *fur* en procesos asociados a la patofisiología de *E. coli* O157:H7, se vio que la mutación reduce la adhesión celular, motilidad y supervivencia en macrófagos de *E. coli* O157:H7. A su vez, con respecto al estrés ácido, la cepa Δfur mostró mayor resistencia al mismo en relación a la cepa salvaje. A raíz de los hechos descriptos, en este trabajo se demostró por primera vez que *fur* cumple un papel en la patofisiología de *E. coli* O157:H7.

Abstract

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a zoonotic pathogen capable of causing severe diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. Studies have shown that the expression of these virulence factors and processes involved in the pathogenesis of *E. coli* O157:H7 is directly related to different environmental (temperature, cations, pH and osmolarity) and nutritional stimuli. Ferric uptake regulator (*fur*) is a bacterial transcriptional factor involved in the regulation of iron acquisition and metabolism. Besides that, *fur* also regulates directly or indirectly genes related to different biological processes. Studies have shown that both Fur and iron play an important role in the physiology and pathogenesis of different bacteria, regarding *E. coli* O157:H7 there is still little knowledge of the association of *fur* with its pathogenesis. Therefore, the present work aims to characterize the Fur regulon in *E. coli* O157:H7 in silico and at a proteomic level, in addition to evaluate the relationship of this transcriptional factor with the processes involved in the pathophysiology of *E. coli* O157:H7. The in-silico analysis allowed the prediction of 427 genes with *fur*-box sequences in their promoter regions. Then it was found that 47 genes are located in genomic islands and/or phage sequences that are inserted into the genome of the *E. coli* O157:H7 Rafaela II strain. From the quantitative comparative proteomic analysis carried out with the mutant strain for the *fur* gene and with the Rafaela II strain in different iron availability, a difference in the abundance of proteins involved in key processes for the pathogenesis of *E. coli* O157:H7 was observed such as the response to stimuli generated by antibiotics and the maintenance of bacterial localization. When evaluating the impact of the *fur* gene mutation on processes associated with the pathophysiology of *E. coli* O157:H7, it was found that the mutation reduces cell adhesion, motility, and survival of *E. coli* O157:H7 in macrophages. Moreover, concerning to acid stress, the Δfur strain showed greater resistance to it in relation to the wild strain. As a result of the facts described, in this work it was demonstrated for the first time that *fur* plays a role in the pathophysiology of *E. coli* O157:H7.

1. Introducción

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia de las Enterobacterias que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Estas cepas pueden ser comensales, existiendo en un estado simbiótico brindando resistencia contra organismos patógenos, o ser patógenas y causar enfermedades intestinales y extraintestinales. Las cepas patógenas de *E. coli* pueden portar varios factores de virulencia involucrados en la patogenia de estas bacterias (Katouli *et al*, 2010). De acuerdo con el esquema de Kauffman modificado, *E. coli* se serotifica sobre la base de sus perfiles de antígeno de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Una combinación específica de antígenos O y H define el "serotipo" de un aislado (Kaper *et al*, 1998).

E. coli patógena puede clasificarse en dos grupos principales basados en su sitio de colonización (**Figura 1**): (i) extraintestinales, las cuales son capaces de causar desde infecciones del tracto urinario, como *E. coli* uropatógena (UPEC), hasta el sistema nervioso central siendo como agente infeccioso *E. coli* asociado a meningitis neonatal (MNEC); e (ii) intestinales, que son responsables de diferentes cuadros de diarrea, como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Croxen M. A. *et al*, 2010).

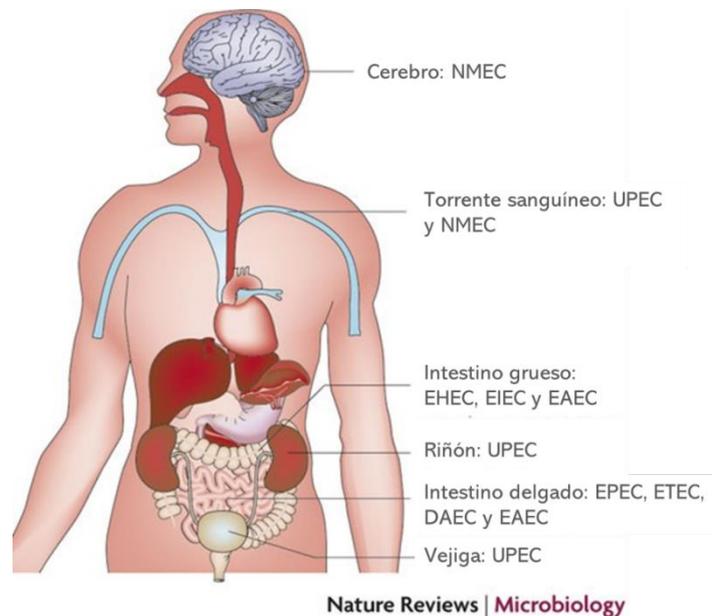


Figura 1: Sitios de colonización de *E. coli* patogénica (Croxen M. A., 2010)

1.2. *E. coli* O157:H7

E. coli enterohemorrágica (EHEC) es un patógeno zoonótico que pertenece al grupo de *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) capaz de causar diarrea severa y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. El serotipo O157:H7 es responsable de los cuadros más severos de la infección generada por este patógeno, siendo el agente etiológico de la colitis hemorrágica y el SUH. *E. coli* O157:H7 posee un genoma con aproximadamente 5,4 MB lo que muestra una gran cantidad de genes que contribuyen para su proceso patofisiológico. El proceso patogénico de *E. coli* O157:H7 es multifactorial y requieren la expresión coordinada de una red regulatoria de genes que son regulados en respuesta a diferentes estímulos ambientales encontrados por este enteropatógeno a lo largo de la infección (Lim *et al*, 2010).

1.2.1. Reservorio y transmisión

E. coli O157:H7 ha sido reportada en un gran número de especies animales de sangre caliente, principalmente rumiantes tales como vacas, ovejas, cabras y ciervos, entre otros, siendo portadores asintomáticos de la misma (Persad *et al*, 2014). Sin embargo, el ganado bovino es el principal reservorio por la colonización preferencial del epitelio mucoso hasta 5

cm proximal a la unión recto-anal del bovino (Naylor *et al*, 2003). La transmisión en humanos es por vía fecal-oral de manera directa por el consumo de alimentos de origen bovino, como carnes y lácteos; o de manera indirecta por el consumo de aguas y cultivos vegetales contaminados con materia fecal de bovinos infectados (Ferens *et al*, 2011) (**Figura 2**). Una vez que el humano consume un alimento infectado por la bacteria, la misma recorre el tracto digestivo hasta llegar a su sitio de colonización, la mucosa intestinal, en donde actúa como patógeno extracelular adheriéndose a las células epiteliales del intestino grueso. Cabe destacar que dosis tan bajas como 10-100 células de *E. coli* O157:H7 son suficientes para provocar enfermedad en humanos, por lo que el control de los alimentos previo a su comercialización debe ser exhaustivo (Tuttle *et al*, 1999).

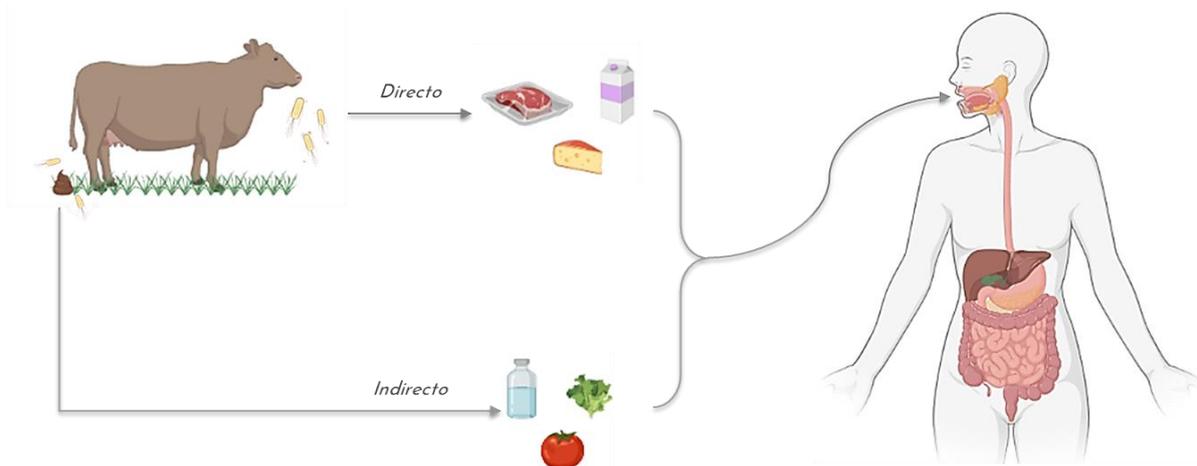


Figura 2: Vías de transmisión de EHEC al humano.

1.2.2. Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y datos epidemiológicos

El SUH es una patología caracterizada por la presentación de una seguidilla de síntomas que incluyen diarrea sanguinolenta, trombocitopenia (baja cantidad de plaquetas), anemia hemolítica microangiopática (anemia causada por daño a los glóbulos rojos) y disminución de la función renal, en ciertos casos con una disminución de la diuresis (oliguria) o incapacidad total para producir orina (anuria). La tasa de letalidad es alrededor del 3%; el 20-30% sufren formas persistentes de nefropatías o formas secuelas de insuficiencia renal y el 10 a 15% requieren trasplante renal (Rivero *et al*, 2004).

El SUH es considerado un problema de salud pública en varios países y en particular, la Argentina es el país de mayor incidencia de SUH en el mundo (Rivas *et al*, 2008). En nuestro país esta enfermedad es la segunda causa de insuficiencia renal en niños menores a cinco años. Datos epidemiológicos del año 2020 han demostrado que 77% de los casos reportados en la Argentina se concentraron en niños menores a 5 años con una incidencia acumulada 6,33 cada 100.000 niños. En el periodo 2016-2020 de 400 cepas STEC aisladas, el 58,75% corresponden al serotipo O157:H7, lo que muestra la presencia de cepas pertenecientes a este serotipo altamente virulento circulando en nuestro país (Tabla 1) (Ministerio de salud *et al*, 2021).

Tabla 1: Casos, tasas y diagnóstico de laboratorio para STEC. Argentina. Período 2016-2020. (Ministerio de salud, 2021)

| Año | Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud | | | | | | Laboratorio de Referencia Nacional | | | | | | |
|----------------|--|--------------|-------------|----------------------|--------------|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|
| | Casos SUH | | | Tasas x 100.000 hab. | | | Casos estudiados | Casos asociados a infección por STEC | Casos según criterio diagnóstico | | | | N° cepas STEC aisladas |
| | < 5 años | 5 o más años | Total | < 5 años | 5 o más años | Total | | | Solo Stx en MF | Solo Antic. O157 /O145 /O121 | Solo PCR+ sin aislamiento | Aislamientos STEC+ | |
| 2016 | 293 | 72 | 365 | 7,80 | 0,18 | 0,84 | 294 | 185 (62,9%) | 2 | 119 | 2 | 62 | 62 |
| 2017 | 305 | 96 | 401 | 8,14 | 0,23 | 0,91 | 325 | 231 (71,08%) | 7 | 146 | 2 | 76 | 77 |
| 2018 | 266 | 84 | 350 | 7,12 | 0,20 | 0,79 | 312 | 224 (71,79%) | 5 | 128 | - | 91 | 92 |
| 2019 | 272 | 71 | 343 | 7,30 | 0,17 | 0,76 | 325 | 228 (70,15%) | 9 | 117 | 3 | 99 | 102 |
| 2020 | 235 | 70 | 305 | 6,33 | 0,16 | 0,67 | 267 | 194 (72,6%) | 2 | 122 | 4 | 66 | 67 |
| Totales | 1371 | 393 | 1764 | 36.69 | 0,94 | 3,97 | 1523 | 1062 (69,73%) | 25 | 632 | 11 | 394 | 400 |

1.2.3. Diferencias genómicas entre *E. coli* comensal y *E. coli* O157:H7

El genoma de *E. coli* O157:H7 fue secuenciado y comparado contra la cepa de *E. coli* comensal K-12 en donde se observó que su genoma tiene un total de 5,5 Mb siendo este 859 Kb más largo que K-12 y codifica para 5361 proteínas, 7 sets de rRNAs (16S, 23S y 5S RNAs), 102 tRNAs, 1 tmRNA y alrededor de 13 *small* RNAs. Del total de su genoma, 4,1 Mb se encuentran altamente conservadas conformando probablemente el *backbone* de *E. coli*, es decir las regiones que codifican para sus funciones fisiológicas básicas (Hayashi *et al*, 2001). Diversos análisis comparativos han revelado que en las 1,4 Mb que *E. coli* O157:H7 no comparte con K-12, se encuentran en 1.387 regiones de codificación (CDS) (26% del total de genes) distribuidos en 177 islas genómicas (islas-o) las cuales, junto al plásmido pO157,

participan en la patogenicidad de la bacteria proveyendo numerosos factores de virulencias. Entre estos 1.387 genes específicos de O157:H7, 69 genes (4,97 %) están asociados con la virulencia de *E. coli* O157:H7, de los cuales 31 genes (2,24 %) codifican factores de virulencia, 26 genes (1,87 %) codifican efectores y 12 genes (0,87 %) codifican proteínas reguladoras; 47 genes (3,39%) están asociados a otros procesos biológicos; la función de los 1.271 genes restantes (91,64 %) por el momento se desconoce (Jiang *et al*, 2021) (**Figura 3**). Interesantemente, aunque se han realizado varios estudios, todavía hay un grado de desconocimiento de la totalidad de los factores de virulencia ubicados en estas islas-O que contribuyen a la infección por *E. coli* O157:H7 y como los mismo son regulados.

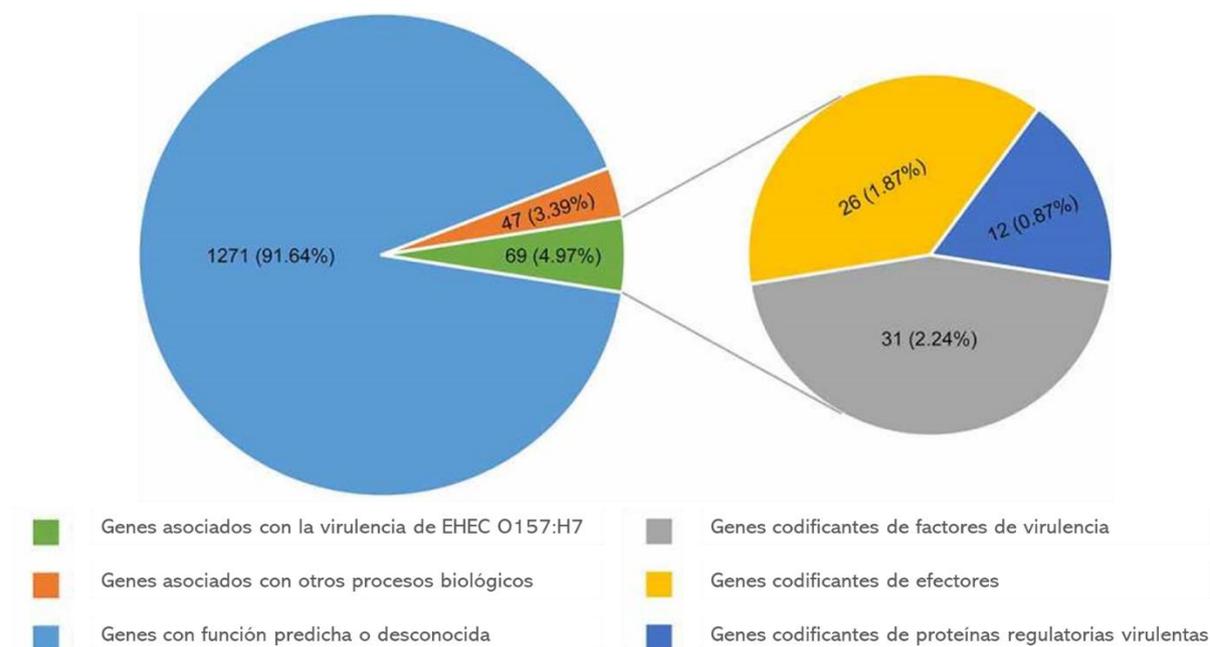


Figura 3: Clasificación funcional de los genes codificados en las islas-o. Cada porción representa la clasificación funcional de grupos de genes representados en porcentaje (Jiang *et al*, 2021).

1.2.4. Factores de virulencia de *E. coli* O157:H7

1.2.4.1. Toxinas Shiga

La toxina Shiga (Stx), también conocida como Verotoxina (VT), representa el atributo de virulencia más importante en STEC y EHEC, y es el factor que define al patotipo STEC. La

información genética para la producción de estas toxinas está contenida en el genoma de un fago lambda integrado al cromosoma de STEC, que replica junto con él en su estado lisogénico (Chan *et al*, 2016). Bajo ciertas condiciones de estrés celular que provocan la activación de la respuesta SOS, el fago es inducido hacia su ciclo lítico lo que desencadena la producción de las toxinas y la liberación de nuevos fagos a través de la lisis celular (Bergan *et al*, 2012).

Stx pertenece a la familia de proteínas AB₅ las cuales contienen la subunidad enzimática activa A y una subunidad no toxica B responsable de la unión a los receptores. La porción B se encuentra conformada por cinco subunidades idénticas de 7,7 kDa las cuales conforman un anillo pentamérico que rodea el poro central en donde se encuentra anclado el extremo C-terminal de la porción A. Cada una de las subunidades B reconoce tres sitios de unión del receptor globotriaosilceramidas (Gb3s) que se encuentran en las células de Paneth de la mucosa intestinal humana y en la superficie de las células epiteliales renales. Para que la porción A (31,2 kDa) tome su conformación activa y ejerza toxicidad, esta debe ser clivada por una furina en la subunidad enzimáticamente activa A1 (27,5 kDa) y la subunidad A2 (4,5 kDa). Luego el fragmento A1 es translocado al citosol de la célula diana ejerciendo su actividad citotóxica inhibiendo la síntesis proteica e induciendo apoptosis (Bergan *et al*, 2012).

1.2.4.2. Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

El LEE es una gran isla de patogenicidad de 35 Kb que contiene 41 marcos de lectura abierta (ORF), organizada en 5 grandes operones: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, LEE5 y un operón bicistrónico de dos pequeños reguladores *grlA-grlR* (**Figura 4**). En ellos está codificada la información para un Sistema de Secreción de Tipo III (SST3) y algunas de las moléculas efectoras que son traslocadas hacia el interior de las células epiteliales por este sistema (Slater *et al*, 2018).

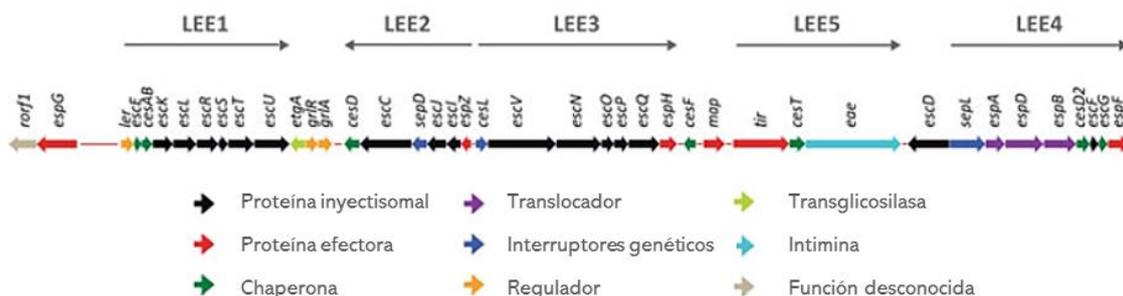


Figura 4: Organización estructural del locus de borramiento de enterocitos (LEE) (Slater *et al*, 2018).

Las proteínas estructurales del SST3 reciben sus nombres según la sigla en inglés “*E. coli Secreted Protein*”. Así tenemos a EspA, EspD y EspB que forman parte del aparato de secreción. Con respecto a los efectores traslocados por este sistema podemos destacar la adhesina Intimina y su receptor Tir (*Translocated Intimin Receptor*) responsables de la característica lesión histológica de EHEC conocida como “*attaching and effacing*” (A/E) (Tobe *et al*, 2006). Otra función de las moléculas efectoras traslocadas por el SST3 es subvertir la acción del sistema inmune del hospedador. No todos los genes que codifican para las moléculas efectoras traslocadas por el SST3 están ubicados en LEE, muchos de estos genes se encuentran a dentro de profagos o islas genómicas. Estos efectores que no están ubicados en LEE, son nombrados *non-LEE effector* (Slater *et al*, 2018).

1.2.4.3. Plásmido pO157

E. coli O157:H7 contiene un plásmido muy conservado, denominado pO157. El pO157 es un plásmido tipo F no conjugativo con un rango de tamaño de 92 a 104 kb. La secuencia completa de pO157 revela 100 marcos de lectura abiertos (ORF). Entre ellos, 43 ORF mostraron suficientes similitudes con proteínas de función conocida, y 22 ORF no poseen similitud con ninguna proteína conocida (Lim *et al*, 2010). Presuntamente, 35 proteínas están involucradas en la patogenia de las infecciones por *E. coli* O157:H7, pero de las cuales solo 19 genes se han caracterizado previamente, entre ellos:

- Operón *etp*: este codifica para 13 genes que participan en la formación del Sistema de Secreción de Tipo II (SST2) (Schmidt *et al*, 1997). Este es un complejo multiprotéico

utilizado por muchas bacterias para mover sustratos a través de su membrana celular. Los sustratos liberados en el medio ambiente sirven como efectores locales y de largo alcance que promueven la adquisición de nutrientes, la formación de biopelículas y patogenicidad (Naskar *et al*, 2020). Además, este sistema permite la secreción de la hemolisina Ehx.

- Ehx: esta es una proteína perteneciente al grupo de las hemolisinas, es decir que induce la lisis de eritrocitos (Schmidt *et al*, 1994).
- KatP: es una enzima catalasa-peroxidasa la cual se cree que podría participar en la colonización de los intestinos del huésped mediante la reducción del estrés oxidativo y el uso del subproducto de oxígeno en condiciones de disminución o falta de oxígeno en el intestino del huésped (Brunner *et al*, 1996) (Lim *et al*, 2010).
- EspP: es una serina proteasa capaz de escindir la pepsina A y el factor de coagulación humano V contribuyendo así a las hemorragias de la mucosa observada en pacientes con colitis hemorrágica (Brunner *et al*, 1997).
- ToxB: una posible adhesina la cual contribuye a la adherencia de EHEC a las células epiteliales a través de la promoción de la producción y/o secreción de proteínas del SST3 (Tatsuno *et al*, 2001).
- StcE (Secreted Protease of C1): es una metaloproteasa secretada por el SST2 encargada de clivar a la esterasa C1 (proteína encargada de inhibir C1 para evitar la activación espontánea del sistema de complemento del huésped) y producir la agregación de células T. De esta manera activa respuestas proinflamatorias y de coagulación resultando en daño de tejido, edema intestinal y anomalías trombóticas (Lethem *et al*, 2002).
- Operón *ecf*: el mismo codifica para cuatro genes, *ecf1*, *ecf2*, *ecf3* y *ecf4*. Los genes *ecf1* y *ecf2* codifican un supuesto polisacárido desacetilasa y una LPS α -1, 7-N-acetilglucosamina transferasa, respectivamente, exclusivas de pO157. En cuanto a *ecf3*, presenta similitud con la proteína de membrana yijP presente en la cepa comensal K-12 asociada a la invasión bacteriana. *ecf4* codifica para una miristoil transferasa lipídica A (Lim *et al*, 2010).

Sin embargo, la red reguladora de los genes ubicados en el pO157 y su importancia biológica en la patogénesis no se comprende completamente.

1.2.4.4. Adhesinas

Las adhesinas son un grupo de proteínas que intervienen en la unión y/o colonización de EHEC en superficies abióticas y biológicas, por lo que juegan un papel importante en la virulencia, siendo así dianas para la intervención terapéutica. Estas adhesinas de *E. coli* O157:H7 contribuyen en diversos grados a su interacción con las células epiteliales del intestino grueso (McWilliams, 2014), entre ellas:

- Intimina: esta proteína ubicada en la isla de patogenicidad LEE es esencial para la adhesión íntima y para la formación de lesiones A/E, y la alteración del gen, codificante de intimina, *eae* suprime este fenotipo (Dean-Nystrom *et al*, 1998).
- Fimbrias polares largas (Lpf1 y Lpf2): las mismas interactúan con proteínas de la membrana extracelular como la laminina, colágeno IV y fibronectina siendo los primeros genes identificados fuera de LEE que influyen en el tropismo tisular (Fitzhenry *et al*, 2006).
- EspFu: forma parte del grupo de proteínas de secreción de *E. coli* (Esp). Participa en la vía de señalización de formación de pedestales río abajo del efector Tir reclutando y activando a la proteína del síndrome de *Wiskott-Aldrich* neural (N-WASP) del huésped impulsando así el ensamblaje de actina (Weiss *et al*, 2009).
- *E. coli* Common Pilus (ECP) y Hemorrhagic *E. coli* Pilus (HCP): son factores de virulencia que median la agregación interbacteriana, la formación de biopelículas, hemaglutinación de eritrocitos, motilidad espasmódica y el reconocimiento específico de los receptores de la célula huésped formando puentes físicos entre las mismas, teniendo así un papel en la colonización del huésped (Rendón *et al*, 2007 & Ledesma, 2010).
- Curli: participa en la mediación de la interacción entre EHEC y proteínas de la matriz extracelular y el complejo de histocompatibilidad de tipo I del huésped. Por otra parte, también es el encargado de mediar la interacción bacteriana con superficies abióticas y

la protección del patógeno de productos químicos antisépticos, lo que posiblemente le dé a EHEC la oportunidad de colonizar y sobrevivir en otras superficies hasta que se disponga de condiciones ambientales más favorables (McWilliams, 2014).

1.2.5. Etapas de la patogenecis

La patogenicidad de la infección por EHEC consta de tres etapas: (1) adherencia inicial y colonización del intestino; (2) translocación de señales celulares y transducción de señales; (3) adherencia íntima de bacterias a células eucariotas por proteínas específica y producción de toxinas Shiga.

1.2.5.1. Adherencia Inicial

La adherencia inicial a las células huésped es el primer paso de la infección de EHEC. La importancia de este paso en la infección reside en que (1) la adherencia es el primer contacto entre las bacterias y las células intestinales sin el cual los otros pasos no pueden ocurrir, y (2) la adherencia es la base de la especificidad del huésped para muchos patógenos (Bardiau *et al*, 2010). En esta etapa EHEC coloniza, mediante las adhesinas descritas anteriormente en la sección 1.2.4.4, los folículos asociados al epitelio en las placas de Peyer en la superficie de la mucosa intestinal (Phillips *et al*, 2000).

1.2.5.2. Translocación de señales y transducción de señales

El SST3 no es expresado constitutivamente, sino que la bacteria censa diversos factores ambientales y dependiendo de la presencia, o no, de diversos factores va a expresar los genes presentes en la isla de patogenicidad LEE para montar el sistema. Las señales ambientales que censa EHEC son una combinación de temperatura, pH, osmolaridad, calcio, hierro y concentración salina (Kenny *et al*, 1997 & Connolly, 2015). Una vez activado LEE, la bacteria comienza a montar el SST3 para inyectar proteínas efectoras dentro del citosol de la célula huésped. Aunque aún no se comprende completamente, la construcción de SST3 se puede clasificar en cuatro etapas: (1) ensamblaje del cuerpo basal y el aparato de exportación, (2) ensamblaje de la varilla interna y la aguja, (3) ensamblaje del filamento y el translocón, y (4) secreción de efectores (Slater *et al*, 2018).

El filamento EspA es una extensión de la estructura de aguja EscF el cual se autopolimeriza, una vez translocado por el SST3, participando en la adhesión bacteriana y perforando la membrana de la célula huésped junto a EspB y EspD formando el poro de translocación (Gaytán *et al*, 2016).

1.2.5.3. Adherencia íntima y producción de toxina Shiga

El objetivo final del ensamblaje de SST3 es translocar proteínas efectoras para modular las funciones de la célula huésped en beneficio de la bacteria, y esto se logra mediante la alteración de las actividades bioquímicas por los efectores inyectados. Tir es uno de los principales efectores debido a que el mismo es translocado a la superficie de la célula diana como receptor de la intimina, adhesina de membrana de la bacteria, conformando así la adherencia íntima entre la bacteria y la célula huésped generando una unión estrecha entre las mismas. Otra proteína efectora, EspFu, se secreta en la célula y trabaja en cooperación con Tir para reclutar proteínas del huésped para subvertir el citoesqueleto del huésped y la polimerización de actina. EspFu recluta la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich del factor promotor de la nucleación de actina (N-WASP) y el sustrato p53 de la tirosina quinasa del receptor de insulina (IRSp53), un regulador importante para la reorganización del citoesqueleto de actina. Esto da como resultado la acumulación de actina debajo de las bacterias adheridas, formando la característica estructura similar a un pedestal (lesión A/E) llevando a la disrupción de la unión estrecha entre células (*tight junctions*) y, eventualmente la separación de la célula de la matriz (**Figura 5**) (Nguyen *et al*, 2012).

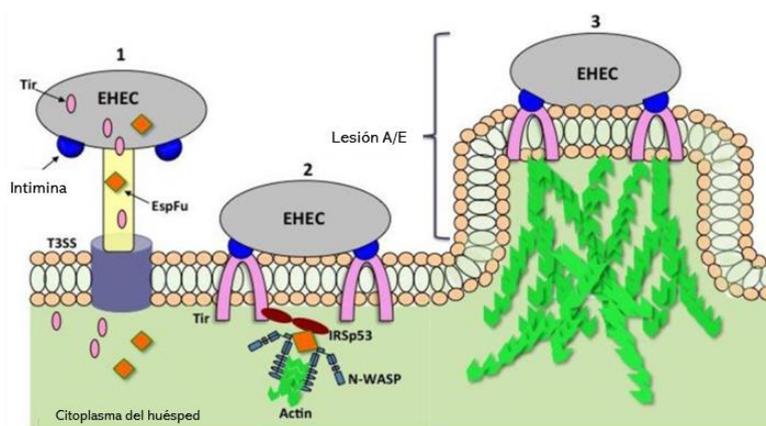


Figura 5: Diagrama esquemático de la formación de lesiones A/E. (1) secreción de Tir y EspFu en el citoplasma de la célula huésped; (2) reclutamiento de factores del huésped a través de los efectores Tir y EspFu; y (3) subversión de la estructura del citoesqueleto y polimerización de la actina.(Nguyen, 2012)

A su vez, los profagos que se encuentran integrados en el genoma van a ser activados por inducción ligada a respuesta SOS por daño al DNA generado principalmente por especies de oxígeno o nitrógeno reactivos producidos por el sistema inmune del huésped. Entre los diferentes fagos que serán activados está el fago codificante de Stx. Los receptores Stx son las globotriaosilceramidas (Gb3s) que se encuentran en las células de Paneth de la mucosa intestinal humana y en la superficie de las células epiteliales renales. La subunidad Stx B interactúa con Gb3 e induce invaginaciones de membrana para facilitar la internalización de la toxina. Stx internalizada se transporta a través de los primeros endosomas hacia el aparato de Golgi, donde la subunidad A (una N-glucosidasa que impide la síntesis de proteínas) se activa por un evento de escisión, lo que lleva a la necrosis y muerte celular (Croxen M. A. *et al*, 2010).

1.3. La importancia del hierro en sistemas biológicos

El hierro es un nutriente indispensable de la mayoría de los diferentes organismos. Este metal participa en muchas funciones celulares y rutas metabólicas clave, como la síntesis de aminoácidos, el ciclo del ácido tricarbóxico, el transporte de electrones, la replicación del ADN y la respiración celular (Sheldon *et al*, 2016). A su vez, diferentes estudios han demostrado que el hierro es requerido para el crecimiento bacteriano y su biodisponibilidad juega un rol importante en la patogénesis de diferentes patógenos (Runyen-Janecky *et al*, 2013).

1.3.1. Estrés nutricional generado por la biodisponibilidad de hierro

Entre los metales de transición más relevantes biológicamente (hierro, zinc, cobre, magnesio, cobalto, níquel), la bacteria confronta varios obstáculos en el proceso de adquisición del hierro durante el proceso de infección. En un entorno aeróbico el hierro suele estar en mayor cantidad como hierro férrico [Fe (III)], siendo poco soluble en soluciones acuosas y haciendo que no sea apto para la adquisición bacteriana. En cambio, en entornos anaeróbicos y más ácidos se encuentra como hierro ferroso [Fe (II)], el cual es más soluble y de fácil adquisición para los microorganismos (Grass *et al.*, 2006).

El hierro no es un nutriente requerido solo para la microbiota y las bacterias patogénicas, sino que también es un nutriente requerido por el huésped por lo que la retención de hierro por parte del huésped es una eficiente estrategia de defensa denominada inmunidad nutricional. La inmunidad nutricional es una estrategia utilizada por el huésped frente una infección de diferentes patógenos. Su principal objetivo es limitar la biodisponibilidad del hierro en el medio, el sistema inmune del humano secreta diversos compuestos, entre ellos: la ferritina, la cual forma compartimientos de almacenamiento de hierro para que el mismo no se encuentre accesible para agentes infecciosos; la lactoferrina, factor retenedor de hierro producido por neutrófilos; y la lipocalin-2, péptido antimicrobiano con funciones pleiotrópicas producida por neutrófilos, macrófagos y células epiteliales la cual neutraliza los sideróforos secretados por las bacterias (Nairz & Günter, 2020).

A raíz de la inmunidad nutricional generada por el huésped y los requerimientos nutricionales de los microorganismos, se va a generar una competencia por el hierro en el sitio de colonización del patógeno bacteriano. Esta competencia va a generar una limitación de la biodisponibilidad de hierro para el patógeno generando así una condición de estrés nutricional en donde diversas vías se van a ver afectadas, entre ellas, las vías involucradas con el crecimiento bacteriano y las rutas metabólicas mencionadas previamente. Por otro lado, también se van a ver afectadas diversas vías que participan en la regulación de factores de virulencia y patogenicidad de la bacteria.

1.3.2. Homeostasis y sistemas de adquisición de hierro en bacterias

Existen esencialmente cinco estrategias utilizadas por las bacterias en la homeostasis del hierro: (1) transporte de hierro de alta afinidad que permite extraer hierro del entorno; (2) depósito de reservas de hierro intracelular para proporcionar una fuente de hierro a la que se puede recurrir cuando los suministros externos son limitados; (3) empleo de sistemas de resistencia al estrés redox (por ejemplo, degradación de especies reactivas de oxígeno inducidas por hierro y reparación del daño inducido por estrés redox); (4) control del consumo de hierro mediante la regulación a la baja de la expresión de proteínas que contienen hierro en condiciones de restricción de hierro; y (5) un sistema regulador general sensible al hierro que coordina la expresión de la maquinaria homeostática del hierro anterior de acuerdo con la disponibilidad de hierro. A pesar de esta diversidad de estrategias, la manera en la que estas son implementadas varía considerablemente según las condiciones ambientales (Andrews *et al*, 2003).

En condiciones de estrés nutricional *E. coli* accede al hierro del medio a través de receptores específicos ubicados en de membrana celular o mediante la secreción de sideróforos y hemoforos. En el primero el hierro ferroso se difunde libremente a través de las porinas de la membrana externa, de modo que puede ingresar al periplasma desde donde puede transportarse al citoplasma a través de los siguientes sistemas: MntH, ZupT, YfeABCD, FutABC, EfeUOB y Feo (**Figura 6A**) (Lau *et al*, 2016). El segundo, se basa en moléculas como los sideróforos y hemoforos, que son sintetizadas y liberadas por las bacterias al medio extracelular para adquirir el hierro de diversas fuentes (**Figura 6B**). Los sideróforos y hemoforos son compuestos quelantes de bajo peso molecular que permiten la solubilización del hierro y, por lo tanto, la adquisición por parte de la bacteria. Mientras que los sideróforos son los encargados de quelar el hierro férrico del medio reduciéndolo a hierro ferroso para que se encuentre disponible para la bacteria, los hemoforos capturan los grupos hemo de la hemoglobina en los glóbulos rojos para acceder al hierro que estos portan (Wandersman & Delepelaire, 2004).

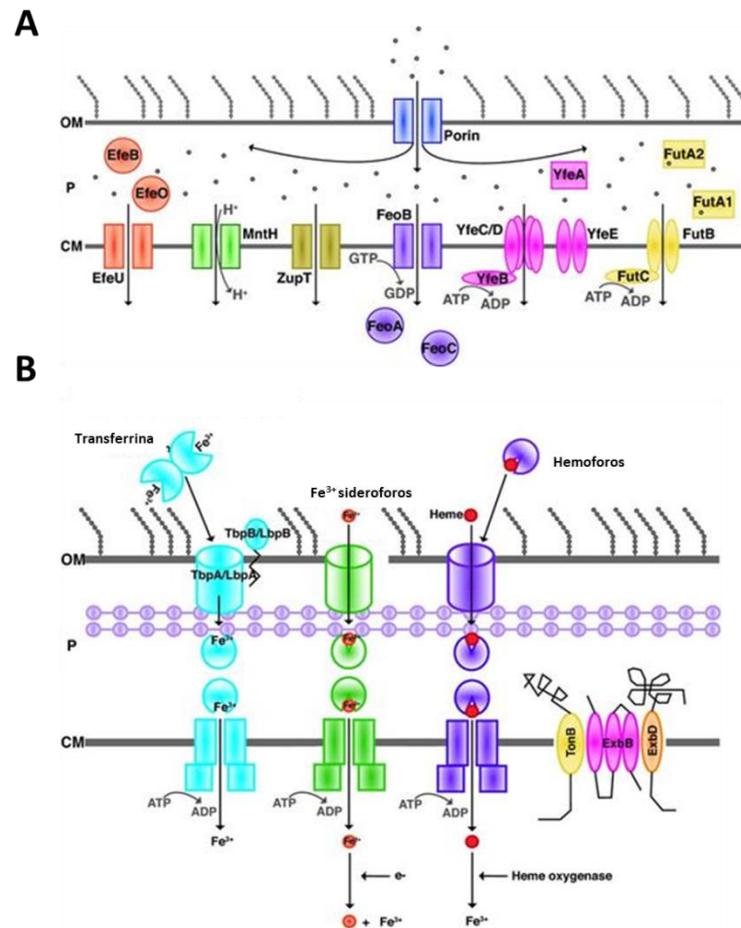


Figura 6: Sistemas bacterianos de adquisición de hierro. (A) Sistemas bacterianos de transporte de hierro ferroso identificados en varias bacterias Gram-negativas. Los rectángulos y los óvalos representan permeasas o canales como transportadores y transportadores ABC, respectivamente. Los círculos representan las proteínas de unión periplásmica. (B) Sistemas bacterianos de transporte de hierro férrico identificados en bacterias Gram-negativas. Los cilindros representan los receptores de la membrana externa. Los rectángulos y los cuadrados representan permeasas y proteínas de unión a ATP, respectivamente. Las formas de 'Pac-man' representan proteínas de unión periplásmica (Lau *et al*, 2016).

1.3.3. *Ferric uptake regulator (fur)* y *mRNA*

En *E. coli*, la adquisición y el almacenamiento de hierro están controlados por la proteína reguladora global de absorción férrica (Fur) y el pequeño ARN regulador no codificante (ARNs) RyhB (Porcheron *et al*, 2015). Fur es un metalorregulador homodimérico de 16,8 kDa, producto del gen *fur* (*ferric uptake regulator*), que porta un dominio de unión al

ADN de hélice-vuelta-hélice N-terminal y un sitio de unión al correpresor de metal C-terminal que también funciona en la dimerización de la proteína. El Fe^{2+} induce un cambio conformacional que hace que el represor cargado de hierro sea competente para la unión al ADN en una secuencia consenso, denominada “fur-box”, ubicada dentro de la región promotora/operadora del gen diana impidiendo que la ARN polimerasa se una al promotor, lo que inhibe la transcripción en condiciones repletas de hierro (Sheldon *et al*, 2016). Cuando a biodisponibilidad de hierro es limitada, Fur se vuelve inactivo y, posteriormente, se inicia la producción de RyhB y los sistemas de adquisición de hierro para restaurar la homeostasis del hierro (**Figura 7**). Igualmente, diversos experimentos de ADNasa I footprinting han demostrado que Fur también se une al ADN en presencia de Mn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} (Lorenzo *et al*, 1987).

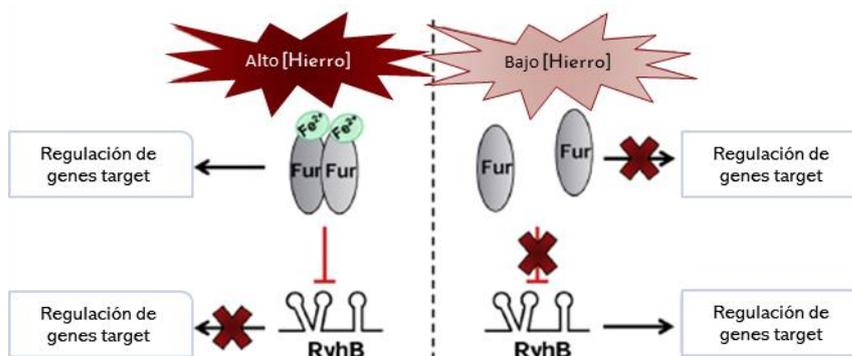


Figura 7: Representación esquemática de la regulación Fur y RyhB. En entornos ricos en hierro, la proteína Fur activa reprime muchos genes además de *ryhB*, lo que da como resultado la desregulación de genes diana específicos de RyhB. En condiciones pobres en hierro, se alivia la represión de Fur y se expresa *ryhB*, lo que conduce a la regulación (activación o represión) de genes diana específicos de RyhB. (Porcheron, 2015)

La regulación mediada por RyhB se inicia mediante el emparejamiento antisentido del sRNA con sus objetivos de mRNA para afectar positiva o negativamente su traducción y estabilidad. Si bien el papel de estos reguladores en la homeostasis del hierro está bien documentado tanto en bacterias patógenas como no patógenas, muchos estudios recientes también demuestran que estos reguladores están involucrados en la virulencia de las bacterias patógenas.

1.3.4. El regulón Fur

El conjunto de genes que son regulados por la proteína Fur constituyen el regulón Fur. Diferentes estudios han demostrado que, al detectar la disponibilidad de hierro en el medio ambiente, Fur y RyhB pueden regular, ya sea directa o indirectamente muchos genes involucrados en diferentes procesos biológicos o determinantes de la virulencia de las bacterias patógenas (Porcheron *et al*, 2015) (**Figura 8**). Este amplio espectro de genes regulados por Fur en distintos procesos muestra la importancia de este regulador transcripcional en la patofisiología bacteriana.

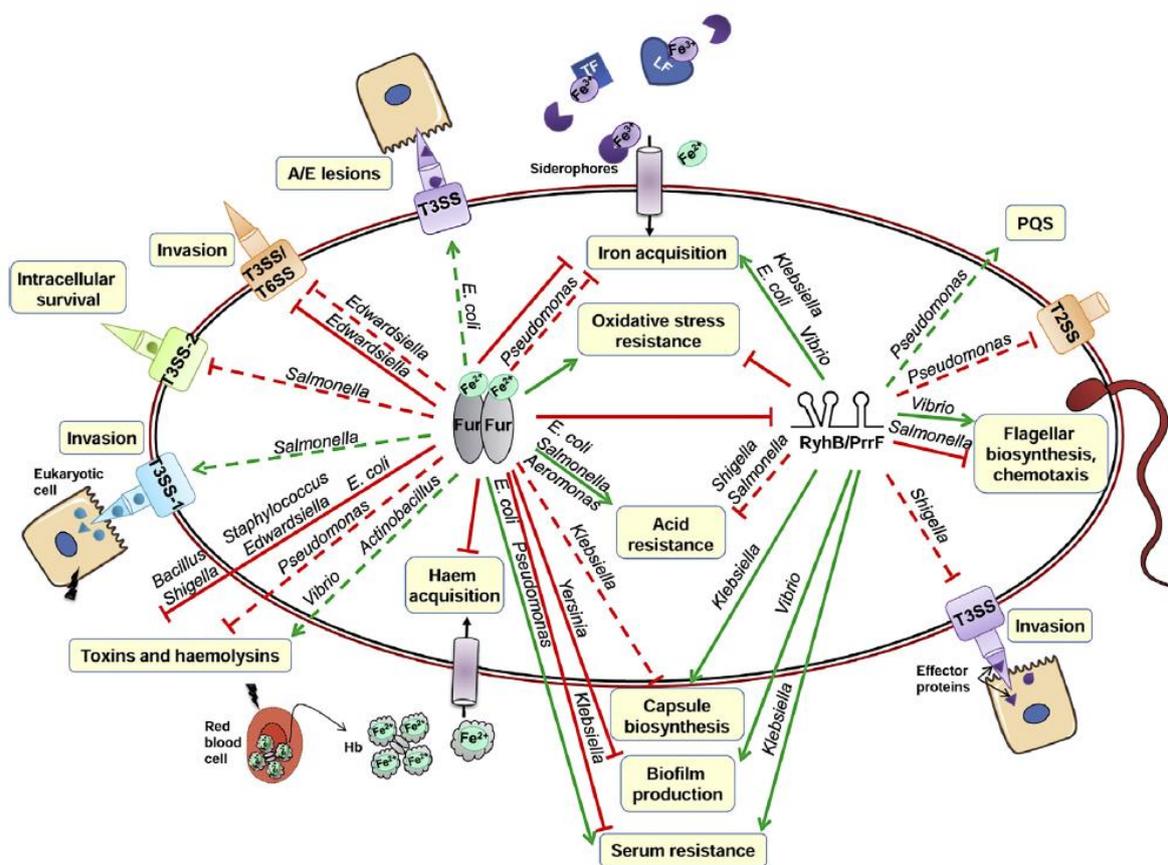


Figura 8: Determinantes de virulencia regulados por Fur y RyhB en bacterias patógenas. Fur (en ambientes ricos en hierro) y RyhB (en ambientes pobres en hierro) pueden regular directamente (líneas continuas) o indirectamente (líneas punteadas), a través de otros reguladores o la modulación de la concentración de hierro intracelular, la expresión de muchos genes involucrados en la producción de determinantes de virulencia. Los

fenotipos de virulencia pueden ser activados (líneas verdes) o reprimidos (líneas rojas) por Fur o RyhB. (Porcheronet *et al.*, 2015)

1.3.5. Fur en la virulencia y patogénesis de E. coli O157:H7

El regulón *fur* ha sido extensivamente estudiado en *E. coli* no patógena (Escolar *et al.*, 1997; Hantke, 2002; Lee *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía hay un elevado grado de desconocimiento de cómo *fur* regula de forma directa o indirecta los diferentes genes involucrados en la patofisiología de *E. coli* O157:H7. Hasta el momento, se conoce que Fur cumple un rol en la regulación tanto positiva como negativa de manera directa o indirecta de los siguientes genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de este patógeno:

- Fimbria Lpf2: Fur interactúa directamente con la región fur-box presente en el promotor del gen *lpfA2* y donde actúa como regulador negativo para la fimbria Lpf2 reprimiendo su expresión (Arenas-Hernández *et al.*, 2014).
- Adhesina IrgA: Al igual que *lpfA2*, *iha* es regulado negativamente de forma directa mediante la interacción de Fur con su región promotora (Rashid *et al.*, 2006).
- Isla de patogenicidad LEE: la misma se encuentra regulada por la concentración de hierro intracelular, por lo que Fur es un regulador positivo indirecto. Ante una condición con alta concentración de hierro intracelular se reprimen las vías de adquisición del hierro haciendo que la concentración intracelular de este disminuya. Como resultado se activa la expresión de *ler*, factor transcripcional de LEE, activando así la expresión de LEE (Tobe *et al.*, 2014).
- Ureasas: Fur interactúa directamente en las regiones promotoras de *ureD* y *ureA* las cuales, a diferencia de *lpfA2* e *iha*, regula positivamente promoviendo su expresión (Heimer *et al.*, 2002).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

La principal diferencia genómica entre *E. coli* O157:H7 y *E. coli* comensal K-12 radica en las islas de patogenicidad y el plásmido pO157 que se encuentran presentes en O157:H7 y no en K-12. Dentro de las islas-o y el plásmido pO157 se encuentran codificados los factores de virulencia y patogenicidad de la bacteria, pero los mecanismos de su regulación aún no se encuentran ampliamente caracterizados. Por otro lado, el regulador transcripcional dependiente de hierro *fur*, además de regular los sistemas de adquisición de hierro, también se encuentra asociado a la regulación de genes involucrados en diferentes procesos biológicos, y en el caso de patógenos, a la regulación de algunos factores de virulencia. Si bien se ha evaluado exhaustivamente su rol en la fisiología de *E. coli* K-12, todavía hay poco conocimiento del regulón *fur* en O157:H7. A raíz de estos hechos, en el presente trabajo se propone caracterizar el regulón *fur* de *E. coli* O157:H7 y evaluar como este regulador y la disponibilidad de hierro impacta en la patofisiología de este patógeno.

2.2. Objetivos específicos

Para tal objetivo descripto anteriormente, los siguientes objetivos específicos fueron determinados:

OB1 – Predecir *in silico* el regulón Fur de *E. coli* O157:H7.

OB2 – Generar una cepa de *E. coli* O157:H7 mutante para el gen *fur*.

OB3 – Realizar análisis proteómicos comparativos en la cepa *E. coli* O157:H7 bajo diferentes biodisponibilidades de hierro.

OB4 – Comparar el proteoma de las cepas de *E. coli* O157:H7 tipo salvaje y mutante Δfur .

OB5 – Evaluar cómo la mutación del gen *fur* impacta en procesos que contribuyen con la patogénesis de *E. coli* O157:H7.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de *E. coli* O157:H7 fueron cultivadas y manipuladas en un laboratorio de Bioseguridad Nivel PII. Las cepas de *E. coli* no patógenas y patogénicas fueron cultivadas rutinariamente en medio líquido Luria-Bertani (LB, Laboratorios Difco, EEUU) debido a su alto contenido de hierro (~7,6µM). Para algunos ensayos funcionales (adhesión celular e infección en macrófagos) las cepas de *E. coli* O157:H7 fueron cultivadas en D-MEM (*Dulbecco Modified Eagle médium*, Thermo Fisher), medio pobre en hierro (0,25µM), o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco), medio sin hierro. Para cultivos en medio sólido los medios fueron complementados con agar bacteriológico al 1,5%. Cuando fue necesario, el medio fue complementado con 30 µg/mL del antibiótico cloranfenicol (Cm) o 100 µg/mL del antibiótico ampicilina (Amp). Todas las cepas fueron cultivadas en condiciones aeróbicas, a 37°C.

Las cepas bacterianas y vectores utilizados en este trabajo se encuentran listados en la tabla 2 y 3.

Tabla 2: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

| Cepas | Características /genotipo | Fuente |
|---|--|---------------|
| <i>E. coli</i> DH5-α | <i>supE44 Δ lacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recAendA1 gyrA96 thi-J relA1</i> | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Rafaela II ¹ | Cepa tipo salvaje | INTA/Castelar |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Rafaela II Δ <i>fur</i> | Δ <i>fur</i> , Cm ^R | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Rafaela II Δ <i>fur</i> /p <i>FurC</i> | Δ <i>fur</i> /p <i>FurC</i> , Cm ^R , Amp ^R | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Rafaela II Δ <i>fur</i> /p <i>LF</i> | Δ <i>fur</i> /p <i>LF</i> , Cm ^R , Amp ^R | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Rafaela II | Cepa R46, expresando el | INTA/Castelar |

pKD46 sistema recombinasa Lambda red helper, Amp^R

¹Cepa de *E. coli* O157:H7 perteneciente a la colección de microorganismos del Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias - INTA/Castelar

Tabla 3: Vectores utilizados en este trabajo.

| Plásmidos | Características | Fuente |
|-----------|---|---------------------------------|
| pKD3 | Lambda red templateplasmid, cat (Cm ^R), bla (Amp ^R) | Datsenko and Wanner, 2000 |
| pGEM-T | Vector de clonación: PT7, lacZ, sitio de clonado múltiple; Amp ^R | Promega, Madison, WI |
| pLF | pBBR1-MCS4; 3× FLAG tagAmp ^R | Marchesini <i>et al.</i> , 2011 |

3.2. Oligonucleótidos o cebadores

Los oligonucleótidos o cebadores utilizados en el presente trabajo se encuentran listados en la Tabla 4.

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Oligonucleótido | Secuencia (5' - 3') | Fuente |
|--|---|--------------|
| Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis en la cepa Rafaela II | | |
| Fw- <i>fur</i> -P1 | TGTCACCTTCTTCTAATGAAGTGAACCGCTTAGTAACA GGACAGATTCCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | Este trabajo |
| Rv- <i>fur</i> -P2 | CTTGCATAAAAAAGCCAACCCGCAGGTTGGCTTTT TTCGTTTCAGACTGGCCATATGAATATCCTCCTTAG | Este trabajo |
| Up- <i>Fur</i> | CCTTGCCGTTGTAAATGTAAG | Este trabajo |
| Down- <i>Fur</i> | GCAACGCAAACCGGAAATG | Este trabajo |
| Fw- <i>fur</i> | ATGACTGATAACAATACCGCC | Este trabajo |
| Rv- <i>fur</i> | TTATTTGCCTTCGTGCGCGT3 | Este trabajo |
| Oligonucleótidos utilizados para la complementación de la cepa Rafaela II Δfur | | |
| Fw- <i>Fur</i> CF | ACTAGTGTGATGCGGCGTAGACTCA | Este trabajo |

| | | |
|--|---------------------------|-----------------------------|
| Rv-FurCR | GGATCCTTATTTGCCTTCGTGCGCG | Este trabajo |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | UGB- Secuenciación/INTA |
| SP6 | ATTTAGGTGACACTATAGAA | UGB- Secuenciación/INTA |
| Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR | | |
| Fw-qstcE | GCTAAAGCGAAAGTGCTGCT | Amigo N <i>et al</i> , 2016 |
| Rv-qstcE | TACTGTCCGTTCCAGGCTTT | Amigo N <i>et al</i> , 2016 |
| Fw-qfliC | TTAGCTGCCACCCTTCATG | Este trabajo |
| Rv-qfliC | TCGTCAAGTTGCCTGCATC | Este trabajo |
| Fw-qrpoA | GCGCTCATCTTCTTCCGAAT | Amigo N <i>et al</i> , 2016 |
| Rv-qrpoA | CGCGGTCGTGGTTATGTG | Amigo N <i>et al</i> , 2016 |

3.3. Geles de agarosa y corridas electroforéticas

Todas las muestras de DNA fueron resueltas en geles de Agarosa 0,8 o 1%, los cuales contenían Bromuro de Etidio (Promega). Las resoluciones electroforéticas se realizaron en Buffer TAE (40mM de Tris, 20mM de ácido acético, 1mM de EDTA a un pH de 8,0) a 100V. El DNA fue visualizado en un transiluminador bajo luz UV y fotografiado. El tamaño de los fragmentos se estimó comparando el peso molecular del marcador de DNA 100 pb Ladder o 1 Kb Plus DNA Ladder (TransgenBiotech).

3.4. Preparación de *E. coli* O157:H7 electrocompetente

Se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de la cepa Rafaela II en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C 200 rpm. Posteriormente, se realizó un inóculo (1:100) en 50 ml de LB se cultivó a 37°C en agitación, hasta DO_{600nm} de 0,4 – 0,5. Una vez alcanzada la DO requerida se incubó el cultivo en hielo por 20 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* tres veces con 50, 25 y 12,5 ml de glicerol 10%. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 500 µl de glicerol 10%. Las cepas fueron conservadas a -80 °C.

3.5. Preparación de *E. coli* DH5 α quimicompetentes

Se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de *E. coli* DH5 α en 3 ml de medio de cultivo LB a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Posteriormente, se realizó un inóculo (1:100) en 250 ml de LB se cultivó a 37 °C en agitación, hasta DO_{600nm} de 0,4 – 0,5. Una vez alcanzada la DO requerida se incubó el cultivo en hielo por 15 minutos. Luego el cultivo fue centrifugado por 10 minutos a 4.000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 10 ml de TFBI (30 mM de Acetato de potasio, 400 mM de Cloruro de potasio, 10 mM de Cloruro de calcio, 50 mM Cloruro de manganeso) a un pH de 5,8 y se centrifugó por 10 minutos a 4.000 rpm 4 °C. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de TFBII (10 mM de MOPS, 75 mM de Cloruro de calcio, 10 mM de Cloruro de Potasio y 10% de Glicerol) a un pH de 6,5. Se realizaron alícuotas de 200 μ L en eppendorfs de 1,5 ml y se conservaron a -80 °C.

3.6. Generación de una cepa de *E. coli* O157:H7 mutante para el gen *fur*

Para realizar la escisión del gen *fur* en la cepa Rafaela II, se utilizó una estrategia de reemplazo alélico por recombinación homóloga doble utilizando el sistema lambda red (**Figura 9**) (Datsenko & Wanner, 2000). Para ello, se realizó el diseño de los oligonucleótidos (**Tabla 4**) que contenían 50 nucleótidos correspondiente a 50 pb río arriba y río abajo del gen *fur*, más 20 nucleótidos que corresponden a secuencias FRT del plásmido pKD3 para amplificar el caset de resistencia a cloranfenicol.

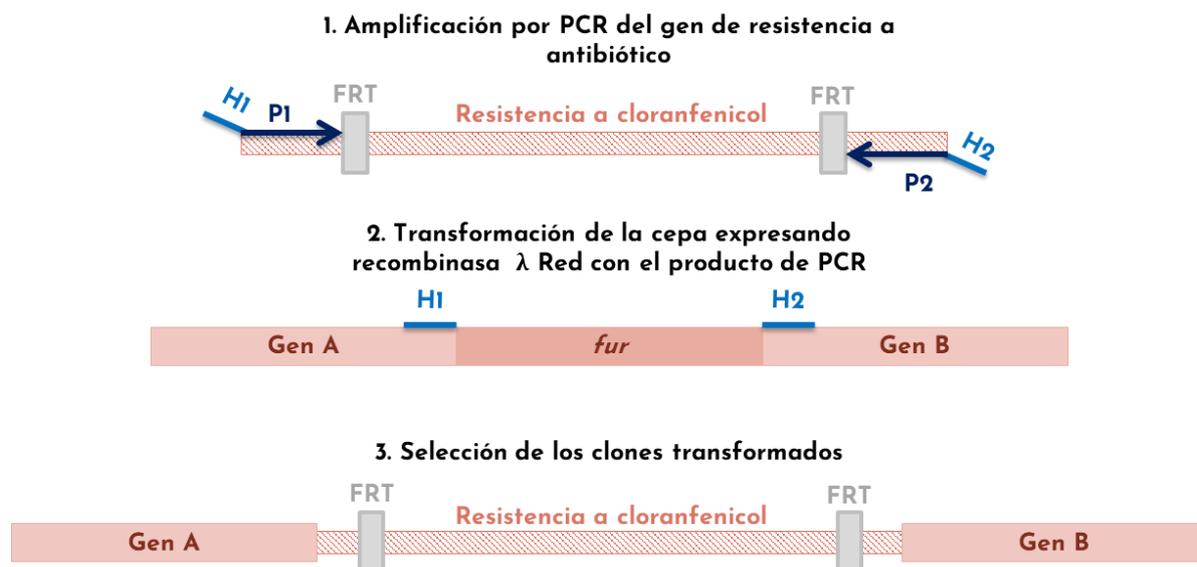


Figura 9: Estrategia de mutagénesis basada en el sistema λ red para generar una cepa *Knock-out* del gen *fur* adaptado de Datsenko & Wanner, 2000.

3.6.1. Generación del amplicón mutagénico

A partir de los oligonucleótidos generados en la sección 3.2., se realizó la amplificación del caset de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3 mediante una reacción de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Para la siguiente mezcla de reacción se utilizó: 5X GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de High PuredNTPs (TransgenBiotech), 10 μ M de cada primer (Fw-*fur*-P1 y Rv-*fur*-P2), 1 unidad de GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega), 1 μ l de templado y se llevó a un volumen final de 50 μ l con agua mili Q estéril. El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Programa de PCR para la amplificación del caset de resistencia a cloranfenicol.

| Etapa | Nº ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo |
|----------------------------------|-----------|------------------|-------------|
| <i>Desnaturalización inicial</i> | 1 | 95 | 5 minutos |
| <i>Desnaturalización</i> | 35 | 95 | 30 segundos |
| <i>Annealing</i> | | 56 | 30 segundos |

| | | | |
|------------------------|---|----|--------------------|
| <i>Extensión</i> | | 72 | 1 min, 40 segundos |
| <i>Extensión final</i> | 1 | 72 | 7 minutos |

Se verificó la presencia del amplicón mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0,8% como fue descrito en la sección 3.3. Al final de la electroforesis, el fragmento de DNA correspondientes a las extremidades que flanquean el gen *fur* más el amplicón del caset de resistencia a cloranfenicol (1.050 pb) fueron purificados mediante el kit comercial *EasyPure® Quick Gel Extraction Kit* (TransGenBiotech Co.), según las especificaciones del fabricante. Luego, se realizó una cuantificación por espectrofotometría del producto de PCR amplificado utilizando el equipo NanoDrop (Thermo-Fisher).

3.6.2. Transformación de *E. coli* O157:H7 mediante electroporación

Se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de la cepa *E. coli* O157:H7 R46 en 5 ml de medio de cultivo LB + 100µg/ml de ampicilina 37 °C a 200 rpm. Posteriormente, se realizó un inculo (1:100) en 50 ml de LB suplementado con 100µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C a 200 rpm. El sistema *lamda red* fue inducido con la adición de 0,2% de L-Arabinosa. Una vez alcanzada la DO (DO_{600nm} de 0,4 - 0,5) requerida, se procedió con el preparado de células electrocompetentes como fue descrito en la sección 3.4. Para realizar la transformación por electroporación se depositó en una cubeta de electroporación (2 mm) (BioRad) 3 µl del producto de PCR (Sección 3.6.1.) + 47 µl de la cepa R46 electrocompetente y se incubó por 20 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un pulso de 200 V, capacitancia de 25 µF y resistencia de 200 Ω utilizando un electroporador (Electroporador ECM® 830, BTX). Inmediatamente después del pulso, se añadieron 700 µl de medio LB a las células y se incubaron a 37°C, sin agitación por 1 hora. Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de Petri en medio de cultivo LB Agar suplementado con 30 µg/ml de cloranfenicol luego de ser incubadas a 37 °C *overnight*.

3.6.3. Verificación de la presencia del caset de cloranfenicol en la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II

Para verificar la correcta escisión del gen *fur* de la cepa Rafaela II por recombinación homóloga doble, se realizaron diferentes ensayos de PCR colony. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos que se hibridan en regiones río arriba y río debajo del gen *fur* (Up-Fur & Down-Fur), y específicos del gen *fur* (Fw-*fur* & Rv-*fur*) (**Tabla 4**). El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 6. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%. Además, el producto de PCR obtenido a partir de la amplificación con los oligonucleótidos Up-Fur y Down-Fur fueron secuenciados en la a Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG INTA/Castelar.

Tabla 6: Programa de PCR para la verificación de la presencia del caset de cloranfenicol.

| Etapa | Nº ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo |
|----------------------------------|-----------|------------------|--------------------|
| <i>Desnaturalización inicial</i> | 1 | 95 | 5 minutos |
| <i>Desnaturalización</i> | | 95 | 30 segundos |
| <i>Annealing</i> | 35 | 58 | 30 segundos |
| <i>Extensión</i> | | 72 | 1 min, 40 segundos |
| <i>Extensión final</i> | 1 | 72 | 5 minutos |

3.7. Complementación de la cepa mutante Δfur

3.7.1. Amplificación de la secuencia de *fur* y su región promotora

Primero, para determinar la región promotora del gen *fur*, se utilizó el programa Artemis (Carver T *et al.*, 2012) para visualizar la secuencia completa del genoma de la cepa Rafaela II y obtener la secuencia del espacio intergénico entre el gen *fur* y el gen *fldA* (localizado río arriba

del gen *fur*). Esta secuencia intergénica con 287 pb fue sometida a un análisis de predicción de regiones promotoras utilizando el programa BPROM de la plataforma Softberry (<http://www.softberry.com/>). De acuerdo con este análisis *in silico*, fue detectado la secuencia ATAATGAT que corresponde a la región promotora Fur-Box. Luego se diseñaron los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR (**Tabla 4**), que contienen el sitio de restricción SpeI y BamHI para la amplificación del espacio intergénico y el gen *fur*.

Para amplificar el gen *fur* y su región promotora a partir del DNA genómico de la cepa Rafaela II, se realizó una reacción de PCR. Para la siguiente mezcla de reacción se utilizó: 5X GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de High PuredNTPs (TransgenBiotech), 0,6 µM de cada oligonucleótido (Fw-FurCFyRv-FurCR), 1 unidad de GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega), 1 µl de templado y se llevó a un volumen final de 50µl con agua mili Q estéril. El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 6. Se verificó la presencia del gen *fur* mediante electroforesis descrita en la sección 3.3. El volumen total de la reacción de PCR descrita anteriormente se depositó y resolvió en gel de agarosa al 0,8 %. Al final de la electroforesis, el fragmento de DNA correspondientes al amplicón del espacio intergénico más *fur* (*inter-fur*) (734 pb) fueron purificados mediante el kit comercial *EasyPure® Quick Gel Extraction Kit* (TransGenBiotech Co.), según las especificaciones del fabricante. Luego, se realizó una cuantificación por espectrofotometría del producto de PCR amplificado utilizando el equipo NanoDrop (Thermo-Fisher).

3.7.2. Clonado de *fur* más su región promotora en el plásmido pGEM-Teasy

3.7.2.1. Ligación

El producto de PCR amplificado fue clonado en el vector pGEM®-Teasy (Promega) (**Figura 10**) para generar el plásmido pG*fur*C. Este vector cuenta con una resistencia a ampicilina y una metodología de selección *Blue-White* por lo cual, el sitio de clonado múltiple se encuentra dentro del gen *lacZ*. La ligación fue realizada por 16 horas a 4 °C mediante una relación de masa 1:3 (vector:inserto), con 25 µg de vector, 3 U de ligasa T4 (Promega), Ligase Buffer 10X (Promega) en un volumen final de 10 µl.

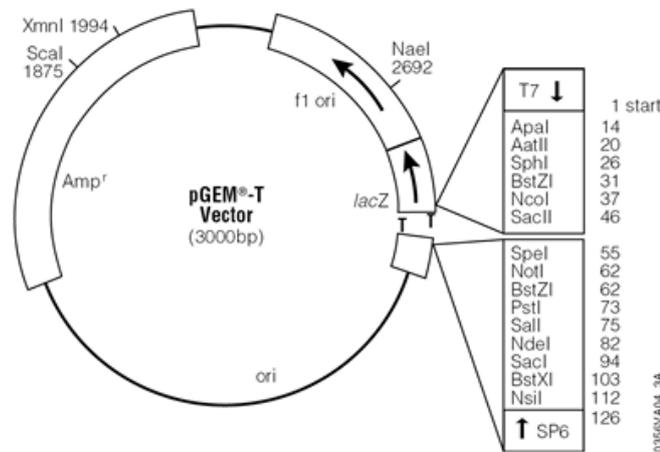


Figura 10: Mapa del vector pGEM®-Teasy.

3.7.2.2. Transformación de *E. coli* DH5α mediante shock térmico

Una vez realizada la ligación, se procedió con la transformación de bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes (sección 3.5.) con el producto de ligación (pGEM-T y el inserto *inter-fur*) mediante shock térmico. Para ello, se incubaron por 20 minutos en hielo 5 µl del producto de ligación (pG_{fur}C) + 45 µl de bacterias DH5α. Se prosiguió a incubar la muestra por 1 minuto a 42°C y luego nuevamente en hielo por 3 minutos. Luego se añadieron 600 µl de medio de cultivo LB y se incubó por 1 hora y 15 minutos a 37°C. El proceso de selección de los transformantes consistió en sembrar una alícuota de 100 µl del cultivo bacteriano en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con 100 mM de IPTG, 50 µl/ml de X-Gal y 100µg/ml de ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37 °C *overnight*. Después de este período, se evaluó la presencia de colonias resistentes a ampicilina y la identificación de los clones recombinantes con el plásmido pG_{fur}C mediante la detección de colonias de color blanco.

3.7.2.3. Verificación de la presencia del inserto *Inter-fur* en el vector pGEM-T easy

Para verificar la presencia del inserto “*inter-fur*” clonado en el vector pGEM-T easy, se realizó un a *colony* PCR mediante el programa descrito en la tabla 6 con los

oligonucleótidos Fw-FurCF y SP6 (**Tabla 4**) y se realizó una electroforesis como fue descrito previamente en la sección 3.3. Los plásmidos positivos fueron enviados a Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG INTA/Castelar para realizar la secuenciación utilizando oligonucleótidos T7 y SP6 (**Tabla 4**) para confirmar la correcta inserción y que no haya mutaciones en el inserto.

3.7.3. Subclonación de *inter-fur* en el plásmido pLF

Debido a que pGEM®-Teasy es un vector de alto número de copias, se procedió a clonar la secuencia *inter-fur* en el vector pLF (Marchesini *et al*, 2011).

3.7.3.1. Digestión enzimática del plásmido pGfurC y el vector pLF

Se realizó un cultivo *overnight* de *E. coli* DH5α pGfurC y *E. coli* DH5α pLF en 5 ml de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C con una rotación de 200 rpm. Se purificó el plásmido pGfurC y el vector pLF utilizando el kit comercial EasyPure® Plasmid Mini Prep Kit de (TransGenBiotech Co.), según las especificaciones del fabricante.

Luego de la obtención del plásmido pGfurC y el vector pLF, se realizó una digestión enzimática utilizando las enzimas BamHI (Promega) y SpeI (Promega) incubadas a 37 °C por 2 horas y 30 minutos para pGfurC y 18h para pLF. Posteriormente, se realizó una electroforesis del producto de digestión según la metodología mencionada en la sección 3.3. La región *inter-fur* y el vector linealizado pLF fueron purificados mediante el kit comercial EasyPure® Quick Gel ExtractionKit (TransGenBiotech Co.) y cuantificados por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop (Thermo-Fisher).

3.7.3.2. Ligación de *fur* más su región promotora en el plásmido pLF

Los productos digeridos y purificados correspondientes al inserto *inter-fur* al plásmido pLF descritos anteriormente fueron sometidos a una reacción de ligación equimolar de 3:1 (inserto:vector), con 3 U de la T4 DNA ligase (Promega), 1 µL de Ligase Buffer 10X (Promega)

en un volumen final de 10 μ l. La reacción fue mantenida a temperatura de 4 °C durante toda la noche. El producto de ligación fue denominado pLF_{fur}C.

3.7.3.3. Transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido pLF_{fur}C mediante shock térmico

Una vez realizada la ligación, se procedió con la transformación de las bacterias quimiocompetentes *E. coli* DH5 α (preparadas de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 3.5.) con el producto de ligación pLF_{fur}C mediante shock térmico como descrito en la sección 3.7.2.2. Para ello, se incubaron por 20 minutos en hielo 5 μ l de pLF_{fur}C + 45 μ l de bacterias DH5 α quimiocompetentes. Luego el procedimiento de shock térmico las bacterias fueron sembradas en medio de cultivo LB agar suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37°C por 12 horas.

3.7.3.4. Verificación de presencia del inserto *Inter-fur* en el plásmido pLF

Para verificar la presencia del inserto *inter-fur* clonado en el vector pLF, se realizó un cultivo *overnight* de 5 colonias en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C con una rotación de 200 rpm. Se purificó el plásmido pLF_{fur}C utilizando el kit comercial *EasyPure*[®] *Plasmid Mini Prep Kit* de (TransGenBiotech Co.), según las especificaciones del fabricante. Se procedió a realizar una PCR según el programa descrito en la tabla 6 con los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR (**Tabla 4**) y se realizó una electroforesis como fue descrito previamente en la sección 3.3. Los plásmidos positivos fueron enviados a Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG INTA/Castelar para realizar la secuenciación utilizando oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR (**Tabla 4**) para confirmar la correcta inserción y que no haya mutaciones en el inserto.

3.7.3.5. Transformación de la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II Δ fur

En esta etapa la cepa *E. coli* O157:H7 fue transformada con la construcción pLF_{fur}C y con el plásmido pLF vacío. El plásmido pLF_{fur}C fue extraído de uno de los clones positivos de

E. coli DH5 α (sección 3.7.3.3.) el cual fue confirmado mediante secuenciación (sección 3.7.3.4.), utilizando el kit comercial *EasyPure*[®] *Plasmid Mini Prep Kit* de (TransGenBiotech Co.), luego el mismo fue cuantificado por espectrofotometría. El producto de la *Mini Prep* fue utilizado para transformar células electrocompetentes de la cepa *E. coli* O157:H7 Δfur que fueron preparadas como fue descrito en la sección 3.4. La transformación fue conducida por electroporación siguiendo los mismos parámetros descritos en la sección 3.6.2. Para ello, 5 μ l del plásmido pLF $furC$ y 5 μ l del plásmido pLF fueron incubados individualmente con 45 μ l de bacteria Rafaela II Δfur electrocompetente por 20 minutos en hielo. La electroporación fue llevada a cabo en un electroporador (Electroporador ECM[®] 830, BTX). Inmediatamente después del pulso, se añadieron 700 μ l de medio LB a las células y se incubaron a 37°C, sin agitación por 1 hora y 30 minutos. Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de Petri con medio de cultivo LB Agar suplementado con cloranfenicol 30 μ g/ml luego de ser incubadas a 37 °C *overnight*.

3.7.3.6. Verificación de la presencia del plásmido pLF $furC$ en la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II Δfur

Para verificar la correcta transformación de la cepa Δfur con el plásmido pLF $furC$, se realizó un a *colony* PCR mediante el programa descrito en la tabla 6 con los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR (Tabla 4) y se realizó una electroforesis como fue descrito previamente en el punto 3.3. Las colonias obtenidas fueron nombradas $\Delta fur/pFurC$.

3.8. Evaluación del perfil de crecimiento de las cepas tipo salvaje y mutante de *E. coli* O157:H7 ante diferentes biodisponibilidades de hierro

Primero, se realizó un cultivo 1:100 *overnight* de las cepas Rafaela II salvaje, Rafaela II Δfur (Δfur) y Rafaela II $\Delta fur/pFurC$ ($\Delta fur/pFurC$) en 5 ml de medio LB a 37 °C 200 rpm. Luego, se realizó un inóculo de concentración correspondiente a 0,02 en 20 ml de LB (control) y LB suplementado con 200 μ M, 250 μ M o 300 μ M del quelante de hierro 2,2'-Bipyridyl (BPD)

(Sigma) para limitar la biodisponibilidad de hierro en el medio. El seguimiento del perfil de crecimiento fue determinado mediante una DO_{600nm} cada 1 hora durante 10 horas. A partir de los datos de DO_{600nm} , se trazaron curvas de crecimiento comparando las diferentes cepas en presencia y ausencia del quelante de hierro BPD. Los datos de DO_{600nm} se procesaron y representaron utilizando el software GraphPad Prism v.5.0. Se realizaron tres replicas biológicas para cada condición.

3.9. Análisis proteómica diferencial cuantitativa basado en *tándem mass tag* (TMT)

3.9.1. Extracción de proteínas a partir del lisado bacteriano total

Para la extracción de las proteínas, la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II salvaje fue crecida en medio de cultivo LB y LB suplementado con 300 μ M BPD, y la cepa Rafaela II Δfur fue crecida en medio de cultivo LB a 37 °C a una agitación de 200 rpm, hasta el crecimiento exponencial ($DO_{600nm} = 0.8$). Los cultivos fueron centrifugados a 5.000 rpm a 4°C, por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado dos veces con 40 ml de PBS. Luego, el *pellet* fue resuspendido en 1 ml de Buffer de Lisis (Tris-HCl 12,5 mM pH 7,2, urea 7M, tiourea 2M, SDC (*sodiumdeoxycholate*) 3% y DTT (ditiotreitól) 1,5 %) + 10 ml de inhibidor de proteasas (Roche)). Se procedió a sonicar las muestras mediante seis pulsos de cinco segundos con 30 segundos de descanso a una potencia de 30 Hertz. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4°C, 13.000 rpm por 40 minutos, se descartó el *pellet*. Luego, a este sobrenadante se le añadió acetona en la proporción de cinco volúmenes del sobrenadante y se incubó a 4°C por 18 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 8.000 rpm a 4 °C por 40 minutos y el *pellet* obtenido fue liofilizado. Se realizaron cinco replicas biológicas para cada condición. El método de Bradford (Bradford, 1976) fue utilizando para cuantificar las proteínas utilizando una curva de BSA como estándar. Las muestras proteicas obtenidas fueron enviadas al laboratorio del Dr. Jin Long Bei en *AGRO-Biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences* en Guangzhou, China.

3.9.2. Resolución electroforética en gel de poliacrilamida

Para evaluar la calidad de las proteínas extraídas, las mismas fueron resueltas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, según Laemmli, 1970. Las muestras fueron diluidas en Buffer carga 2X (SDS 2 %, β -mercaptoetanol 2 %, glicerol 20 % y azul de bromo-fenol 0,01 % en Tris 0,0065 M (pH 6,8)) y hervidas por 10 min. Luego las muestras fueron sembradas en el gel y la electroforesis ocurrió en Buffer Laemmli (2-Mercaptoetanol 0.1%, Azul de Bromofenol 0.0005%, Glicerol, 10%, SDS 2%, Tris-HCl, 63 mM, pH 6.8) a 100 V. Posteriormente, el gel fue teñido con *Coomassie blue* R-250 (Metanol 45%, Ácido acético glacial 10%, Agua 45% y 3g/L *Coomassie Brilliant Blue* R-250).

3.9.3. Digestión de proteínas

Para la digestión, la solución proteica que contenía 100 μ g de proteína se redujo con 2 μ l de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) a 37 °C durante 60 min y se alquiló con 4 μ l de iodoacetamida (IAM) a temperatura ambiente durante 40 minutos en la oscuridad. Se añadieron cinco volúmenes de acetona fría para precipitar la proteína a -20 °C *overnight*. Después de la centrifugación a 12.000 g a 4 °C durante 20 minutos, el *pellet* se lavó dos veces con 1 ml de solución acuosa de acetona al 90% pre-enfriada. Luego, el *pellet* fue resuspendido con 100 μ l del buffer triethylammonium bicarbonate (TEAB) a 10 mM. La tripsina (Promega, Madison, WI) fue añadida a una proporción de masa de tripsina a proteína de 1:50 y se incubó a 37 °C *overnight*. La mezcla de péptidos fue desalinizada por C18 Zip-Tip, y cuantificada por Pierce™ *Quantitative Colorimetric Peptide Assay* (23275) y luego liofilizada por SpeedVac.

3.9.4. Etiquetado TMT

Los péptidos digeridos por tripsina fueron marcados con TMT-16Plex (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA, Art No.A44520) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una unidad de reactivo TMT se descongeló y se reconstituyó en acetonitrilo de 50 μ l, después de marcar durante 2 horas a temperatura ambiente, se agregó hidroxilamina para reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, todas las muestras se agruparon, desalaron y secaron al vacío.

3.9.5. Separación de fase invertida de pH alto

La mezcla peptídica se resuspendió en buffer A (formiato de amonio de 20 mM en agua, pH 10.0, ajustado con hidróxido de amonio), y luego se fraccionó mediante separación de pH alto utilizando el sistema Ultimate 3000 (ThermoFisherScientific, MA, EUA) conectado a una columna de fase inversa (columna XBridge C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μ M, (Waters Corporation, MA, Estados Unidos). La separación de pH alto fue realizada utilizando un gradiente lineal, comenzando de 5% B a 45% B en 40 min (B: formiato de amonio 20mM en 80% ACN, pH 10.0, ajustado con hidróxido de amonio). La columna se volvió a equilibrar en la condición inicial durante 15 min. El caudal de la columna se mantuvo en 1 ml/minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Se recolectaron doce fracciones; Cada fracción se secó en un concentrador de vacío para el siguiente paso.

3.9.6. Análisis nano-HPLC-ms/ms

Los péptidos fueron disueltos en el disolvente A (A: 0,1% de ácido fórmico en agua) y se analizaron mediante OrbitrapExploris 480 acoplado a un sistema EASY-nanoLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). La muestra de péptidos de 2 μ l se cargó en una columna analítica de 25 cm (75 μ m de diámetro interior, resina de 1,9 μ m)) y se separó con un gradiente de 120 min a partir de un tampón B al 4% (80% ACN con 0,1% de FA) durante 8 minutos, seguido de un aumento gradual al 70% en 110 minutos, 90% en 1 minuto y permaneció allí durante 4 minutos, luego se equilibró en 4.8% durante 5 minutos. El caudal de la columna se mantuvo en 300 nl/minuto con una temperatura de la columna de 55 °C. El voltaje de electrospray se ajustó a 2 kV. El espectrómetro de masas se ejecutó en modo de adquisición dependiente de datos (DDA) y cambió automáticamente entre el modo MS y MS/MS. El estudio de los espectros MS de barrido completo (m/z 350-1500) fue adquirido en un Orbitrap (Thermo Fisher) con una resolución de 60.000. El objetivo de control automático de ganancia (AGC) de estándar y el tiempo máximo de inyección de Auto. Luego, los iones precursores se seleccionaron en celda de colisión para la fragmentación por disociación de colisión de mayor energía (HCD), la energía de recolección normalizada fue de 36. La resolución MS/MS se

estableció en 30.000, el objetivo de control automático de ganancia (AGC) de Custom, el tiempo máximo de inyección de Auto y la exclusión dinámica fue de 45 segundos.

3.9.7. *Análisis de datos*

Los espectros de masas obtenidos en tándem fueron procesados por el PEAKS Studio versión 10.6 (BioinformaticsSolutions Inc., Waterloo, Canadá). PEAKS DB se creó para buscar en la base de datos de STEC_O157H7_str_RafaelaII asumiendo tripsina como la enzima digestiva. Se realizaron búsquedas en PEAKS DB con una tolerancia de masa de iones de fragmentos de 0,02 Da y una tolerancia de iones padre de 10 ppm. La carbamidometilación en cisteína y TMT 16-plex en lisina y el término N de la proteína se especificaron como la modificación fija. La oxidación en metionina y la acetilación en el término N de la proteína se especificaron como las modificaciones variables. Los péptidos fueron filtrados con un *False Discovery Rate* (FDR) del 1% y las proteínas fueron filtradas por 1 péptido único. Se utilizaron iones reporteros para calcular la relación de cuantificación entre las muestras. La normalización se calculó a partir de la intensidad total de todas las etiquetas en todos los péptidos cuantificables. Luego de un análisis estadístico por prueba T, se seleccionaron las proteínas expresadas diferencialmente con un *p-value* $\leq 0,05$ y un *fold change* $\leq 1,5$, $\geq 1/1,5$.

3.10. **Ensayo de adhesión de las cepas tipo salvaje y mutante de *E. coli* O157:H7 a células epiteliales intestinales HCT-8**

3.10.1. *Preparación de monocapas celulares de células HCT-8*

La línea celular HCT-8 (ATCC, CCL-244) derivada de adenocarcinoma ileocecal colorectal humano es utilizada como modelo de epitelio colónico humano (Zumbrun *et al*, 2010). Las células HCT-8 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco), el cual contiene 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2,4g/l de Na₂CO₃, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1mM de Piruvato de Sodio, 2,5 g/l de glucosa suplementado con 100 UI/ml penicilina y 100µl/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

3.10.2. Ensayo de adhesión celular

Para el ensayo de adhesión celular se sembraron 2×10^6 de la célula HCT-8 en placas de cultivo celular de 12 pocillos y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ por 18h. Para la preparación del inóculo bacteriano se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de las cepas Rafaela II salvaje, Δfur y $\Delta fur/pFurC$ en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C 200 rpm por 18h. Previo a la infección bacteriana, las células fueron lavadas 3 veces con PBS (pH=7) y se les agregó 1 ml de RPMI sin antibióticos y SFB. Los cultivos bacterianos crecidos *overnight*, fueron lavados tres veces con PBS. Para ello, las células fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 3 minutos. Luego, se realizó un inóculo 1:100 en 5 ml de medio de cultivo RPMI y se incubaron los inóculos hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5. Luego las células HCT-8 fueron infectadas con una MOI de 100 a partir del cultivo bacteriano y se incubó durante 4 horas a 37 °C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂. Al finalizar este periodo, el cultivo celular fue lavado tres veces con 1 ml de PBS para descartar las bacterias que no se adhirieron, y se prosiguió a lisar las células epiteliales con 1ml de Tritón X-100 (0,15%) (Sigma) por 5 minutos a 37 °C. Finalmente se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl en medio de cultivo LB agar, las mismas fueron incubadas a 37 °C. El proceso de adhesión celular fue evaluado mediante el recuento de UFC/ml.

El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados se expresaron como media (\pm) desviación estándar. La diferencia significativa entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA, seguida de la prueba “Turkey”, ambas disponibles en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.11. Ensayo de supervivencia intracelular de las cepas tipo salvaje y mutante de *E. coli* O157:H7 a macrófagos murinos RAW264.7

3.11.1. Preparación de monocapas celulares de células RAW264.7.

La línea celular RAW264.7 (ATCC-TIB-71) derivada de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson en células de macrófagos fue utilizada para el presente trabajo. Las células RAW264.7 fueron cultivadas en medio D-MEM el cual contiene 10% de

suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2,4g/l de Na₂CO₃, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1mM de Piruvato de Sodio, 2,5 g/l de glucosa suplementado con 100 UI/ml penicilina y 100µl/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich, USA) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

3.11.2. Ensayo de infección

Para este ensayo se sembraron 2×10^5 de células RAW264.7 en placas de cultivo celular de 12 pocillos y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante por 18 horas. Previo a la infección bacteriana, las células fueron lavadas 2 veces con PBS (pH=7) y se les agregó 1 ml de DMEM más 10% de SFB, sin antibióticos. Para la preparación del inóculo bacteriano se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de las cepas Rafaela II salvaje, Δfur y $\Delta fur/pFurC$ en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C 200 rpm. Posteriormente se realizó un inóculo 1:100 en 15 ml de medio de cultivo D-MEM de cada cepa bacteriana. Una vez que los inóculos alcanzaron una DO_{600nm} de 0,5, se infectó con una MOI de 10 el cultivo de células RAW264.7, la placa se centrifugó brevemente (400 g, 5 min) para sincronizar la infección y se incubó durante 30 minutos a 37 °C bajo 5 % de CO₂. Las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió medio de cultivo D-MEM + SFB al 10% + 100 µg/ml de gentamicina para matar las bacterias que no fueron fagocitadas por los macrófagos y se incubó nuevamente a 37°C bajo 5% de CO₂. Después de 2 horas de infección, se recogieron los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS tres veces y se añadió medio fresco que contenía 20 µg/ml de gentamicina y SFB al 5 %. Para determinar el número de bacterias intracelulares en los macrófagos infectados en los tiempos 2h y 24h post infección, los macrófagos fueron lisados con Tritón X-100 (0,15%) por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se realizó una dilución seriada en PBS donde se sembraron 100 µl en medio de cultivo LB agar que fue incubado a 37 °C. La supervivencia bacteriana al ataque de los macrófagos fue evaluada mediante el recuento de UFC/ml.

El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados se expresaron como media (\pm) desviación estándar. La diferencia significativa entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA, seguida de la prueba “Turkey”, ambas disponibles en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.12. Ensayo de resistencia al estrés ácido

Para evaluar la capacidad resistencia al estrés ácido de Rafaela II salvaje, Δfur y $\Delta fur/pFurC$ se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de cada una de las cepas en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C 200 rpm. Posteriormente, el cultivo fue lavado tres veces con PBS a 4.000 rpm por 3 minutos. Se realizó un inóculo (1:100) de las diferentes cepas en 15 ml de medio de cultivo LB y se incubó a 37 °C, 200 rpm. Una vez que los inóculos alcanzaron una DO_{600nm} de 0,5 (este punto será considerado el tiempo cero (T.0)), 1 ml de cultivo fue centrifugado a 4.000 rpm por 4 min y lavado una vez con PBS (pH=7.0). Los *pellets* bacterianos fueron resuspendidos en LB pH = 2,5 y LB pH = 4,5 e incubados por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 4.000 rpm por 4 minutos y resuspendido en 1 ml de PBS. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en PBS y se sembraron 100 μ l en medio de cultivo LB agar y se incubaron a 37 °C. La resistencia de las cepas de *E. coli* O157:H7 a diferentes condiciones de pH se evaluó a través del análisis de viabilidad bacteriana mediante el recuento UFC/ml en placas LB agar, luego de su incubación a 37 °C. El porcentaje de viabilidad se determinó a través de la siguiente fórmula: UFC (condición estrés) x 100/ UFC (T.0).

El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados se expresaron como media (\pm) desviación estándar. La diferencia significativa entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA, seguida de la prueba “Turkey”, ambas disponibles en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.13. Ensayo de motilidad en agar blando

Para evaluar la motilidad bacteriana se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de Rafaela II salvaje, Δfur y $\Delta fur/pFurC$ en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C 200 rpm. Posteriormente a DO_{600nm} de estos cultivos fueron ajustadas para 0.2 y se sembraron en forma de *spot* 1,5 μ l de cultivo en el centro de una placa de Petri conteniendo medio TSB (*Tryptic Soy Broth*) conteniendo 0,3% de agar. Para evaluar la motilidad bacteriana se midió el radio de crecimiento luego la incubación a 37 °C por 18 horas. El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados

se expresaron como media (\pm) desviación estándar. La diferencia significativa entre los grupos se calculó mediante la prueba ANOVA, seguida de la prueba “Turkey”, ambas disponibles en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.14. Análisis de expresión génica

3.14.1. Extracción de RNA total de las cepas de *E. coli* O157:H7

Todos los procedimientos relacionados con la manipulación del ARN se realizaron utilizando materiales dedicados exclusivamente para este fin. Inicialmente, se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de Rafaela II salvaje, Δfur y $\Delta furC$ en 5 ml de medio de cultivo LB a 37 °C, 200 rpm. Luego, se realizó un inóculo en medio LB y LB suplementado con 300 μ M de BPD y fueron incubados a 37 °C hasta alcanzar la DO_{600nm} 0,4– 0,5. Los cultivos fueron centrifugados a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en 1 ml de Trizol (Invitrogen). Posteriormente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante, se agregaron 100 μ l de cloroformo y se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se agregaron 600 μ l de isopropanol (Sigma) + 60 μ l de Acetato de sodio (3M) (Sigma). Luego de incubar la muestra por 2 h a -70 °C, la misma fue centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con etanol frío al 70%, y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se agregaron 20 μ l de agua libre de RNAs (Sigma) + 20 μ l de cloruro de litio (Thermo Fisher) y se incubó a -80 °C *overnight*. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con etanol 70%, la muestra fue centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 20 μ l de agua *UltraPure™ DNase/RNase-Free* (Thermo Fisher).

Para verificar la integridad de la muestra, se corrió en un gel de agarosa al 2%, utilizando 1 μ l de muestra + 4 μ l de *Loading Buffer*. Luego la muestra fue cuantificada por espectrofotometría utilizando un NanoDrop.

3.14.2. Ensayo de retro-transcripción

Previamente a la síntesis de cDNA, el RNA fue sometido a un tratamiento con DNAsa (Invitrogen). Se utilizó 1 µg de RNA, 1 µl de DNAsa I, 1 µl de 10X *DNase I Reaction Buffer* y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente para armar la reacción de retro-transcripción se utilizó 10 µl del RNA previamente tratado con DNAsa, más 1 µl de *Random primers* (30 mg/µl) (Invitrogen), 1 µl de dNTPs (Transgen) y 1 µl de agua MiliQ estéril. La mezcla fue incubada a 65 °C por 5 minutos. A continuación, se agregó a la reacción, 2 µl de DTT (Invitrogen), 4 µl *M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer* (Promega) y 1 µl *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega). Luego, la mezcla fue sometida a un termociclador MiniAmp™ (AppliedBiosystems) a temperatura de 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 50 minutos, y 70 °C por 15 minutos. Las muestras que contenían el ADN complementario (cDNA) generado se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

3.14.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Cada muestra de RNA extraído y transformado en cDNA (sección 3.14.2.) se sometió a reacciones de qPCR correspondiente a cada par de cebadores utilizados (**Tabla 4**). El gen *housekeeping rpoA* (*DNA-directed RNA polymerase subunit alpha*) fue utilizado como control de expresión génica constitutiva. La mezcla de reacción consistió en 1 µL de cDNA, 5 µL *SYBR® Green PCR MasterMix* (Life Technologies), 0,1 µM de cada primer. La amplificación fue realizada en un termociclador en tiempo real StepOne plus (AppliedBiosystems). Todas las reacciones se realizaron con tres replicas biológicas, utilizando tres replicas técnicas. Los datos generados fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ con la corrección de la eficiencia. Las curvas de amplificación se estudiaron usando el software LinReg (Ramakers *et al*, 2003; Gruber & Sperandio, 2015; Herold *et al*, 2005). Los resultados finales y el análisis estadístico de permutación se evaluaron con el software fgStatistic (<http://www.infostat.com.ar/?lang=en>). El procedimiento de PCR cuantitativa fue diseñado de acuerdo con las recomendaciones generales MIQE (Bustin *et al*, 2009).

3.15. Análisis bioinformático

Con el objetivo de predecir los genes que podrían ser parte del *fur* regulón, primero se descargó la secuencia fasta de aminoácidos de las cepas *E. coli* K-12 y *E. coli* O157:H7 Rafaela II de NCBI. Luego se realizó la predicción de secuencias *fur*-box en regiones promotoras de las cepas K-12 y Rafaela II mediante el programa PRODORIC (Dudek & Jahn, 2022). El conjunto de genes obtenidos a partir del análisis por PRODORIC y las proteínas identificadas en el análisis proteómico fueron sometidos a los siguientes análisis: la predicción de factores de virulencia fue hecha mediante la base de datos *virulence factor database* (VFDB) (Chen *et al*, 2005); las anotaciones funcionales fueron asignadas por la base de datos COG (Galperinet *al*, 2015) y a través del software Blast2GO (Conesa *et al*, 2005); y el GOATOOLS se utilizó para realizar el análisis de enriquecimiento GO (Klopfenstein *et al*, 2018).

4. Resultados y Discusión

4.1. Predicción *in silico* del regulón *fur* en *E. coli* O157:H7

Como fue mencionado en la sección 1., la principal diferencia genómica entre *E. coli* patogénica O157:H7 y *E. coli* comensal K-12 radica en las islas de patogenicidad y el plásmido pO157 que se encuentran presentes en O157:H7 y no en K-12. Dentro de las islas-O y el plásmido pO157 se encuentran codificados los factores de virulencia y patogenicidad de la bacteria, pero, aunque se han realizado varios estudios, todavía hay un grado de desconocimiento de la totalidad de los factores de virulencia ubicados en estas islas-O que contribuyen a la infección por *E. coli* O157:H7 y como estos son regulados. A raíz de estos hechos, se procedió a realizar un análisis *in silico* comparativo entre *E. coli* K-12 y *E. coli* O157:H7 para predecir los posibles genes que podrían ser regulados por Fur. El análisis constó de tres etapas: (1) la predicción de secuencias *fur*-box en las regiones promotoras utilizando el programa PRODORIC; (2) un análisis de anotación funcional; y (3) un análisis de anotación estructural (**Figura 11**).

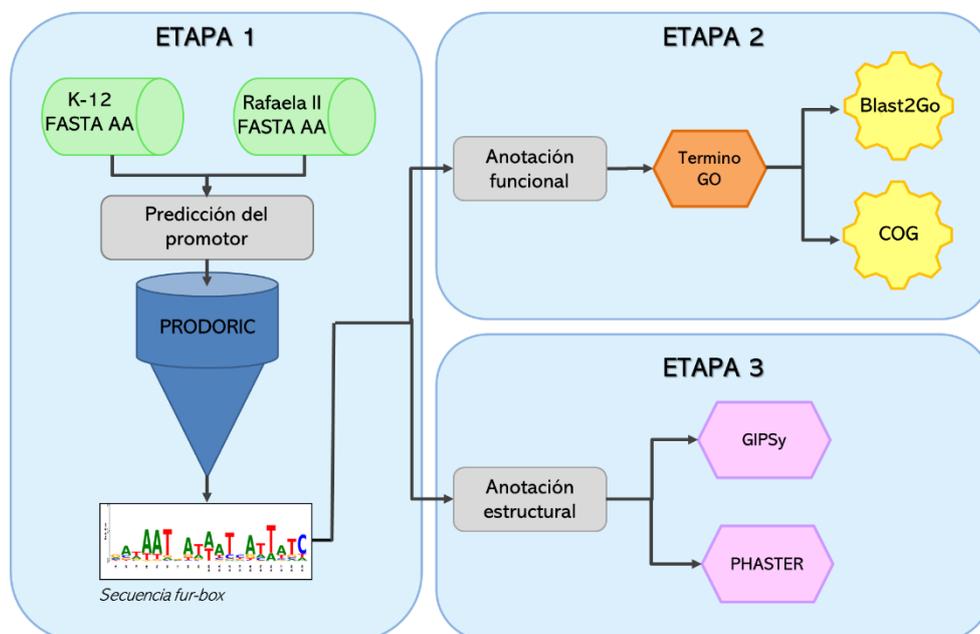


Figura 11: Esquema del proceso de la estrategia bioinformática. (1) predicción de secuencias *fur*-box; (2) análisis de anotación funcional; y (3) análisis de anotación estructural.

4.1.1. Predicción de las secuencias *fur*-box en las regiones promotoras mediante **PRODORIC**

Para realizar la predicción de secuencias *fur*-box en las regiones promotoras de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* K-12, las secuencias de aminoácidos en formato fasta de ambas cepas fueron analizadas mediante el programa PRODORIC (Dudek & Jahn, 2022). Este es una base de datos sobre regulación y expresión génica en procariotas el cual incluye una colección de sitios de unión de factores de transcripción. Para realizar el análisis se realizó una búsqueda virtual de *footprints* con la matriz MX000128. Como resultado, pudimos observar que la cepa K-12 cuenta con 314 genes que contienen secuencias *fur*-box en su región promotora, mientras que Rafaela II cuenta con 427 genes (**Figura 12A**). Al realiza un análisis comparativo se vio que del total de los genes predichos que cuentan con secuencias *fur*-box en su región promotora, un 32,1% (101) y 52,2% (223) son exclusivos de la cepa K-12 y Rafaela II respectivamente (**Figura 12B**). La lista de todos los genes identificados con secuencias *fur*-box en su promotor se encuentra presente en el anexo I.

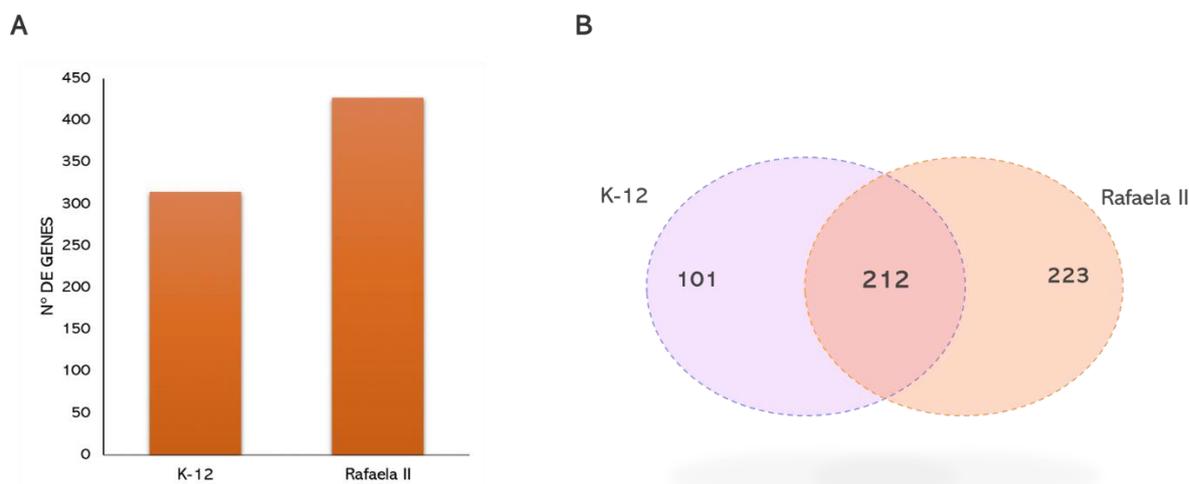


Figura 12: Análisis comparativo *in-silico* de regiones *fur*-box en K-12 y Rafaela II por PRODORIC. (A) número de genes con regiones *fur*-box en sus promotores en Rafaela II y K-12; y (B) distribución de los genes con predicción positiva para secuencias *fur*-box entre K-12 y Rafaela II representado por un diagrama de venn.

Luego se planteó si en la lista de los genes con predicción positiva para secuencias *fur*-box en Rafaela II habían genes descritos como factores de virulencia de *E. coli* O157:H7. Para

ello, se realizó una identificación de estos genes en la base de datos *virulence factor database* (VFDB) (Chen *et al*, 2005). A partir de este análisis se predijo que 31 genes que cuentan con secuencias *fur*-box en sus promotores, son factores de virulencia de *E. coli* O157:H7 (**Tabla 7**). Sin embargo, podemos ver listado el gen *ler*, regulador de la isla de patogenicidad LEE, el cual se ha demostrado en otros ensayos que el mismo es regulado por la concentración de hierro intracelular, por lo que Fur es un regulador positivo indirecto (Tobe *et al*, 2014).

Tabla 7: Factores de virulencia con posibles secuencias *fur*-box.

| Procesos | Factores de virulencia | Genes |
|------------------------------|----------------------------------|------------------|
| <i>Adherencia</i> | ECP | <i>ykgK/ecpR</i> |
| | | <i>yagX/ecpC</i> |
| | Fimbria de tipo 1 | <i>fimA</i> |
| | | <i>fimI</i> |
| <i>Autotransportador</i> | EspP | <i>espP</i> |
| <i>Sistemas de secreción</i> | SST3 | <i>espA</i> |
| | | <i>sepL</i> |
| | | <i>cesT</i> |
| | | <i>sepQ/escQ</i> |
| | | <i>escP</i> |
| | | <i>escV</i> |
| | | <i>escU</i> |
| | | <i>escT</i> |
| | | <i>escS</i> |
| | | <i>escR</i> |
| | Efectores secretados por el SST3 | <i>espF</i> |
| | | <i>tir</i> |
| | | <i>map</i> |
| | | <i>nleA/espI</i> |
| | | <i>espL2</i> |
| | | <i>espM2</i> |
| <i>espR3</i> | | |

| | | |
|------------------------------|-------------|------------------|
| | | <i>espR4</i> |
| | | <i>espX6</i> |
| | | <i>nleG</i> |
| | | <i>nleH1</i> |
| | | <i>nleH2</i> |
| | | <i>hlyD</i> |
| <i>Exotoxinas</i> | Hemolisinas | <i>hlyE/clyA</i> |
| <i>Adquisición de hierro</i> | Chu | <i>chuA</i> |
| <i>Regulador</i> | Ler | <i>ler</i> |

4.1.2. Anotación funcional

En cuanto a la segunda etapa, se realizó una anotación funcional de los genes predichos en la primera etapa mediante la base de datos *Clusters of Orthologous Genes* (COGs) (Galperin *et al*, 2015) y el programa Blast2Go (Conesa *et al*, 2005). A raíz de estas se realizó una predicción de los procesos biológicos que participan estos genes que podrían ser regulados por Fur en cada cepa (**Figura 13**). Podemos ver que el regulón Fur podría participar principalmente en los siguientes procesos biológicos de Rafaela II: secreción, tráfico intracelular y transcripción. Sin embargo, cabe destacar que el 32,4% de las proteínas analizadas son de función desconocida. Por otro lado, los principales procesos biológicos en los que Fur podría estar involucrado en K-12 son: metabolismo y transporte de carbohidratos y transcripción. Igualmente, K-12 también cuenta con una alta cantidad de proteínas de función desconocida que son reguladas por Fur.

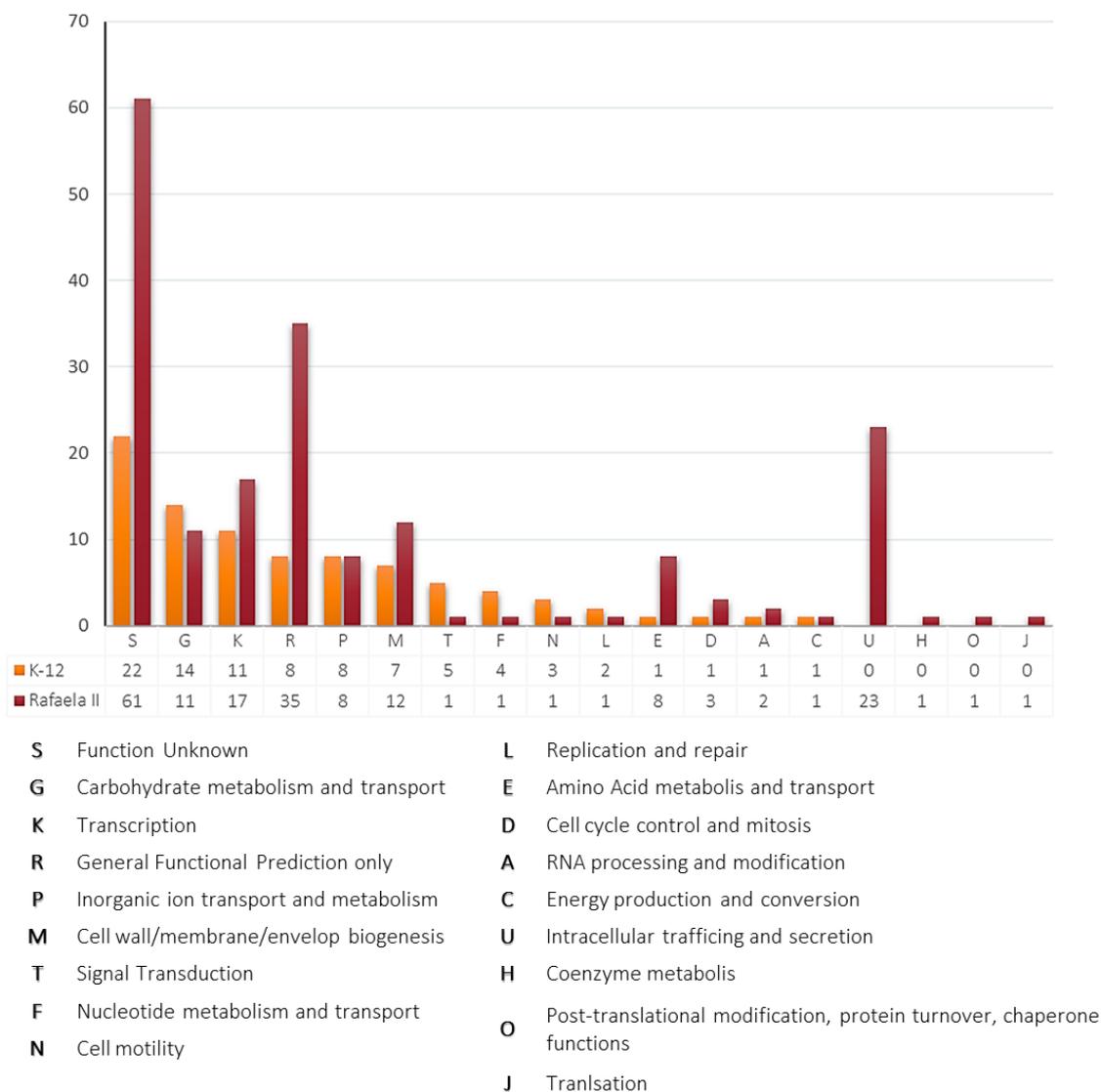


Figura 13: Predicción de procesos biológicos regulados por Fur en K-12 y Rafaela II

4.1.3. Predicción de islas genómicas y secuencias de fagos en el genoma de la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II

La tercera etapa consistió en evaluar si los genes predichos con secuencia fur-box en Rafaela II podrían estar ubicados en islas genómicas o en regiones de fagos. Para eso, se utilizaron los programas: PHASTER (*PHAge Search Tool Enhanced Release*) (Arndt *et al*, 2016), un servidor web para la rápida identificación y anotación de secuencias de profagos

dentro de genomas bacterianos y plásmidos; y GIPSy (*Genomic island prediction software*) (Soares *et al.*, 2016), un programa para la predicción de islas genómicas.

Mediane PHASTER, se predijeron 20 secuencias de fagos en el genoma de *E. coli* O157:H7 Rafaela II de los cuales: 13 regiones se encuentran intactas, 5 regiones están incompletas y 2 regiones son cuestionables. Entre los fagos identificados, 51 genes de 427 genes con predicción positiva para regiones fur-box de Rafaela II se encuentran localizados en ellos (**Tabla 8**). Mediante GIPSy se predijo que 109 genes de 427 genes con predicción positiva para regiones fur-box de Rafaela II se encuentran distribuidos en 41 islas genómicas, donde: 97 genes se encuentran distribuidos en 28 islas de patogenicidad; 19 genes se encuentran distribuidos en 5 islas simbióticas; 10 genes se encuentran distribuidos en 3 islas metabólicas; y 21 genes se encuentran distribuidos en 5 islas de resistencia (**Tabla 8**). Del total de los genes, 28 se encuentran presentes en más de un tipo de isla de patogenicidad y 43 genes también se encuentran presentes en fagos.

Tabla 8: Localización de genes con predicción positiva para regiones fur-box exclusivos de Rafaela II. Anotación estructural según su localización en fagos o en islas genómicas donde: (IPA) islas de patogenicidad; (ISA) islas simbióticas; (IMET) islas metabólicas; y (IR) islas de resistencia.

| Gen ID | N° Fago | Isla Genómica | Nombre del gen | Descripción |
|--------------|---------|---------------|-------------------|---|
| XF37_RS00075 | N/A | IPA | <i>faeE</i> | Fimbrial chaperone |
| XF37_RS00080 | N/A | IPA | <i>fimC</i> | Fimbrial chaperone protein |
| XF37_RS00460 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS00485 | N/A | IPA | <i>ler</i> | L0054 |
| XF37_RS00510 | N/A | IPA | <i>escR</i> | Type III secretion system LEE export apparatus protein escr |
| XF37_RS00515 | N/A | IPA | <i>escS</i> | Type III secretion system LEE export apparatus protein escs |
| XF37_RS00520 | N/A | IPA | <i>escT</i> | Type III secretion system LEE export apparatus protein escT |
| XF37_RS00525 | N/A | IPA | <i>escU</i> | Type III secretion system LEE export apparatus protein escu |
| XF37_RS00535 | N/A | IPA | <i>UN86_14415</i> | Negative regulator grlr |
| XF37_RS00540 | N/A | IPA | <i>grlA</i> | Transcriptional regulator grla |

| | | | | |
|--------------|-----|---------|-----------------|--|
| XF37_RS00595 | N/A | IPA | <i>escP</i> | Type III secretion system LEE needle length regulator <i>escp</i> |
| XF37_RS00600 | N/A | IPA | <i>sepQ</i> | Type III secretion system LEE <i>sepq</i> regulator |
| XF37_RS00620 | N/A | IPA | <i>tir</i> | Translocated intimin receptor Tir |
| XF37_RS00625 | N/A | IPA | <i>cesT</i> | Tir chaperone |
| XF37_RS00640 | N/A | IPA | <i>sepL</i> | Type III secretion system LEE <i>sepl</i> protein |
| XF37_RS00645 | N/A | IPA | <i>espA</i> | Type III secretion system LEE translocon filament protein <i>espa</i> |
| XF37_RS00675 | N/A | IPA | <i>espF</i> | Espf T3SS effector protein |
| XF37_RS04935 | N/A | IPA&ISA | <i>invF</i> | Arac family transcriptional regulator |
| XF37_RS04955 | N/A | IPA&ISA | <i>spaL</i> | Type III secretion system protein |
| XF37_RS04965 | N/A | IPA&ISA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS04970 | N/A | IPA&ISA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS04975 | N/A | IPA&ISA | <i>epaO</i> | Type III secretion apparatus protein, <i>yscq/hrcq</i> family |
| XF37_RS04985 | N/A | IPA&ISA | <i>epaQ</i> | <i>Escs/yscs/hrcs</i> family type III secretion system export apparatus protein |
| XF37_RS04995 | N/A | IPA&ISA | <i>spaS</i> | <i>Escu/yscu/hrcu</i> family type III secretion system export apparatus switch protein |
| XF37_RS05015 | N/A | IPA&ISA | <i>prgI</i> | Type III secretion system needle complex protein |
| XF37_RS06095 | 2 | IPA | <i>KPK_4437</i> | Site-specific recombinase, phage integrase family |
| XF37_RS06100 | 2 | IPA | <i>KPK_4436</i> | Site-specific recombinase, phage integrase family protein |
| XF37_RS06110 | 2 | IPA | <i>Z3941</i> | Hypothetical protein |
| XF37_RS06115 | 2 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS06215 | 2 | IPA | <i>espm2</i> | Espm2 T3SS effector protein |
| XF37_RS07530 | 3 | N/A | | Hypothetical protein |
| XF37_RS07715 | 3 | N/A | | Hypothetical protein |
| XF37_RS07725 | 3 | N/A | <i>cro_2</i> | Helix-turn-helix domain-containing protein |
| XF37_RS07750 | 3 | N/A | <i>endY</i> | Endy protein |
| XF37_RS07855 | 3 | N/A | | Hypothetical protein |

| | | | | |
|--------------|-----|----------------|----------------------------|---|
| XF37_RS09120 | 4 | IPA | <i>ybcK</i> | Uncharacterized protein ybck |
| XF37_RS09125 | 4 | IPA | <i>ybcL</i> | UPF0098 protein ybcl |
| XF37_RS09205 | 4 | IPA | | DUF826 domain-containing protein |
| XF37_RS09240 | 4 | IPA | <i>ASE93_15395</i> | DUF1441 family protein |
| XF37_RS09265 | 4 | IPA | | DUF2190 family protein |
| XF37_RS09555 | 5 | N/A | <i>ECPG_00708</i> | Hypothetical protein |
| XF37_RS09620 | 5 | IPA | <i>JEONG1266_05895</i> | AAA family atpase |
| XF37_RS09695 | 5 | IPA | <i>V</i> | Phage baseplate assembly protein V |
| XF37_RS09765 | 5 | IPA | <i>NBO_288g0002</i> | Phage tail protein |
| XF37_RS10010 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>wbhA</i> | Glycosyl transferase |
| XF37_RS10015 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>wzy</i> | O-antigen polymerase |
| XF37_RS10020 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>wbdO</i> | Glycosyl transferase |
| XF37_RS10025 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>wzx</i> | O157 family O-antigenflippase |
| XF37_RS10055 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>manC2</i> | Mannose-1-phosphate guanylyltransferase 2 |
| XF37_RS10070 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>perB</i> | GDP-perosamine N-acetyltransferase |
| XF37_RS10415 | 6 | IPA | | DUF826 domain-containing protein |
| XF37_RS10510 | 6 | IPA | | Phage tail assembly chaperone |
| XF37_RS10560 | 6 | IPA | <i>J</i> | Tip attachment protein J |
| XF37_RS10845 | 7 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS10880 | 7 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS10885 | 7 | IPA | | Dtdp-6-deoxy-L-hexose 3-O-methyltransferase |
| XF37_RS10940 | 7 | IPA | <i>Z2107</i> | Membrane protein |
| XF37_RS11005 | 7 | IPA | <i>FP66_04520</i> | Terminase small subunit |
| XF37_RS11585 | 8 | IPA | <i>SA-MEA2273425_01717</i> | DUF2511 domain-containing protein |
| XF37_RS13505 | 9 | IPA | <i>Z2107</i> | Membrane protein |
| XF37_RS13615 | 9 | IPA | | Phage tail |

| | | | | |
|--------------|-----|-----|------------------------------------|--|
| XF37_RS15330 | 10 | N/A | <i>intE</i> | Prophage e14 integrase |
| XF37_RS15365 | 10 | IPA | <i>nleG</i> | T3SS effector E3 ubiquitin-protein ligase nleg |
| XF37_RS15375 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS15420 | 11 | IPA | <i>nleA</i> | Non-LEE-encoded type III effector, nlea |
| XF37_RS15545 | 11 | IPA | | Ylci/ynfo family protein |
| XF37_RS15560 | 11 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS15715 | 11 | IPA | | DUF1482 family protein |
| XF37_RS15730 | 11 | IPA | <i>intE</i> | Prophage e14 integrase |
| XF37_RS16265 | N/A | IPA | <i>ybcY</i> | SAM-dependent methyltransferase |
| XF37_RS16270 | N/A | IPA | <i>yciG</i> | General stress protein |
| XF37_RS16420 | 12 | IPA | <i>bor</i> | Lipoprotein bor |
| XF37_RS16745 | 14 | IPA | <i>mnt</i> | Phage regulatory protein |
| XF37_RS16850 | 14 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS17000 | 14 | IPA | <i>racR</i> | Rac prophage repressor |
| XF37_RS17025 | 14 | IPA | <i>intE</i> | Prophage e14 integrase |
| XF37_RS17550 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS17625 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS17640 | 15 | IPA | <i>fhuE</i> | Iha adhesin |
| XF37_RS17685 | 15 | IPA | <i>carB_2</i> | ATP-grasp domain-containing protein |
| XF37_RS17710 | 15 | IPA | SA- <i>MEA2273122_05</i> 069 | Hypothetical protein |
| XF37_RS17820 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS17825 | N/A | IPA | <i>eptA</i> | Phosphoethanolamine transferase |
| XF37_RS17840 | N/A | IPA | <i>bcgIB</i> | Restriction enzyme subunit beta |
| XF37_RS18025 | N/A | IPA | <i>hifA</i> | Fimbrial protein |
| XF37_RS18030 | N/A | IPA | <i>mrkB</i> | Chaperone protein (Involved in the expression of type III fimbriae) mrkb |
| XF37_RS18060 | N/A | IPA | <i>SFK227_0632</i> | Hypothetical protein |

| | | | | |
|--------------|-----|----------------|------------------|---|
| XF37_RS18485 | N/A | IPA | <i>ybcY</i> | Class I SAM-dependent methyltransferase |
| XF37_RS18490 | N/A | IPA | <i>yciG</i> | Stress-induced bacterial acidophilic repeat motifs-containing protein <i>ycig</i> |
| XF37_RS18670 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS18805 | 17 | IPA | <i>iroE</i> | Alpha/beta hydrolase |
| XF37_RS18900 | 17 | N/A | <i>yccA</i> | Ftsh protease modulator <i>ycca</i> |
| XF37_RS20095 | 18 | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS20110 | 18 | IPA | <i>ECs0817</i> | Hypothetical protein |
| XF37_RS20425 | N/A | ISA, IMET & IR | | Hypothetical protein |
| XF37_RS20450 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>MOC_0568</i> | Putative 3-methylaspartate ammonia-lyase, glutamate mutase |
| XF37_RS20460 | N/A | ISA, IMET & IR | <i>glpP</i> | Proton/glutamate symporter |
| XF37_RS21535 | N/A | IPA, ISA & IR | <i>aatB</i> | Yada family autotransporter adhesin |
| XF37_RS22365 | N/A | ISA & IMET | <i>prpR</i> | Propionate catabolism operon regulatory protein |
| XF37_RS22515 | N/A | IPA & IR | <i>tibA</i> | Putative autotransporter |
| XF37_RS22560 | N/A | IPA & IR | <i>rclC</i> | Inner membrane protein <i>rclc</i> |
| XF37_RS22595 | N/A | IPA & IR | <i>frsA</i> | Alpha/beta hydrolase |
| XF37_RS22600 | N/A | IPA & IR | <i>nerA</i> | NADH-dependent flavin oxidoreductase |
| XF37_RS22640 | N/A | IPA & IR | <i>eprR</i> | ECP biosynthesis operon DNA-binding transcriptional regulator <i>ecpr</i> |
| XF37_RS22655 | N/A | IPA & IR | <i>eprC</i> | Fimbrial usher <i>ecpc</i> |
| XF37_RS22730 | N/A | IPA & IR | | Hypothetical protein |
| XF37_RS22760 | N/A | IPA & IR | <i>EbC_44550</i> | Septation initiation protein |
| XF37_RS22885 | 19 | IPA & IR | | Transcription antitermination protein |
| XF37_RS23080 | N/A | IPA | <i>tssB</i> | Type VI secretion system contractile sheath small subunit <i>tssb</i> |
| XF37_RS23100 | N/A | IPA | <i>tssF</i> | Type VI secretion system baseplate subunit <i>tssf</i> |
| XF37_RS23160 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS23165 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |

| | | | | |
|--------------|-----|-----|------------------------------------|--|
| XF37_RS24620 | N/A | IR | <i>pipB2</i> | Pentapeptide repeat-containing protein |
| XF37_RS24635 | N/A | IR | <i>yeeJ</i> | Hypothetical protein |
| XF37_RS24800 | N/A | IPA | SA- <i>MEA2273397_03</i> 124 | Apolipoprotein A1/A4/E domain |
| XF37_RS24845 | N/A | IPA | | Hypothetical protein |
| XF37_RS26065 | 20 | IPA | | Hypothetical protein |

4.2. Evaluación del perfil de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en diferentes disponibilidades de hierro

Para evaluar los efectos de la biodisponibilidad de hierro en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 Rafaela II se trazaron curvas de crecimiento comparando los cultivos en medio LB (control) y en LB a distintas biodisponibilidades de hierro. Se utilizaron diferentes concentraciones (200 μ M, 250 μ M y 300 μ M) del quelante de hierro BPD para limitar la disponibilidad de este metal en el medio de cultivo. En este ensayo, se pudo observar que, al limitar el hierro en el medio, el perfil de crecimiento de Rafaela II disminuyó significativamente respecto al control (**Figura 14**). Por lo que el hierro es requerido para el correcto crecimiento de la bacteria.

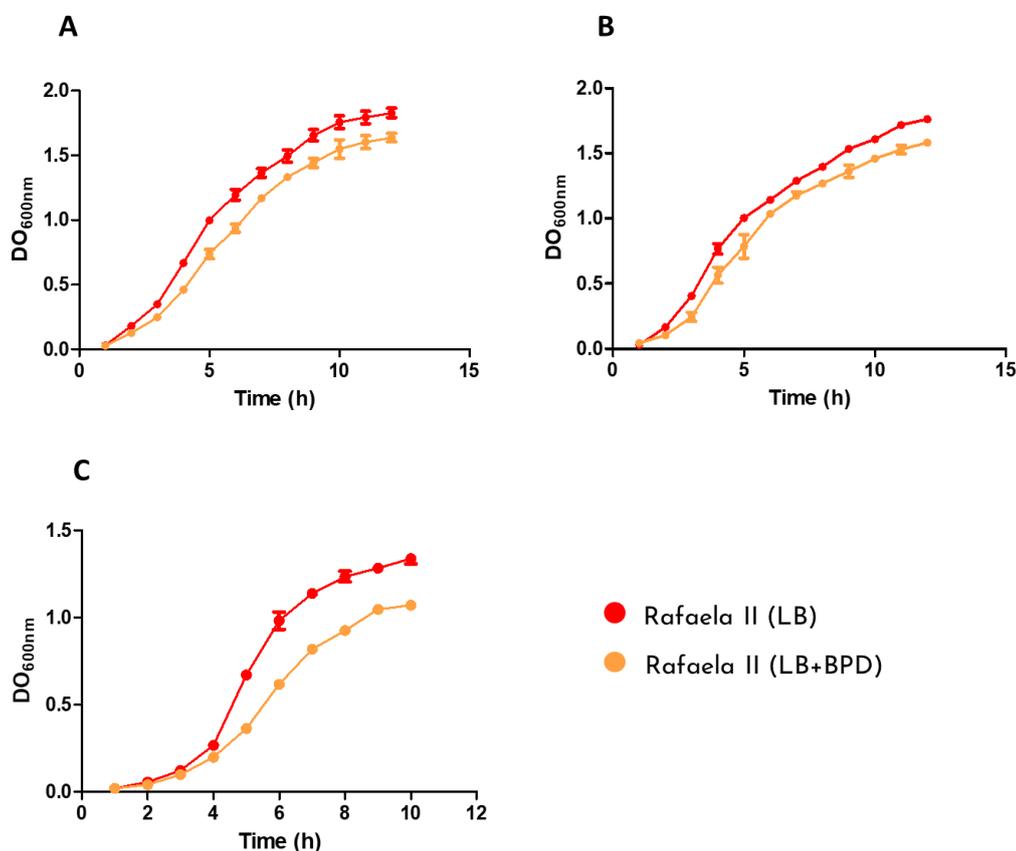


Figura 14: El hierro contribuye para el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Curvas de crecimiento de la cepa Rafaela II en el medio de crecimiento LB y el medio de crecimiento LB suplementado con (A) 200µM, (B) 250µM, (C) 300µM del quelante de hierro BPD.

4.3. Evaluación de la disponibilidad de hierro en la expresión de genes relacionados a la patogénesis de *E. coli* O157:H7

Los genes involucrados en las vías de virulencia y patogenicidad de la bacteria se encuentran en las islas de patogenicidad y el plásmido pO157 que se encuentran presentes en O157:H7 y no en K-12. Como bien fue mencionado, aún hay poca información sobre su regulación, por lo que se procedió a evaluar si la biodisponibilidad del hierro en el medio afecta a la expresión de genes que participan tanto en la virulencia y patogenicidad de la bacteria como en su fisiología general. Para esto se seleccionaron, de los genes predichos en el análisis bioinformático que contienen secuencias *fur*-box en su región promotora, los genes *stcE* (factor

de virulencia) que está ubicado en el plásmido pO157 y *fliC* (gen involucrado en la fisiología bacteriana) para realizar un análisis de expresión génica mediante RT-qPCR de la cepa Rafaela II en un medio LB (rico en hierro) y LB más 300µM de BPD (pobre en hierro).

En este ensayo, se vio que la expresión del gen *stcE* se encuentra regulada por la biodisponibilidad del hierro en el medio, donde fue observado que a mayor biodisponibilidad de hierro menor fue su expresión, mientras que al limitar el hierro en el medio su expresión aumentó significativamente (**Figura 15**). El gen *stcE* codifica para una metaloproteasa codificada en el plásmido pO157 la cual es secretada por el SST2 y es la encargada de escindir el inhibidor de la serina proteasa C1 del sistema de complemento (C1-INH) (Lathem *et al*, 2002). C1-INH, actúa formando un complejo con las proteínas C1 y C1r2s2 haciendo que se disocien de C1q y evitando así la activación de C4 y C2, inhibiendo así el inicio de la vía de complemento tanto clásica como de la lecitina (Owen *et al*, 2014). La bacteria, al secretar StcE y escindir C1-INH, va a inhibir el sistema del complemento del huésped. Con respecto al gen *fliC* que codifica para la flagelina, se vio que su expresión se encuentra aumentada en condiciones repletas de hierro. La flagelina es requerida para la motilidad de *E. coli* O157:H7 cumpliendo un rol importante en su proceso de infección. Además de eso, esta flagelina juega un papel importante en la colonización debido a que forman uniones con las células epiteliales intestinales, contribuyendo para el proceso de adhesión bacteriana (Andreozzi & Uhlich, 2020).

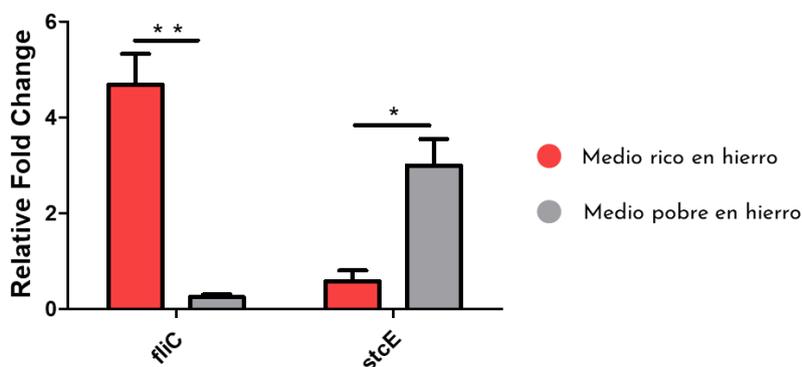


Figura 15: Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR a distintas biodisponibilidades de hierro. RTq-PCR del gen *stcE* y *fliC* de *E. coli* O157:H7 Rafaela II en medio LB y LB +300µM de BPD. *P*-value fue calculado utilizando el *unpaired t-test* seguido por el *welch's correction test*. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0,01

4.4. Generación de la cepa mutante *E. coli* O157:H7 Δfur

Considerando que la homeostasis del hierro en la bacteria es regulada por el regulón *fur*, que en otras bacterias patogénicas se vio que tiene un rol en la patogenicidad de las mismas (sección 1.3.5.), y que en las secciones 4.2 y 4.3 se pudo observar que el hierro tiene un papel en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y en la expresión de genes involucrados en la patogénesis de *E. coli* O157:H7; se procedió a realizar la cepa mutante *E. coli* Rafaela II Δfur para evaluar la participación de *fur* en la patofisiología de la bacteria.

4.4.1. Generación del amplicón para mutagénesis

La reacción de PCR para generar el amplicón que se utilizó para el reemplazo alélico del gen *fur* se llevó a cabo utilizando los cebadores descritos en la Tabla 4 utilizando como templado el plásmido pKD3. A través de este ensayo fue posible amplificar un fragmento de DNA de aproximadamente 1.050 pb que fue visualizado en un gel de agarosa de 0,8% (**Figura 16**). Luego este producto de amplificación fue purificado, cuantificado y resuspendido en agua libre de DNAsa.

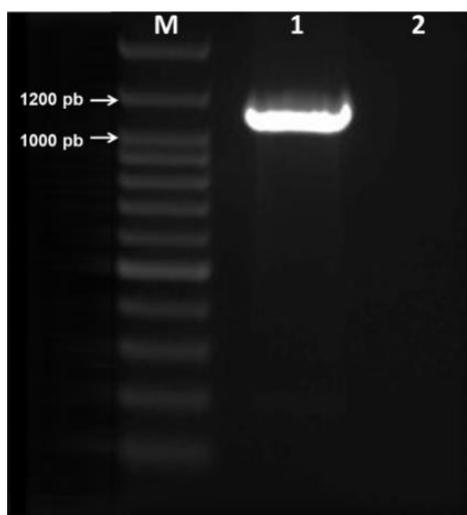


Figura 16: Amplificación del caset de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3. (M) 100bp Plus DNA Ladder; (1) amplificación del caset de resistencia a cloranfenicol con los oligonucleótidos Fw-*fur*-P1 y Rv-*fur*-P2; y (2) control negativo de la reacción de PCR.

4.4.2. Transformación de la cepa *E. coli* O157:H7 pKD46 con el amplicón para mutagénesis

Con el propósito de realizar un *knock-out* del gen *fur* y reemplazar el mismo por un caset de resistencia a cloranfenicol, se indujo el sistema λ Red y se transformó mediante electroporación la cepa Rafaela II R46 con el amplicón para mutagénesis generado en la sección 4.4.1. La mutagénesis fue verificada mediante *colony* PCR utilizando dos sets de oligonucleótidos: rio arriba y rio debajo del gen *fur* (Up-Fur & Down-Fur), y específicos del gen *fur* (Fw-fur & Rv-fur) (Tabla 4) (Figura 17). Teniendo en cuenta que el casete de resistencia a clorafenicol (1.053 pb) es mayor que el gen *fur* (447 pb), se observa en la figura 20 que la amplificación con oligonucleótidos Up-Fur y Down-Fur generó en la cepa Rafaela II salvaje (calle 1) y la cepa Rafaela II Δfur (calle 2), fragmentos de DNA con aproximadamente 800 pb y 1.380 pb respectivaamente. A su vez, en las amplificaciones utilizando los oligonucleótidos específicos de la locación del gen *fur*, podemos ver que en la calle 4 se observa la amplificación del gen *fur*, mientras que en la calle 5 no se observa una amplificación. En conjunto estos resultados muestran que el gen *fur* a sido escindido y reemplazado por el caset de resistencia al cloranfenicol.

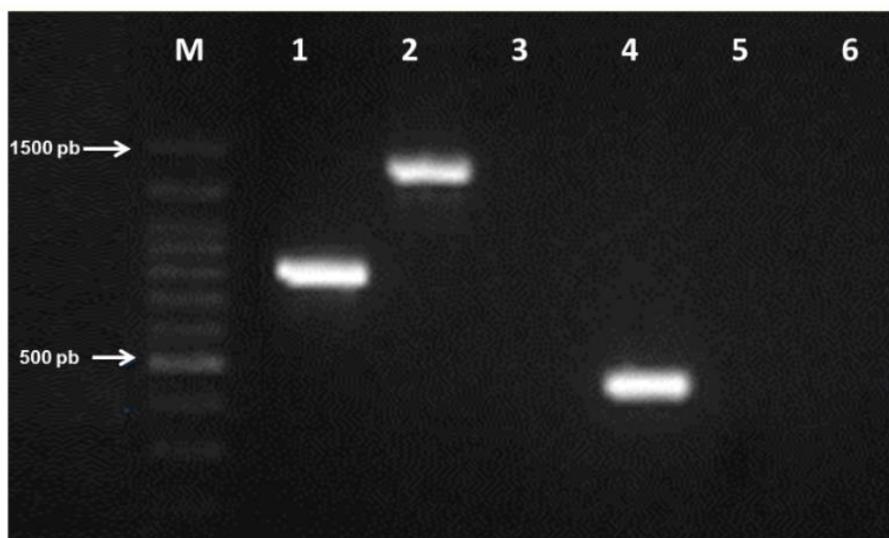


Figura 17: Verificación de la mutagénesis del gen *fur* en *E. coli* Rafaela II. (M) 100bp Plus DNA Ladder; (1) Rafaela II salvaje con oligonucleótidos rio arriba y rio debajo de *fur*; (2) Rafaela II Δfur con oligonucleótidos rio

arriba y río debajo de *fur*; (3) control negativo con oligonucleótidos río arriba y río debajo de *fur*; (4) Rafaela II salvaje con oligonucleótidos específicos de *fur*; (5) Rafaela II Δfur con oligonucleótidos específicos de *fur*; y (6) control negativo con oligonucleótidos específicos de *fur*.

4.5. Complementación de la cepa mutante Δfur

La complementación de la cepa mutante con el gen *fur* fue realizada en dos etapas. Primero la amplificación de la región intergénica entre el gen *fldA* y *fur* más el gen *fur* (inter-*fur*), y su clonado en el vector pGEM-T *easy*. Luego, la realización de un subclonado de la región inter-*fur* en el vector pLF y la transformación mediante electroporación de la cepa Rafaela II Δfur con la construcción generada.

4.5.1. Generación del inserto inter-*fur*

Para amplificar la región inter-*fur* (*fur* más su región promotora), primero se localizó la secuencia de *fur* y la región intergénica entre *fur* y *fldA* (gen río arriba de *fur*) mediante el programa Artemis (Carver T, 2012) (**Figura 18A**). La secuencia intergénica con 287 pb fue sometida a un análisis de predicción de regiones promotoras utilizando el programa BPROM de la plataforma Softberry. De acuerdo con este análisis *in silico*, fue detectado la secuencia ATAATGAT que corresponde a la región promotora Fur-Box (**Figura 18B**). En la figura 18C vemos la secuencia completa del espacio intergénico entre el gen *fldA* y *fur*, además de la secuencia Fur-box.



Figura 18: Identificación de la región promotora de *fur*. (A) identificación de la región intergénica entre *fur* y *fda* + *fur* (región amarilla) mediante el programa Artemis; (B) predicción de la región promotora mediante el programa Softberry; y (C) secuencia de la región intergénica (naranja), el promotor predicho (rojo) y el gen *fur* (azul).

Luego se diseñaron los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR (**Tabla 4**) para la posterior amplificación de inter-*fur*. Se realizó una reacción de PCR utilizando los primers mencionados y el DNA genómico de la cepa Rafaela II como templado. El producto de amplificación fue cuantificado y analizado en un gel de agarosa el 0,8% (**Figura 19**). En la calle 1 se observan bandas tenues correspondientes a amplificaciones inespecíficas y una banda de mayor intensidad de aproximadamente 734 pb correspondiente a inter-*fur*. El fragmento de mayor intensidad fue purificado y cuantificado.

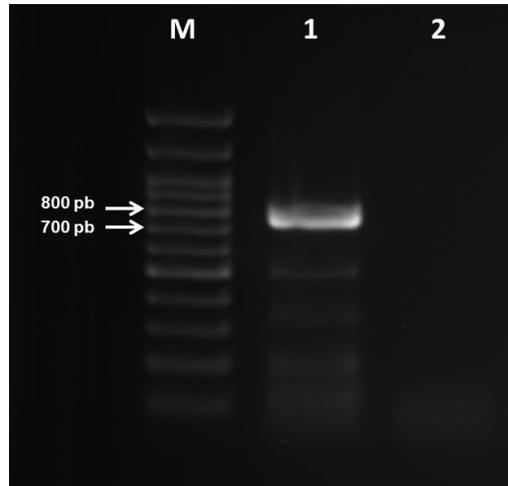


Figura 19. Amplificación del gen *fur* + su región promotora por PCR. (M) 100bp Plus DNA Ladder (1) amplificación con los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR; (2) Control de la reacción de PCR sin templado utilizando los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR.

4.5.2. Generación del plásmido pGfurC

El producto de amplificación fue purificado, cuantificado y clonado en el vector pGEM-T easy obteniendo así el plásmido pGfurC. Luego, el plásmido pGfurC fue transformado en la cepa DH5 α y secuenciado. Los resultados obtenidos mediante el ensayo de secuenciación mostraron que el fragmento clonado en el vector pGEM-T corresponde a la región *inter-fur*.

Tras la transformación se obtuvieron 8 clones positivos. Se realizó una purificación del plásmido pGfurC y se confirmó la integridad del inserto *inter-fur* mediante PCR con los oligonucleótidos Fw-FurCF y SP6. Del total de los clones, solo en el clon 4 (calle 4) se observó una banda correspondiente a la esperada de 734 pb de la secuencia *inter-fur* (**Figura 20**). A través de la secuenciación del pGfurC extraído del clon 4 pudimos verificar la integridad del inserto *inter-fur* clonado en el vector pGEM-T easy.



Figura 20: Verificación por PCR del clonado de *inter-fur* en pGEM-T easy. (M) 100bp Plus DNA Ladder (1-8) amplificación con oligonucleótidos Fw-FurCF y SP6 de los clones 1 a 8.

4.5.3. Generación del plásmido pLF_{furC} y transformación de la cepa tipo mutante de *E. coli* O157:H7 Δfur

En la segunda etapa se realizó un subclonado de *inter-fur* en el vector pLF. Para llevarlo a cabo, se realizó la digestión del plásmido pG_{furC} y el vector pLF con las enzimas de restricción BamHI y SpeI (**Figura 21**). Los resultados de la digestión fueron purificados, cuantificados y ligados obteniendo así la construcción pLF_{furC}.

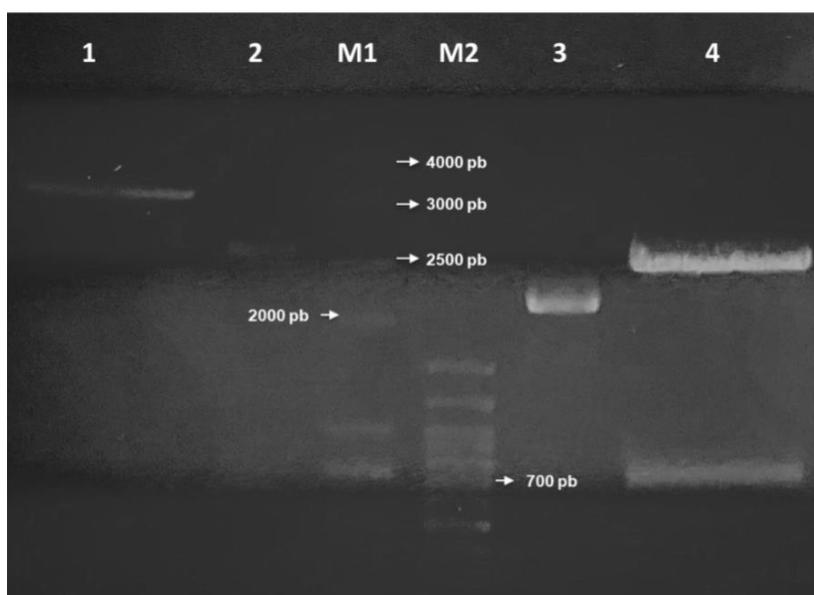


Figura 21: Digestión de del plásmido pG_{furC} y el vector pLF. (1) vector pLF digerido; (2) vector pLF sin digerir; (M1) 1000bp Plus DNA Ladder; (M2) 100bp Plus DNA Ladder; pG_{furC} sin digerir; y (3) pG_{furC} digerido.

El plásmido pLF_{furC} fue transformado en la cepa DH5 α y se obtuvieron 20 colonias. Se seleccionaron 5 colonias para la realización de una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR. En las calles 1 a 5 podemos observar la amplificación del inserto *inter-fur* correspondientes a la banda esperada de 734 pb (**Figura 22**).

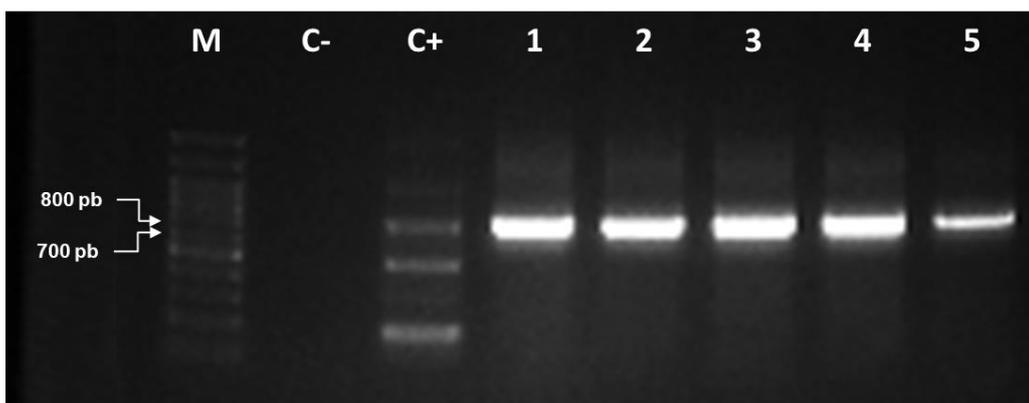


Figura 22: Verificación por PCR del clonado de *inter-fur* en pLF. (M) 100bp Plus DNA Ladder; (C-) control negativo; (C+) control positivo; (1-5) amplificación con oligonucleótidos Fw-FurCF y Rv-FurCR de los clones 1 a 5.

Una vez obtenido el plásmido pLF_{furC}, se procedió a transformar la cepa Δfur para obtener así la cepa mutante complementada con la secuencia *inter-fur*. La mutante fue transformada mediante electroporación y los clones positivos fueron seleccionados en placas de LB suplementado con Ampicilina 100 μ M.

4.6. Evaluación del perfil de crecimiento de *E. coli* O157:H7 Δfur , $\Delta fur/pFurC$ y $\Delta fur/pLF$ en diferentes biodisponibilidades de hierro

Ya fue observado que la biodisponibilidad de hierro afecta al crecimiento de la cepa *E. coli* O157:H7 Rafaela II, por lo que se propuso observar a través del perfil de crecimiento de las cepas mutantes de *E. coli* O157:H7 (Δfur , $\Delta fur/pFurC$ y $\Delta fur/pLF$) si *fur* también cumple un rol en el crecimiento de la bacteria. Para esto, se trazaron curvas de crecimiento de las cuatro cepas comparando los cultivos en medio LB (control) y en LB+ 300 μ M del quelante de hierro BPD para limitar la disponibilidad de este metal en el medio de cultivo (**Figura 23**).

En este ensayo se pudo observar que tanto la mutación del gen *fur*, como la limitación de biodisponibilidad de hierro en el medio, afectó el perfil de crecimiento de *E. coli* O157:H7 debido a que al limitar el hierro en el medio se vio una disminución de la curva de crecimiento en las cuatro cepas. A su vez, la mutante Δfur tuvo un crecimiento menor que la cepa Rafaela II en todas las condiciones, el decrecimiento se vio restablecido al complementar la mutante con el gen *fur* ($\Delta fur/pFurC$). Por otro lado, el ensayo fue realizado con la cepa $\Delta fur/pLF$ la cual cuenta con el vector pLF sin el inserto *inter-fur* para comprobar que este no esté afectando al crecimiento. En los resultados se pudo observar que el vector pLF no interfiere en el crecimiento bacteriano.

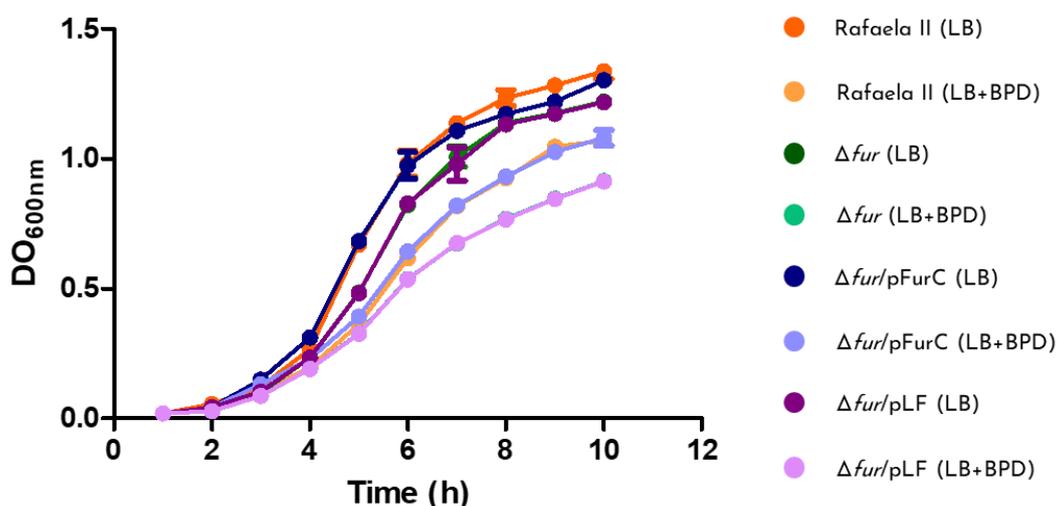


Figura 23: Análisis del perfil de crecimiento de *E. coli* O157:H7 y la cepa isogénica Δfur . Curvas de crecimiento de las cepas Rafaela II (salvaje), Δfur , $\Delta fur/pFurC$ y $\Delta fur/pLF$ ante el medio de crecimiento LB y el medio de crecimiento LB suplementado con 300 μ M de BPD.

4.7. Análisis proteómico comparativo cuantitativo

Para evaluar los efectos del *knock-out* del gen *fur* y la biodisponibilidad de hierro en el proteoma de *E. coli* O157:H7, se realizó un análisis proteómico comparativo cuantitativo mediante la estrategia de marcación TMT, a partir del lisado bacteriano total. Primeramente, las muestras proteicas obtenidas a partir del cultivo de *E. coli* O157:H7 Rafaela II salvaje

crecida en medio LB y LB + 300 μ M de BPD, y *E. coli* O157:H7 Δfur crecida en medio LB fueron sembradas en un gel SDS-Page al 12% para verificar la integridad de estas (**Figura 24**).

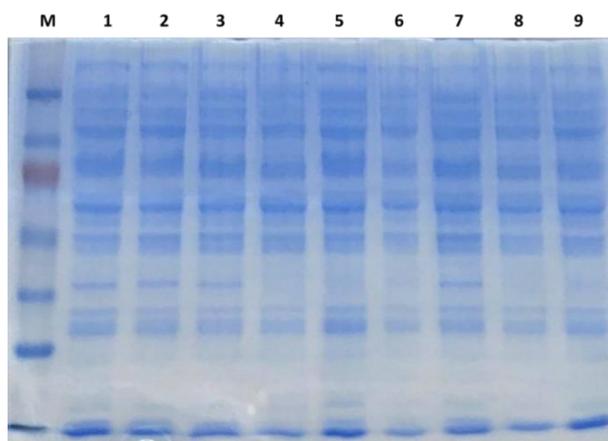


Figura 24: Verificación de la integridad de las extracciones proteicas mediante SDS-Page 12%. (M) Blue Plus® ProteinMarker (14-100 kDa); (1, 2 y 3) cepa salvaje en medio LB; (4, 5 y 6) cepa salvaje en medio LB + 300 μ M de BPD; y (7, 8 y 9) cepa Δfur .

Luego, de verificar la calidad de las muestras proteicas, las mismas fueron digeridas con tripsina, marcadas con isotopos estables utilizando el kit TMT-16Plex (Thermo Fisher) y sometidas a un análisis por espectrometría de masas. En este análisis proteómico comparativo entre Rafaela II crecida en condiciones ricas en hierro (LB) y pobre en hierro (LB+BPD), como entre Rafaela II y su mutante isogénica Δfur fueron identificadas el 46,12% (2725/5908) del total de proteínas predichas en el genoma de *E. coli* O157:H7. Todas las proteínas identificadas superaron el filtro de *False Discovery Rate* (FDR) del 1%. Las proteínas que presentaron un valor de $p < 0,05$ según Test Mann Whitney y un *fold change* $\log_2 > 1,2$ (equivalente a 2,3) fueron consideradas con una expresión diferencial estadísticamente significativa.

A partir de estos criterios, un total de 371 proteínas presentaron una expresión diferencial estadísticamente significativo entre Rafaela II crecida en LB+BPD y LB; del total de proteínas expresadas diferencialmente, 166 fueron más abundantes y 205 fueron menos abundantes en la condición LB + BPD respecto a LB. Por otro lado, 266 proteínas presentaron una expresión diferencial entre Δfur y Rafaela II (**Figura 25**); del total, 197 fueron más abundantes y 169 fueron menos abundantes en la cepa Δfur respecto a Rafaela II (**Figura 25**).

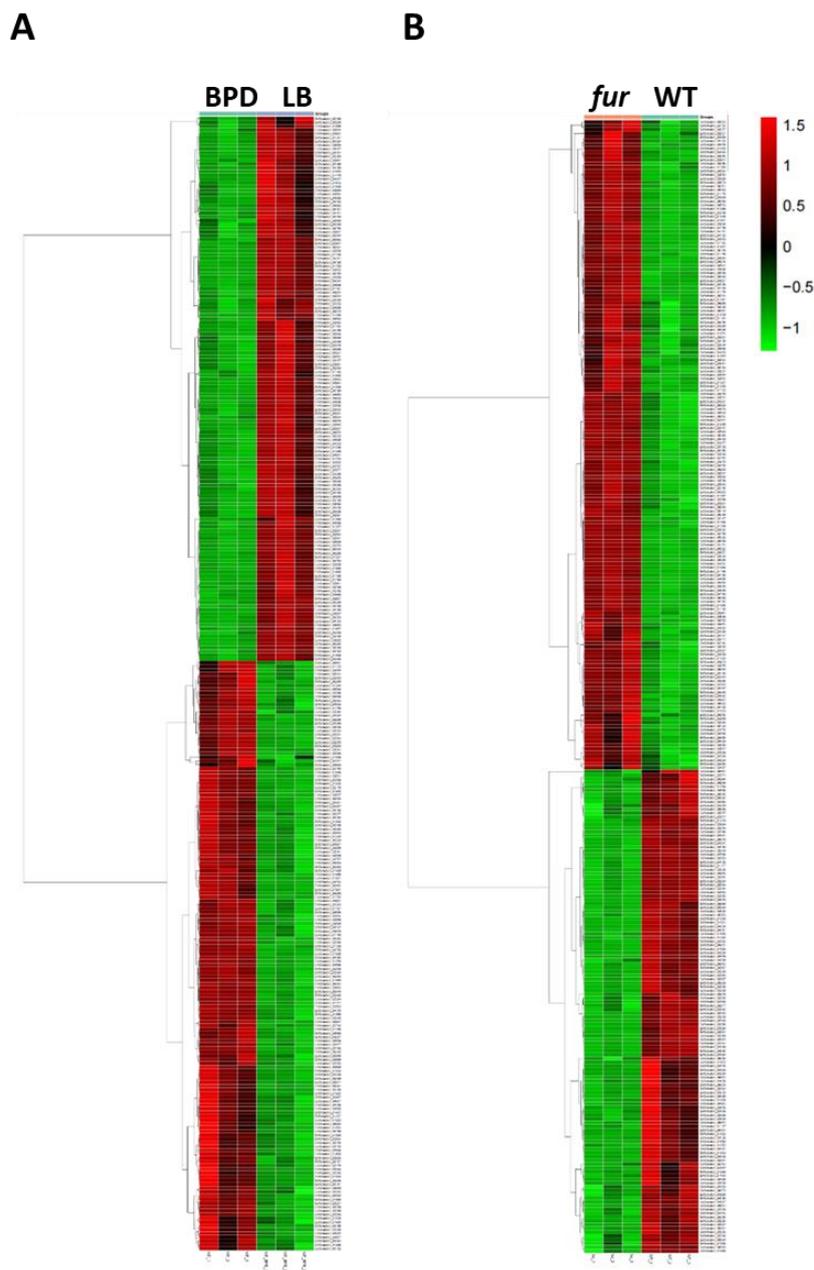


Figura 25: Análisis de expresión diferencial por HeatmapsPlot top 300. (A) Rafaela II salvaje en medio LB + 300 μM BPD y salvaje en medio LB por triplicado; **(B)** Rafaela II Δfur y salvaje en medio LB por triplicado.

A su vez, al comparar las proteínas expresadas diferencialmente en Rafaela II LB + BPD versus LB, y Δfur versus Rafaela II (salvaje), se observó que 269 proteínas fueron expresadas diferencialmente de igual manera en ambos experimentos, 102 proteínas fueron

exclusivas del experimento Rafaela II LB + BPD versus LB y 97 proteínas diferencias fueron exclusivas de Δfur versus Rafaela II (**Figura 26**). Esto se debe a que la cepa mutante y la condición de la cepa salvaje + BPD se comportan de manera similar dado a que al limitar el hierro en el medio Fur se encuentra en su conformación inactiva semejándose a la cepa mutante en donde Fur no se encuentra presente.

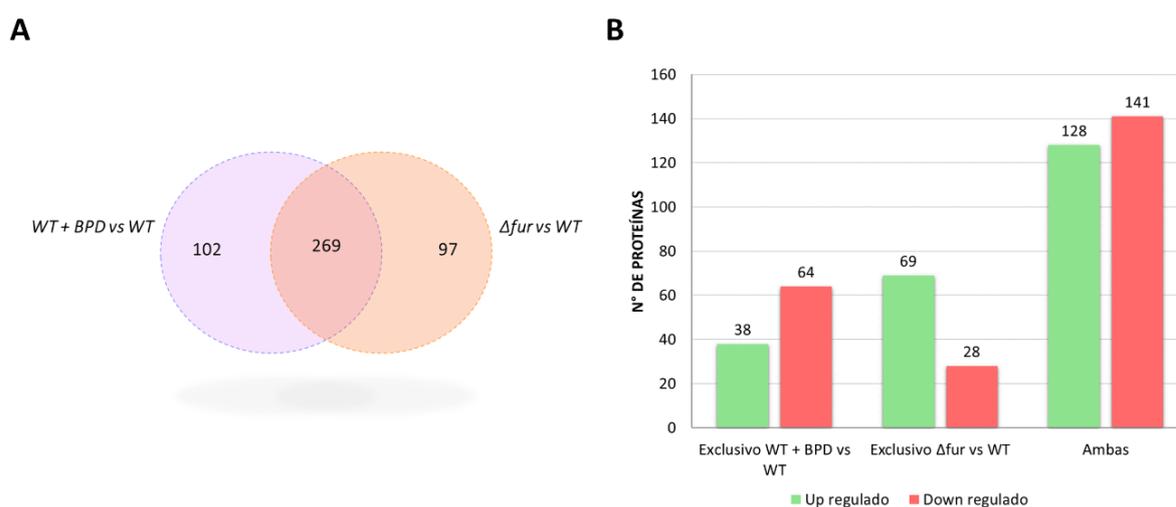


Figura 26: Análisis comparativo entre las proteínas diferencialmente reguladas entre los dos ensayos experimentales Rafaela II LB+PBD vs LB y Δfur vs Rafaela II (salvaje). (A) diagrama de venn muestra la distribución de las proteínas diferencialmente reguladas entre Rafaela II LB+PBD vs LB y Δfur vs Rafaela II (salvaje); (B) representación del número de proteínas más o menos abundante que fueron detectadas en ambos experimentos o exclusivo de cada condición experimental. Verde = número de proteínas más abundantes rojo = proteínas menos abundantes.

Para poder identificar a qué procesos biológicos podrían estar involucradas las proteínas que fueron diferencialmente reguladas en ambas condiciones experimentales, se realizó una anotación funcional de estas proteínas. Esta predicción fue realizada utilizando Blast2Go (Conesa *et al*, 2005) y el análisis de enriquecimiento fue hecho con el programa GOATOOLS (Klopfenstein *et al*, 2018).

Al limitar la biodisponibilidad de hierro de la cepa Rafaela II se observó que, entre los procesos biológicos más enriquecidos listados en la figura 27, se encuentran procesos involucrados en el proceso de patogénesis de *E. coli* O157:H7 como: la respuesta al estrés, movimiento celular, respuesta a estímulos y transporte. Por lo tanto, en este análisis se ve que,

al exponer a la bacteria en una condición de estrés nutricional por la limitación de hierro en el medio, las proteínas que se encuentran asociadas a procesos biológicos ligados a la virulencia y patogenicidad de la bacteria se vieron estadísticamente sobreexpresadas a diferencia de su condición control. Al comparar los procesos biológicos relacionados con las proteínas que fueron sobreexpresadas en la cepa mutante Δfur a diferencia de Rafaela II, observamos que 13 de 15 vías enriquecidas fueron las mismas que en la condición Rafaela II en LB + BPD vs LB (Figura 28).

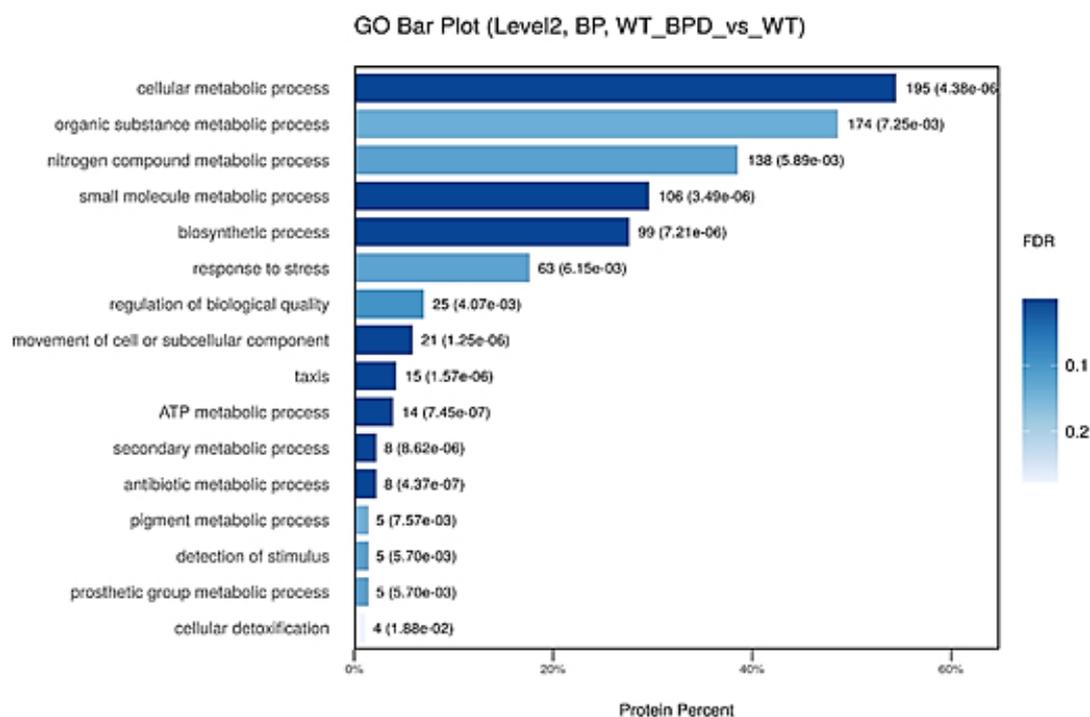


Figura 27: Análisis de enriquecimiento de términos GO de las proteínas diferencialmente expresadas en *E. coli* O157:H7 Rafaela II LB+BPD vs LB.

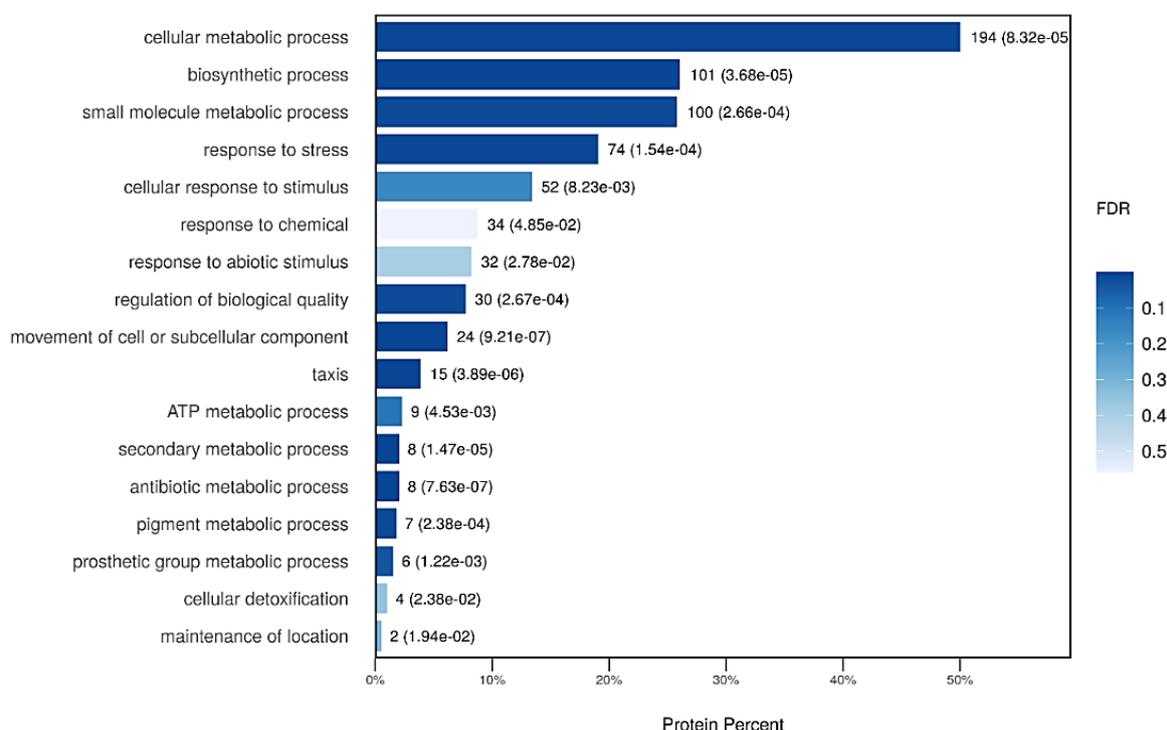


Figura 28: Análisis de enriquecimiento de términos GO de las proteínas diferencialmente expresadas en *E. coli* O157:H7 Rafaela II Δfur vs Rafaela II.

La semejanza de estos resultados se debe a que del total de las proteínas sobreexpresadas en la condición Rafaela II en LB + BPD y en Δfur , un 76,25% y un 70,36% de estas respectivamente, fueron las mismas proteínas por lo que los mismos procesos se vieron promovidos en ambas condiciones. Igualmente, también se observaron vías que no fueron enriquecidas en ambos análisis comparativos. Entre las vías enriquecidas diferencialmente, en el análisis comparativo entre Rafaela II en LB + BPD vs LB, se encuentra el proceso metabólico de sustancias orgánicas, de compuestos nitrogenados y la detección de estímulos; mientras que entre en Δfur vs Rafaela II se encontraron enriquecidas la respuesta a estímulos generada por antibióticos y el mantenimiento de la localización.

El análisis de predicción de secuencias fur-box en regiones promotoras y de anotación estructural para predecir la locación de genes en fagos o islas genómicas como descriptos en la sección 4.1 también fue realizado en las proteínas expresadas diferencialmente (Anexo II). Del total de proteínas expresadas diferencialmente en Rafaela II en LB + BPD vs LB, 40 de ellas

cuentan con una secuencia *fur*-box en su región promotora de las cuales solo 1 de ellas se encuentra localizada en un fago parte de una isla de patogenicidad, y en total 3 de ellas se encuentran en islas de patogenicidad. En cuanto a las proteínas expresadas diferencialmente en Δfur vs Rafaela II, 39 de ellas cuentan con la secuencia *fur*-box en su región promotora de las cuales 3 de ellas se encuentran localizadas en fagos que forman parte de una isla de patogenicidad, y solo una de ellas se encuentra localizada en una isla genómica considerada isla simbiótica, metabólica y de resistencia.

4.8. El gen *fur* contribuye a la adhesión de *E. coli* O157:H7 a células epiteliales

La adherencia es el primer paso de la infección de EHEC. La importancia de este paso reside en que (1) la adherencia es el primer contacto entre las bacterias y las células intestinales, sin esta los otros pasos no pueden ocurrir, y (2) la adherencia es la base de la especificidad del huésped para muchos patógenos (Bardiau, 2010). La adhesión a las células epiteliales está dada por la participación de distintos tipos de adhesinas, y su expresión puede ser alterada por las distintas señales ambientales como la concentración de hierro, epinefrina y norepinefrina (Bansal *et al*, 2007), bicarbonato (Abe *et al*, 2002), magnesio (Liu *et al*, 2020), y ante la respuesta inflamatoria del huésped (Xue *et al*, 2014). En el presente estudio se demostró que el gen *fur* está involucrado en la capacidad de *E. coli* O157:H7 a adherirse a células epiteliales HCT-8. En este ensayo se observó que al escindir el gen *fur*, la adhesión a las células epiteliales disminuyó significativamente a diferencia de la cepa Rafaela II. A su vez, al complementar la cepa mutante con el gen *fur*, la adhesión a las células epiteliales se recompuso obteniendo así resultados similares a la cepa salvaje (**Figura 29**).

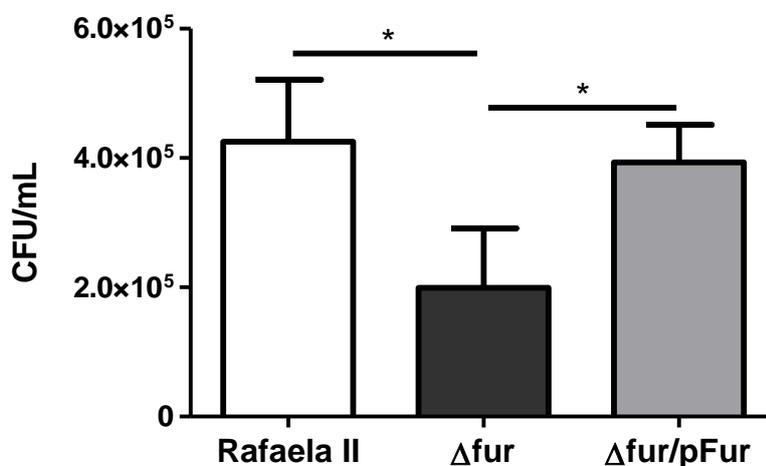


Figura 29: El gen *fur* está involucrado en el proceso de adhesión de *E. coli* O157:H7 a células intestinales epiteliales. Recuento de las UFC/mL de Rafaela II (salvaje), Δfur y $\Delta fur/pFurC$ luego de la lisis de las células epiteliales con Triton X-100 0.15% a las 4 h post-infección. La significancia estadística se determinó mediante One-way ANOVA, seguido del Tukey's Multiple Comparison Test. *, $p < 0,05$.

Para ampliar nuestro conocimiento acerca de la relación de *fur* con el proceso de adhesión de *E. coli* O157:H7 se realizó una correlación entre los datos obtenidos con PRODORIC (sección 4.1.1) y el análisis proteómico (sección 4.7.). En el análisis por PRODORIC se predijo que 5 de las adhesinas codificadas por *iha*, *ecpR*, *ecpC*, *fimA* y *lpfA2* cuentan con la secuencia *fur*-box en su región promotora. En el análisis proteómico las siguientes adhesinas FimA, FimC y FimD, fueron menos abundante en la cepa Rafaela crecida en medio LB + 300 μ M de BPD y en la cepa Δfur al compararlas con la cepa Rafaela II crecida en medio LB. Por otro lado, IrdA (codificado por *iha*) fue expresado diferencialmente únicamente en la cepa Δfur al compararla con la cepa Rafaela II crecida en medio LB donde mostró una sobreexpresión.

Estos análisis, sugieren que FimA podría ser regulado directamente de manera positiva por Fur dado a que esta proteína fue menos abundante en el análisis proteómico tanto al escindir el gen *fur* como al limitar el hierro en el medio (Fur se encuentra en su conformación inactiva), además el análisis *in silico* se predijo que cuenta con una secuencia *fur*-box en su promotor. Entre los genes predichos con secuencia *fur*-box en sus promotores se encuentra el gen *lpfA2*,

este resultado coincide con otros estudios realizados en donde fue observado que Fur interactúa directamente con la región fur-box presente en el promotor del gen *lpfA2* (Arenas-Hernández *et al*, 2014). A su vez, también se redijo una secuencia fur-box en *iha*, el cual en el análisis proteómico presentó una sobreexpresión de IrgA ante la ausencia de *fur*, este resultado coincide con los estudios realizados por Rashid *et al*, 2006 donde se probó que Fur es un regulador negativo del gen *iha*. Por otro lado, no se predijeron secuencias fur-box en los promotores de los genes *fimC* y *fimD* identificados que obtuvieron una expresión diferencial menos abundante por lo que estos podrían estar siendo regulados negativamente de manera indirecta por *fur*.

Si bien no todas las adhesinas de *E. coli* O157:H7 fueron identificadas en el análisis proteómico y no todas las identificadas presentaron una expresión diferencial, los resultados obtenidos en la predicción realizada por PRODORIC y la menor expresión de *fimA*, *fimC* y *fimD* observada en el análisis proteómico se complementan con los resultados obtenidos en el análisis funcional en donde ante la ausencia del gen *fur* hubo una disminución de la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las células epiteliales. Estos resultados indican la participación del gen *fur* como un regulador positivo de la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las células epiteliales. Curiosamente, en otras bacterias patogénicas como *E. coli* uropatógena se a observado que al escindir el gen *fur* tanto la adhesión a células epiteliales como la expresión de las fimbrias de tipo I (*fimA*, *fimH*, *flhD*, *fliA* y *fliC*) se vio aumentada mostrando que en *E. coli* uropatógena *fur* se comporta como un regulador negativo de la adhesión a células epiteliales (Kurabayashi *et al*, 2016).

4.9. El gen *fur* contribuye a la supervivencia de *E. coli* O157:H7 a los macrófagos

Durante el proceso de infección por EHEC, se observa una fuerte respuesta inflamatoria por parte del huésped, y se ha demostrado previamente que las citocinas producidas por los macrófagos infectados contribuyen una respuesta inflamatoria grave asociada con el síndrome urémico hemolítico (van de Kar *et al*, 1992). En el presente trabajo se propuso evaluar la relación de *fur* con la supervivencia de *E. coli* O157:H7 luego de ser fagocitadas por los

macrófagos. Para ello, un cultivo de células de macrófagos murinos RAW264.7 fue infectado con las cepas Rafaela II, Δfur y $\Delta fur/pFurC$. A través del recuento de UFC/ml, se observó que la mutación del gen *fur* afectó significativamente la capacidad de la cepa bacteriana en resistir la acción de los macrófagos teniendo un decrecimiento significativo luego las 24 horas post-infección, mientras que la cepa $\Delta fur/pFurC$ tuvo un comportamiento similar a la salvaje (Figura 30).

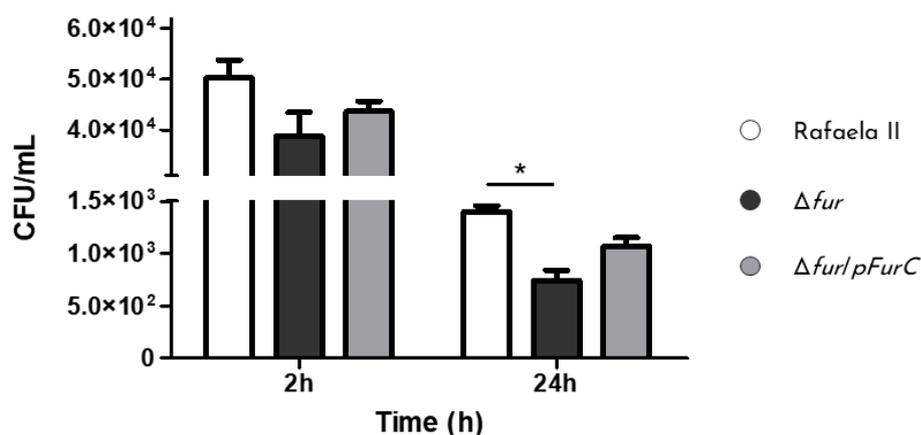


Figura 30: Supervivencia de la *E. coli* O157:H7 luego la incubación con macrófagos. Recuento de las UFC/mL de Rafaela II (salvaje), Δfur y $\Delta fur/pFurC$ luego de la lisis de los macrófagos con Tritón X-100 0.15% a las 2 y 24 hs post-infección. La significancia estadística se determinó mediante One-way ANOVA, seguido del Tukey's Multiple Comparison Test. *, $p < 0,05$.

Hasta el momento hay poca información sobre la interacción entre *E. coli* O157:H7 y los macrófagos. Igualmente, se ha observado que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir a la fagocitosis de los macrófagos humanos. Los mecanismos de supervivencia de la bacteria ante al ataque de los macrófagos identificados son: respuesta SOS al daño del ADN, resistencia al estrés oxidativo, regulación acida intracelular, resistencia al estrés ácido (Poirier K. *et al*, 2008). Entre los 24 genes conocidos hasta el momento que se encuentran involucrados en estos mecanismos de supervivencia descritos por Poirier *et al*, 2008, se predijo mediante PRODOROC (sección 4.1.1.) que 6 de ellos contienen secuencias fur-box en su región promotora. Por otro lado, 12 de ellos fueron identificados en el análisis proteómico, pero solo 3 mostraron una expresión diferencial en la cepa Rafaela II crecida en medio LB + 300 μ M de

BPD y la cepa Δfur a comparación de la cepa Rafaela II crecida en medio LB. Se vio que HmpA, el cual participa en la resistencia al estrés oxidativo, disminuyó su expresión tanto en la condición salvaje en LB + BPD como en la mutante Δfur por lo que se puede considerar que este se encuentra regulado negativamente de manera directa por Fur. En cuanto a las proteínas Zwf (participa en la resistencia al estrés oxidativo) y HdeA (participa en la resistencia al estrés ácido), se vio un aumento de su expresión solo en la condición Rafaela II en LB+BPD mientras que en la mutante no se observó una expresión diferencial significativa al compararla con la cepa Rafaela II en medio LB. A diferencia de Zwf, HdeA se vio sobreexpresado en la cepa mutante pero no en la condición salvaje en LB + BPD. Teniendo en cuenta que *hmpA*, *zwf* y *hdeA* no cuentan con la secuencia *fur*-box en su región promotora según la predicción realizada por PRODORIC, podemos concluir que los mismos están siendo regulados indirectamente por Fur y la concentración de hierro intracelular.

Dado a que se predijo que genes involucrados en la supervivencia de *E. coli* O157:H7 al ataque de los macrófagos cuentan con secuencias *fur*-box en su región promotora y que en el ensayo funcional se observó que ante la ausencia del gen *fur* la supervivencia de la bacteria disminuyó significativamente, *fur* es un regulador necesario para la supervivencia de la bacteria al ataque de los macrófagos. Contradictoriamente, los 3 genes que mostraron una expresión diferencial de los 12 identificados, mostraron un aumento de su expresión cuando Fur se encontraba ausente o inactivo.

4.10. Evaluación del rol de *fur* en la resistencia de *E. coli* O157:H7 al estrés ácido

Como fue mencionado previamente, cuando *E. coli* O157:H7 infecta al humano o el bovino, esta va a recorrer el tracto digestivo hasta su sitio de colonización sufriendo distintos tipos de estrés. Entre ellos podemos citar el estrés ácido producido por la acidez gástrica, los ácidos grasos volátiles producidos como resultado de la fermentación en el intestino y en el fagolisosoma de los macrófagos cuando la bacteria es fagocitada.

Para aportar conocimiento a respecto del proceso de resistencia al estrés ácido de este patógeno en el presente estudio evaluamos si el gen *fur* puede estar relacionado a este proceso.

Para eso, se realizó una exposición de las cepas Rafaela II, Δfur y $\Delta fur/pFurC$ a un medio LB ácido a un pH de 2,5 y 4,5. Al analizar el porcentaje de supervivencia bacteriano comparando las UFC/ml del tiempo cero con las UFC/ml post-incubación se observó que a un pH de 4,5 la mutante Δfur tuvo un 30,73% de supervivencia mayor que Rafaela II (**Figura 31**).

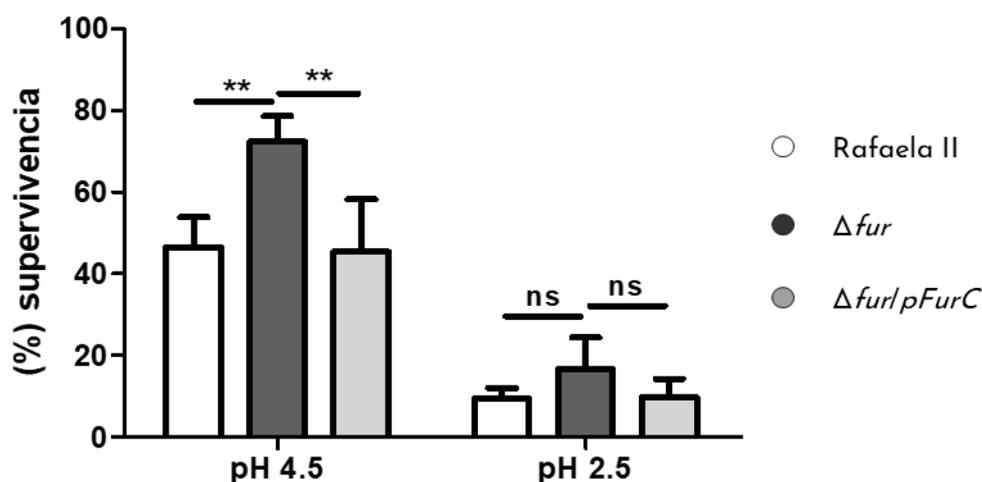


Figura 31: Supervivencia de la *E. coli* O157:H7 al estrés ácido. Análisis porcentual de la supervivencia de las cepas Rafaela II (salvaje), Δfur y $\Delta fur/pFurC$ luego de su incubación en medio LB ácido a pH 2.5 y 4.5. La significancia estadística se determinó mediante Two-way ANOVA, seguido del Bonferroni post hoc tests. **, $p < 0,01$., ns, no significativo.

En los distintos mecanismos de supervivencia al estrés ácido con los que cuenta *E. coli* O157:H7 participan 17 genes conocido hasta el momento que cuentan con una relación directa a estas funciones, sin embargo, en un análisis de expresión génica se observó un aumento de expresión de genes que se encuentran involucrados en vías no relacionadas a la resistencia al estrés ácido (Arnold *et al*, 2001). En cuanto a los genes relacionados directamente con los mecanismos de supervivencia al estrés ácido, solo en los promotores de *gadA*, *gadB* y *gadX* que son parte del sistema AR 3 (dependiente de arginina) (Castanie-Cornet *et al*, 1999) se reconocieron secuencias fur-box mediante PRODORIC (sección 4.1.1.). Curiosamente, no se identificaron secuencias fur-box en los promotores de las ureasas descritas en Heimer *et al*, 2002 donde se comprobó que Fur interactúa directamente en las regiones promotoras de *ureD* y *ureA* regulándolas positivamente promoviendo su expresión.

A través del análisis proteómico se identificaron 7 de los genes que participan en la supervivencia del estrés ácido. A pesar de que se predijeron regiones fur-box en los promotores de *gadA* y *gadB*, no se observó una expresión diferencial de GadA y GadB al escindir el gen *fur* o inactivar la proteína Fur mediante la limitación de hierro en el medio. Por otro lado, se observó una sobreexpresión de la proteína HdeA ante la ausencia de *fur*, mientras que al limitar la biodisponibilidad de hierro de la cepa Rafaela no se observó una diferencia de expresión significativa (**Tabla 9**). Esto puede deberse a una regulación indirecta de *fur*.

Tabla 9. Genes de *E. coli* O157:H7 involucrados en la supervivencia al estrés ácido.

| Gen | Predicción de secuencia fur-box | Análisis proteómico |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <i>cysB</i> | No | No hubo expresión diferencial |
| <i>hdeA</i> | No | Más abundante en Δfur |
| <i>hdeB</i> | No | No hubo expresión diferencial |
| <i>hdeD</i> | No | No hubo expresión diferencial |
| <i>cfa</i> | No | No hubo expresión diferencial |
| <i>gadA</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>gadB</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>gadX</i> | Sí | No identificado |

Teniendo en cuenta que al realizar un *knock-out* del gen *fur* el porcentaje de supervivencia al estrés ácido aumentó significativamente, y que las proteínas identificadas en el análisis proteómico HdeA presentó una expresión diferencial en donde su expresión aumentó ante la ausencia de *fur*, podemos considerar que *fur* está regulando negativamente de forma indirecta genes relacionados con las vías de resistencia al estrés ácido.

4.11. Evaluación del rol de *fur* en la motilidad de *E. coli* O157:H7

Dado a que la motilidad bacteriana cumple gran diversidad de roles en el proceso de patogénesis como: la búsqueda de un entorno óptimo en el huésped, la colonización e invasión y la permanencia en el sitio de infección, en este trabajo, se estudió la participación de *fur* en la

motilidad de *E. coli* O157:H7 en un medio de cultivo de agar blando al 0,3% en donde la motilidad de la bacteria disminuyó significativamente ante la ausencia del gen *fur* (Figura 32).

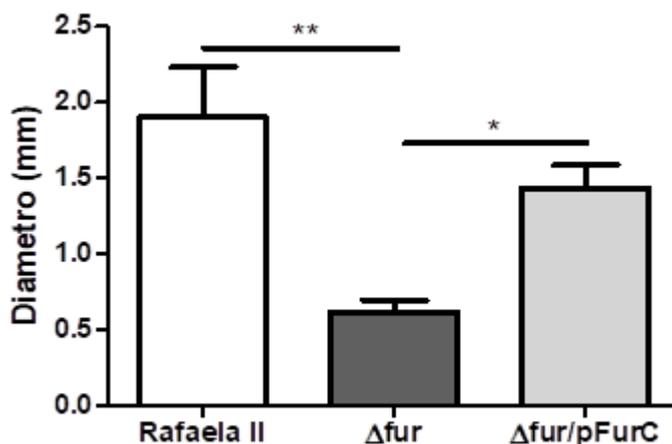


Figura 32: La ausencia del gen *fur* reduce la motilidad de *E. coli* O157:H7. Diámetro de la motilidad de las cepas Rafaela II (salvaje), Δfur y $\Delta fur/pFurC$ en medio de cultivo agar blando 0,3%. La significancia estadística se determinó mediante One-way ANOVA, seguido del Tukey's Multiple Comparison Test. **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Más de 60 genes constituyentes de al menos 14 operones se encuentran involucrados en la regulación, síntesis y ensamblado flagelar de *E. coli* (Sun *et al*, 2022; Sudo *et al*, 2014; Clarke *et al*, 2006). Entre los mismos, 40 de ellos fueron identificados a través del análisis proteómico (sección 4.6.), y mediante PRODORIC (sección 4.1.1.) se predijo que *qseC*, *adhE*, *cadA*, *sdiA* y *flhD* cuentan con la secuencia *fur*-box en su región promotora, pero ninguno de estos presentó una expresión diferencial. En cuanto a las 35 proteínas identificadas que no cuentan con la secuencia *fur*-box en sus promotoras, 14 de ellas no presentaron una expresión diferencial y 21 de ellos presentaron una regulación negativa tanto en una o ambas condiciones (salvaje crecida en medio LB + 300 μ M de BPD y Δfur al compararlas con la cepa salvaje crecida en medio LB) (Tabla 10).

Tabla 10. Genes de *E. coli* O157:H7 involucrados en la regulación, síntesis y ensamblado flagelar.

| <i>Gen</i> | Predicción de secuencia <i>fur</i> -box | Análisis proteómico |
|-------------|---|-------------------------------|
| <i>qseC</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |

| | | |
|------------------------|----|--|
| <i>adhE</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>CadA</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>sdiA</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>grlA</i> | Sí | No identificada |
| <i>grlR</i> | Sí | No identificada |
| <i>TolQ</i> | Sí | No identificada |
| <i>TolC</i> | No | Menos abundante en la cepa salvaje + BPD |
| <i>FlhD</i> | Sí | No hubo expresión diferencial |
| <i>fliF</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliG</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliL</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliM</i> | No | Menos abundante en la cepa Δfur |
| <i>fliN</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliO</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliE</i> | Sí | No identificada |
| <i>flgF</i> | No | Menos abundante en la cepa Δfur |
| <i>flgH</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>flgJ</i> | No | Menos abundante en la cepa Δfur |
| <i>fliA</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>flgA</i> | No | Menos abundante en la cepa Δfur |
| <i>flgM</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>flgN</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>flgK</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>flgL</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliD</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliS</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>fliC</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>tar-tap-cheRBYZ</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |
| <i>cheA</i> | No | Menos abundante en ambas condiciones |

Dado a que en el análisis funcional se observó una disminución significativa de la motilidad bacteriana al escindir el gen *fur* y que, entre los 40 genes identificados, involucrados en la regulación, síntesis y ensamblado flagelar, 21 de ellos presentaron una disminución de su expresión se puede confirmar que *fur* tiene una participación indirecta en la regulación positiva de la motilidad de *E. coli* O157:H7. Igualmente, dado a que algunos de estos presentaron una expresión diferencial negativa únicamente en Δfur (Fur no se encuentra presente) y no en la cepa salvaje crecida en medio LB + 300 μ M de BPD (Fur se encuentra en su conformación inactiva), *fur* podría estar comportándose como un regulador directo para algunos de ellos.

4.12. Análisis de expresión génica qRT-PCR

En la sección 4.3., pudimos observar que el hierro cumple un rol en la expresión de genes relacionados a la virulencia y patogenicidad de la bacteria en donde en *stcE* al limitar el hierro en el medio su expresión aumentó, mientras que en *fliC* disminuyó. Dado a que estos genes cuentan con una secuencia fur-box en su región promotora según la predicción obtenida mediante el análisis informático realizado en la sección 4.1., se propuso realizar un análisis de expresión génica de *stcE* y *fliC* mediante RT-qPCR entre las cepas Rafaela II, Δfur y $\Delta fur/pFurC$. Al observar que la ausencia del gen *fur* aumentó significativamente la expresión de *stcE* (**Figura 33**) y que ante bajas concentraciones de hierro su expresión también se vio aumentada (sección 4.3.), podemos afirmar que Fur se comporta como un represor directo del gen *stcE*. La no detección de la proteína StcE en nuestro análisis proteómico sugiere que la regulación de este factor de virulencia podría estar ocurriendo apenas a niveles transcripcionales. A diferencia de *stcE*, *fliC* mostró una disminución de su expresión en la cepa mutante Δfur y al limitar el hierro en el medio de la cepa Rafaela II (sección 4.3.) por lo que podemos afirmar que Fur promueve directamente el gen *fliC*. A su vez, *fliC* fue identificado en el análisis proteómico en donde fue menos abundante en ambas condiciones (Rafaela crecida en medio LB + 300 μ M de BPD y Δfur al compararlas con la cepa Rafaela II crecida en medio LB), confirmando así que *fur* es un regulador directo positivo de *fliC* en *E. coli* O157:H7.

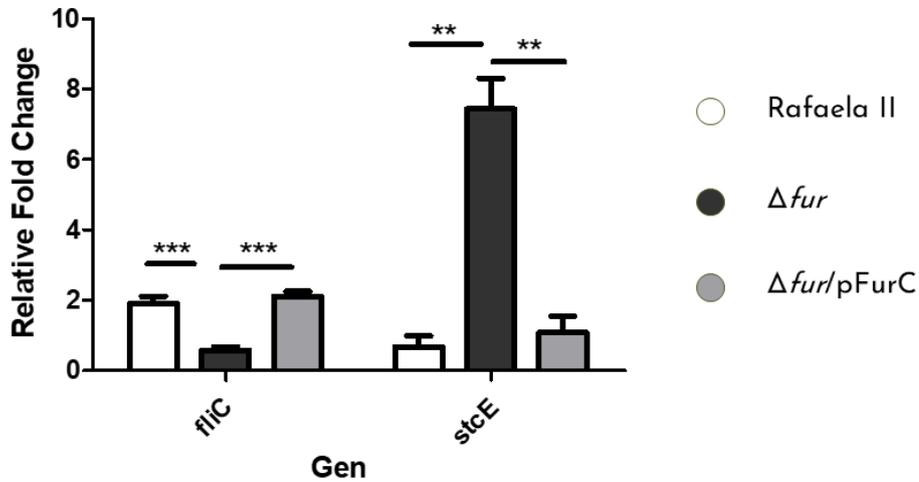


Figura 33: Análisis del rol de *fur* en la expresión génica de *stcE* y *fliC* mediante RT-qPCR. RTq-PCR del gen *stcE* y *fliC* de *E. coli* O157:H7 Rafaela II (salvaje), Δfur y $\Delta fur/pFurC$ en medio LB. La significancia estadística se determinó mediante One-way ANOVA, seguido del Tukey's Multiple Comparison Test. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se logró demostrar cómo el factor transcripcional *fur* impacta en la patofisiología de *E. coli* O157:H7. Partiendo de un análisis *in silico*, se identificaron 427 genes con predicción positiva para la secuencia *fur*-box en su región promotora, de estos un 52,2% no se encuentran presentes en la cepa comensal *E. coli* K-12 entre los cuales se identificaron 32 factores de virulencia. A su vez, se reconoció que un 11,9% se encuentran localizados en fagos y un 25,5% se encuentran localizados en islas genómicas, mayoritariamente en islas de patogenicidad. Por lo tanto, se predijo que *fur* cumple un rol en la regulación de genes codificantes de factores de virulencia y presentes en islas de patogenicidad ausentes en *E. coli* comensal. A partir de esta predicción, se evaluaron los efectos de la ausencia del gen *fur* en la virulencia y patogenicidad de *E. coli* O157:H7 a través de diversos ensayos funcionales donde se determinó que *fur* cumple un papel como regulador positivo de vías de genes involucradas en la adhesión a las células epiteliales, la supervivencia al ataque de los macrófagos y la motilidad bacteriana, mientras que ante la resistencia al estrés ácido mostró su participación como un regulador negativo de las mismas. También se vio que tanto ante la ausencia del gen *fur* como en condiciones limitantes de hierro donde Fur se encuentra en su conformación inactiva, hubo una expresión diferencial de 371 proteínas. Estos análisis proteómicos nos permitieron identificar por la primera vez el conjunto de proteínas que podrían ser parte del regulón *fur* en *E. coli* O157:H7.

6. ANEXO I

Tabla 11: Predicción de genes de *E. coli* O157:H7 Rafaela II con secuencias fur-box en su región promotora mediante PRODORIC.

| Score | Gen | Gen ID | Distancia al ATG | Producto |
|-------------|-------------|---------------------|------------------|---|
| 7.45 (4.04) | <i>acrS</i> | <i>XF37_RS02910</i> | -138 | multidrug efflux transporter transcriptional repressor AcrS |
| 7.42 (4.19) | <i>araE</i> | <i>XF37_RS05125</i> | -153 | arabinose-protonsymporterAraE |
| 7.55 (3.36) | <i>astC</i> | <i>XF37_RS12490</i> | -55 | succinylornithine/acetylornithinetransaminase |
| 7.60 (3.34) | <i>bioD</i> | <i>XF37_RS13295</i> | -58 | dethiobiotinsynthase |
| 7.74 (3.44) | <i>btsT</i> | <i>XF37_RS24530</i> | -287 | pyruvate/protonsymporterBtsT |
| 7.36 (4.04) | <i>caiT</i> | <i>XF37_RS24075</i> | -37 | L-carnitine/gamma-butyrobetaine antiporter |
| 7.68 (4.04) | <i>chuA</i> | <i>XF37_RS01645</i> | -83 | TonB-dependent heme/hemoglobin receptor ChuA/ShuA |
| 7.28 (3.14) | <i>cirA</i> | <i>XF37_RS08810</i> | -44 | catecholatesiderophore receptor CirA |
| 7.25 (4.04) | <i>citC</i> | <i>XF37_RS20995</i> | -180 | [citrate (pro-3S)-lyase] ligase |
| 7.60 (3.33) | <i>comR</i> | <i>XF37_RS17085</i> | -133 | TetR family copper-responsive transcriptional repressor ComR |
| 7.23 (4.04) | <i>cyoA</i> | <i>XF37_RS21850</i> | -247 | cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II |
| 7.21 (3.36) | <i>cysJ</i> | <i>XF37_RS05520</i> | -126 | NADPH-dependent assimilatory sulfite reductase flavoprotein subunit |
| 7.41 (4.04) | <i>dps</i> | <i>XF37_RS19725</i> | -141 | DNA starvation/stationary phase protection protein Dps |
| 7.31 (3.47) | <i>ecpR</i> | <i>XF37_RS22640</i> | -165 | ECP biosynthesisoperon DNA-bindingtranscriptionalregulatorEcpR |
| 7.25 (4.04) | <i>epd</i> | <i>XF37_RS04595</i> | -176 | erythrose-4-phosphate dehydrogenase |
| 7.26 (4.04) | <i>lipA</i> | <i>XF37_RS20950</i> | -300 | lipoylsynthase |

| | | | | |
|-------------|--------------|---------------------|------|---|
| 7.30 (4.19) | <i>escQ</i> | <i>XF37_RS00600</i> | -126 | type III secretion system LEE ring protein EscQ |
| 7.37 (3.19) | <i>tssF</i> | <i>XF37_RS23100</i> | -299 | type VI secretion system baseplate subunit TssF |
| 7.20 (3.58) | <i>yccA</i> | <i>XF37_RS18900</i> | -299 | FtsHproteasemodulatorYccA |
| 7.34 (4.19) | <i>aer</i> | <i>XF37_RS03835</i> | -297 | aerotaxis sensor receptor Aer |
| 7.76 (4.04) | <i>fliE</i> | <i>XF37_RS11280</i> | -296 | flagellar hook-basal body complex protein FliE |
| 7.44 (3.33) | <i>tssB</i> | <i>XF37_RS23080</i> | -296 | type VI secretion system contractile sheath small subunit |
| 7.60 (3.34) | <i>espR4</i> | <i>XF37_RS11285</i> | -295 | T3SS effector leucine-rich repeat protein EspR4 |
| 7.23 (3.58) | <i>escR</i> | <i>XF37_RS00510</i> | -96 | type III secretion system LEE export apparatus protein EscR |
| 8.00 (3.34) | <i>espA</i> | <i>XF37_RS00645</i> | -200 | type III secretion system LEE translocon filament proteinEspA |
| 7.25 (3.19) | | <i>XF37_RS22760</i> | -291 | septationinitiationprotein |
| 7.18 (4.04) | <i>glnG</i> | <i>XF37_RS27075</i> | -289 | nitrogen regulation protein NR(I) |
| 7.24 (3.44) | <i>espM2</i> | <i>XF37_RS06215</i> | -187 | T3SS effector guanine nucleotide exchange factor EspM2 |
| 7.36 (3.38) | <i>espX6</i> | <i>XF37_RS24620</i> | -261 | T3SS effector pentapeptide repeatprotein EspX6 |
| 7.56 (3.58) | <i>yjdM</i> | <i>XF37_RS25685</i> | -286 | zinc ribbon domain-containing protein YjdM |
| 7.24 (4.19) | <i>vsr</i> | <i>XF37_RS11170</i> | -285 | VSPR family DNA mismatch endonuclease |
| 7.24 (4.19) | <i>rfaH</i> | <i>XF37_RS27210</i> | -284 | transcription/translation regulatory transformer protein RfaH |
| 7.65 (4.19) | | <i>XF37_RS22885</i> | -283 | transcriptionantiterminationprotein |
| 7.59 (3.44) | <i>pepA</i> | <i>XF37_RS24910</i> | -282 | leucylaminopeptidase |
| 7.47 (4.04) | <i>ribB</i> | <i>XF37_RS03970</i> | -280 | 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase |
| 7.44 (3.28) | <i>yhjX</i> | <i>XF37_RS01380</i> | -280 | MFS transporter |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.18 (4.04) | <i>celF</i> | <i>XF37_RS12560</i> | -280 | 6-phospho-beta-glucosidase |
| 8.30 (3.28) | <i>fepD</i> | <i>XF37_RS21135</i> | -38 | Fe(3+)-siderophore ABC transporter permease |
| 7.38 (3.23) | | <i>XF37_RS25960</i> | -278 | hypotheticalprotein |
| 7.88 (4.04) | <i>ompF</i> | <i>XF37_RS19105</i> | -277 | porinOmpF |
| 7.73 (3.51) | <i>yjcB</i> | <i>XF37_RS25930</i> | -276 | YjcBfamilyprotein |
| 7.20 (3.28) | <i>yciK</i> | <i>XF37_RS14930</i> | -274 | YciKfamilyoxidoreductase |
| 7.29 (4.04) | | <i>XF37_RS00125</i> | -273 | hypotheticalprotein |
| 7.21 (3.34) | | <i>XF37_RS21535</i> | -273 | YadAfamilyautotransporteradhesin |
| 8.22 (4.04) | <i>kdpF</i> | <i>XF37_RS20625</i> | -271 | K(+)-transporting ATPase subunit F |
| 7.30 (3.34) | <i>fhuE</i> | <i>XF37_RS17135</i> | -91 | ferric-rhodotorulic acid/ferric-coprogen receptor FhuE |
| 7.25 (2.80) | <i>fhuF</i> | <i>XF37_RS24460</i> | -129 | siderophore-ironreductaseFhuF |
| 7.54 (3.51) | <i>gcvT</i> | <i>XF37_RS04715</i> | -270 | glycine cleavage system aminomethyltransferaseGcvT |
| 7.32 (3.28) | | <i>XF37_RS18670</i> | -270 | hypotheticalprotein |
| 7.29 (3.34) | <i>mdh</i> | <i>XF37_RS03040</i> | -270 | malate dehydrogenase |
| 7.53 (3.19) | <i>yddE</i> | <i>XF37_RS14125</i> | -269 | PhzFfamilyisomerase |
| 7.32 (3.28) | | <i>XF37_RS17550</i> | -269 | hypotheticalprotein |
| 7.22 (4.19) | <i>aroP</i> | <i>XF37_RS23705</i> | -269 | aromatic amino acid transporter AroP |
| 7.88 (3.33) | <i>plaP</i> | <i>XF37_RS10150</i> | -265 | putrescine/protonsymporterPlaP |
| 7.26 (3.14) | <i>torS</i> | <i>XF37_RS18235</i> | -265 | TMAO reductase system sensor histidine kinase/response regulator TorS |
| 7.70 (4.04) | <i>fimA</i> | <i>XF37_RS13895</i> | -91 | type 1 fimbrial major subunit FimA |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.65 (4.19) | <i>ypfM</i> | <i>XF37_RS07020</i> | -264 | proteinYpfM |
| 7.29 (4.19) | <i>fiu</i> | <i>XF37_RS19760</i> | -190 | catecholatesiderophore receptor Fiu |
| 7.55 (4.19) | <i>yphG</i> | <i>XF37_RS06595</i> | -262 | DUF5107 domain-containingprotein |
| 7.24 (3.34) | <i>ldhA</i> | <i>XF37_RS14465</i> | -262 | D-lactatedehydrogenase |
| 7.21 (4.19) | | <i>XF37_RS17825</i> | -262 | phosphoethanolaminetransferase |
| 8.77 (4.19) | | <i>XF37_RS09240</i> | -260 | DUF1441 familyprotein |
| 7.41 (3.14) | | <i>XF37_RS10415</i> | -260 | DUF826 domain-containingprotein |
| 7.41 (3.14) | | <i>XF37_RS09205</i> | -260 | DUF826 domain-containingprotein |
| 7.19 (4.19) | <i>focA</i> | <i>XF37_RS19230</i> | -190 | formatetransporterFocA |
| 7.17 (3.19) | <i>hisJ</i> | <i>XF37_RS08070</i> | -257 | histidine ABC transporter substrate-binding protein HisJ |
| 7.98 (4.19) | <i>qseE</i> | <i>XF37_RS06560</i> | -256 | two component system sensor histidine kinase QseE/GlrK |
| 7.30 (3.37) | <i>gltL</i> | <i>XF37_RS20830</i> | -256 | glutamate/aspartate ABC transporter ATP-binding protein GltL |
| 7.66 (4.19) | | <i>XF37_RS24550</i> | -255 | DEAD/DEAH box helicase family protein |
| 7.59 (3.51) | <i>yidB</i> | <i>XF37_RS00250</i> | -255 | YidBfamilyprotein |
| 7.51 (3.58) | <i>yegW</i> | <i>XF37_RS09490</i> | -253 | GntRfamilytranscriptionalregulator |
| 7.36 (3.23) | <i>ygbA</i> | <i>XF37_RS05680</i> | -253 | nitrous oxide-stimulated promoter family protein |
| 8.50 (3.37) | | <i>XF37_RS11005</i> | -252 | terminase smallsubunit |
| 7.24 (4.04) | <i>grxD</i> | <i>XF37_RS12970</i> | -250 | monothiolglutaredoxin 4 |
| 8.05 (4.19) | | <i>XF37_RS26250</i> | -249 | PTS system mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-transporter subunit IIB |
| 8.58 (4.19) | <i>fur</i> | <i>XF37_RS20700</i> | -84 | ferric iron uptake transcriptional regulator |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.62 (4.19) | <i>gadB</i> | <i>XF37_RS13970</i> | -145 | glutamatedecarboxylase |
| 7.50 (3.51) | | <i>XF37_RS22600</i> | -246 | NADH-dependentflavinoxidoreductase |
| 7.24 (2.91) | | <i>XF37_RS17840</i> | -246 | hypotheticalprotein |
| 7.17 (4.04) | <i>aqpZ</i> | <i>XF37_RS19375</i> | -246 | aquaporin Z |
| 7.37 (3.23) | <i>narX</i> | <i>XF37_RS15915</i> | -243 | nitrate/nitrite two-component system sensor histidine kinase NarX |
| 8.39 (4.04) | <i>gpmA</i> | <i>XF37_RS20305</i> | -42 | 2,3-diphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase |
| 7.37 (4.19) | | <i>XF37_RS17625</i> | -242 | hypotheticalprotein |
| 7.23 (4.19) | | <i>XF37_RS17820</i> | -241 | hypotheticalprotein |
| 7.32 (4.19) | | <i>XF37_RS00460</i> | -240 | hypotheticalprotein |
| 8.27 (4.04) | <i>iha</i> | <i>XF37_RS17640</i> | -71 | bifunctionalsiderophore receptor/adhesinIha |
| 7.62 (3.23) | | <i>XF37_RS20095</i> | -238 | hypotheticalprotein |
| 7.18 (4.19) | | <i>XF37_RS13615</i> | -238 | phagetailassembly chaperone |
| 8.47 (4.04) | | <i>XF37_RS00190</i> | -236 | ShET2/EspL2 family type III secretion system effector toxin |
| 7.37 (4.04) | | <i>XF37_RS13505</i> | -235 | DUF3927 familyprotein |
| 7.37 (4.04) | | <i>XF37_RS10940</i> | -235 | DUF3927 familyprotein |
| 7.73 (3.47) | <i>kdgR</i> | <i>XF37_RS12075</i> | -59 | DNA-binding transcriptional regulator KdgR |
| 7.30 (3.51) | | <i>XF37_RS04935</i> | -233 | helix-turn-helix domain-containing protein |
| 7.27 (3.23) | <i>pdeF</i> | <i>XF37_RS06850</i> | -231 | cyclic-guanylate-specific phosphodiesterase PdeF |
| 7.50 (4.04) | <i>ler</i> | <i>XF37_RS00485</i> | -90 | type III secretion system LEE master regulator Ler |
| 7.70 (4.19) | | <i>XF37_RS10510</i> | -229 | phagetailassembly chaperone |

| | | | | |
|-------------|--------------|---------------------|------|--|
| 7.31 (4.19) | | <i>XF37_RS00080</i> | -229 | fimbrialprotein |
| 7.40 (4.19) | <i>lpfA1</i> | <i>XF37_RS01385</i> | -278 | long polar fimbria major subunit LpfA1 |
| 7.39 (4.04) | <i>nleA</i> | <i>XF37_RS15420</i> | -227 | type III secretion system effector NleA |
| 7.22 (3.44) | <i>escU</i> | <i>XF37_RS00525</i> | -226 | type III secretion system LEE export apparatus switch protein EscU |
| 7.68 (4.19) | <i>iscR</i> | <i>XF37_RS06685</i> | -224 | Fe-S cluster assembly transcriptional regulator IscR |
| 7.48 (4.04) | <i>mltD</i> | <i>XF37_RS23205</i> | -160 | mureintransglycosylase D |
| 7.20 (3.47) | <i>mgo</i> | <i>XF37_RS08540</i> | -109 | malate dehydrogenase (quinone) |
| 7.47 (4.19) | <i>rhtA</i> | <i>XF37_RS19720</i> | -221 | threonine/homoserineexporterRhtA |
| 7.28 (3.33) | <i>nanC</i> | <i>XF37_RS24750</i> | -221 | N-acetylneuraminic acid outer membrane channel NanC |
| 7.29 (3.47) | <i>torR</i> | <i>XF37_RS18225</i> | -220 | two-component system response regulator TorR |
| 7.21 (4.19) | | <i>XF37_RS11830</i> | -217 | HNH endonuclease |
| 7.41 (4.04) | <i>nagD</i> | <i>XF37_RS20740</i> | -57 | ribonucleotidemonophosphataseNagD |
| 7.77 (3.51) | <i>queE</i> | <i>XF37_RS05460</i> | -215 | 7-carboxy-7-deazaguanine synthaseQueE |
| 7.51 (4.04) | <i>smg</i> | <i>XF37_RS02810</i> | -215 | DUF494 familyproteinSmg |
| 7.34 (3.19) | <i>tdcC</i> | <i>XF37_RS03620</i> | -215 | threonine/serinetransporterTdcC |
| 7.72 (3.34) | <i>chaA</i> | <i>XF37_RS15945</i> | -214 | sodium-potassium/protonantiporterChaA |
| 7.22 (2.68) | <i>livJ</i> | <i>XF37_RS02020</i> | -214 | branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein LivJ |
| 7.69 (3.33) | <i>frc</i> | <i>XF37_RS07450</i> | -213 | formyl-CoAtransferase |
| 7.20 (3.33) | <i>alaC</i> | <i>XF37_RS07420</i> | -213 | alaninetransaminase |
| 7.60 (4.19) | <i>narU</i> | <i>XF37_RS14100</i> | -83 | nitrate/nitritetransporterNarU |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 8.50 (4.19) | <i>nfeF</i> | <i>XF37_RS03845</i> | -228 | NADPH-dependent ferric chelate reductase |
| 7.35 (3.44) | <i>grlR</i> | <i>XF37_RS00535</i> | -211 | type III secretion system LEE GrlA-binding negative regulator GrlR |
| 7.42 (3.34) | <i>yifB</i> | <i>XF37_RS27610</i> | -207 | YifB family Mg chelatase-like AAA ATPase |
| 7.83 (3.51) | | <i>XF37_RS01720</i> | -206 | hypotheticalprotein |
| 7.30 (4.04) | <i>cmtB</i> | <i>XF37_RS04540</i> | -205 | PTS mannitol transporter subunit IIA |
| 8.30 (4.04) | <i>bdm</i> | <i>XF37_RS14035</i> | -156 | biofilm-dependentmodulationprotein |
| 7.23 (4.04) | <i>nleG</i> | <i>XF37_RS15365</i> | -183 | T3SS effector E3 ubiquitin-protein ligase NleG |
| 7.38 (3.37) | <i>cyaY</i> | <i>XF37_RS27395</i> | -203 | iron donorproteinCyaY |
| 7.74 (4.04) | <i>norR</i> | <i>XF37_RS05795</i> | -221 | nitric oxide reductasetranscriptionalregulatorNorR |
| 7.38 (4.04) | | <i>XF37_RS04970</i> | -200 | effectorprotein |
| 7.48 (3.34) | <i>pdxY</i> | <i>XF37_RS13060</i> | -98 | pyridoxalkinasePdxY |
| 7.32 (4.19) | | <i>XF37_RS23160</i> | -199 | hypotheticalprotein |
| 7.35 (4.19) | <i>perB</i> | <i>XF37_RS10070</i> | -149 | GDP-perosamine N-acetyltransferase |
| 7.27 (3.44) | <i>ygiV</i> | <i>XF37_RS04085</i> | -198 | GyrI-like domain-containing protein |
| 7.29 (3.37) | <i>priC</i> | <i>XF37_RS21675</i> | -94 | primosomalreplicationprotein N" |
| 7.25 (3.51) | <i>yaaA</i> | <i>XF37_RS24245</i> | -196 | peroxide stress proteinYaaA |
| 7.42 (4.19) | <i>pyrB</i> | <i>XF37_RS24975</i> | -277 | aspartatecarbamoyltransferase |
| 7.27 (4.04) | <i>yhjB</i> | <i>XF37_RS01545</i> | -194 | response regulatortranscription factor |
| 7.20 (4.19) | <i>stpA</i> | <i>XF37_RS06000</i> | -194 | DNA-bindingproteinStpA |
| 7.79 (4.04) | <i>sulA</i> | <i>XF37_RS18960</i> | -192 | celldivisioninhibitorSulA |

| | | | | |
|-------------|-------------|--------------|------|---|
| 7.20 (3.51) | <i>rclC</i> | XF37_RS22560 | -57 | reactive chlorine species resistance protein RclC |
| 7.59 (4.04) | <i>rtcB</i> | XF37_RS02230 | -82 | RNA-splicing ligase RtcB |
| 7.31 (3.36) | <i>sctN</i> | XF37_RS04955 | -122 | type III secretion system ATPase SctN |
| 7.49 (3.51) | <i>uspB</i> | XF37_RS01730 | -186 | universal stress proteinUspB |
| 8.35 (4.19) | <i>sdiA</i> | XF37_RS11380 | -39 | transcriptionalregulatorSdiA |
| 7.31 (3.51) | <i>fepA</i> | XF37_RS21170 | -185 | siderophoreenterobactin receptor FepA |
| 7.21 (3.44) | <i>escT</i> | XF37_RS00520 | -184 | type III secretion system LEE export apparatus protein EscT |
| 7.20 (4.04) | <i>tdcE</i> | XF37_RS03630 | -184 | 2-ketobutyrate formate-lyase/pyruvate formate-lyase |
| 8.18 (3.28) | | XF37_RS18805 | -183 | alpha/beta hydrolase |
| 7.33 (4.19) | | XF37_RS17025 | -183 | phage integrase Arm DNA-binding domain-containing protein |
| 7.31 (3.51) | <i>sepL</i> | XF37_RS00640 | -34 | type III secretion system LEE gatekeeper SepL |
| 7.32 (4.19) | <i>pth</i> | XF37_RS16015 | -180 | aminoacyl-tRNAhydrolase |
| 7.20 (4.04) | <i>shoB</i> | XF37_RS06525 | -193 | type I toxin-antitoxin system toxin ShoB |
| 7.73 (4.19) | | XF37_RS13245 | -179 | proteinYdgV |
| 7.31 (3.33) | <i>yicJ</i> | XF37_RS00745 | -179 | glycoside-pentoside-hexuronidefamilytransporter |
| 7.29 (4.19) | <i>ydiY</i> | XF37_RS12620 | -178 | YdiYfamilyprotein |
| 7.95 (3.44) | <i>yhiY</i> | XF37_RS01760 | -176 | proteinYhiY |
| 7.68 (4.04) | <i>yiaA</i> | XF37_RS01300 | -176 | innermembraneproteinYiaA |
| 8.94 (4.19) | <i>ssuE</i> | XF37_RS19065 | -299 | NADPH-dependent FMN reductase |
| 7.17 (3.33) | | XF37_RS24635 | -176 | hypotheticalprotein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.67 (4.04) | <i>cyuP</i> | <i>XF37_RS03645</i> | -175 | amino acid permease |
| 8.47 (3.37) | <i>sufA</i> | <i>XF37_RS12815</i> | -199 | Fe-S cluster assembly scaffold SufA |
| 7.30 (4.19) | <i>dacA</i> | <i>XF37_RS20930</i> | -175 | D-alanyl-D-alaninecarboxypeptidaseDacA |
| 7.26 (4.19) | | <i>XF37_RS07515</i> | -175 | oligosaccharide MFS transporter |
| 7.65 (3.51) | <i>hemB</i> | <i>XF37_RS22170</i> | -172 | porphobilinogensynthase |
| 7.50 (3.47) | <i>anmK</i> | <i>XF37_RS13040</i> | -172 | anhydro-N-acetylmuramicacidkinase |
| 7.27 (2.87) | <i>eutS</i> | <i>XF37_RS07065</i> | -171 | ethanolamine utilization microcompartment protein EutS |
| 7.63 (4.19) | <i>prpR</i> | <i>XF37_RS22365</i> | -170 | propionatecatabolismoperonregulatoryproteinPrpR |
| 7.51 (4.19) | <i>dapD</i> | <i>XF37_RS23435</i> | -170 | 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase |
| 7.21 (4.04) | <i>ais</i> | <i>XF37_RS08340</i> | -170 | lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase Ais |
| 8.28 (4.19) | <i>symE</i> | <i>XF37_RS24565</i> | -37 | endoribonucleaseSymE |
| 9.53 (4.19) | <i>ylcI</i> | <i>XF37_RS16405</i> | -169 | YlcI/YnfOfamilyprotein |
| 9.53 (4.19) | | <i>XF37_RS15545</i> | -169 | YlcI/YnfOfamilyprotein |
| 7.63 (3.44) | <i>tir</i> | <i>XF37_RS00620</i> | -199 | type III secretion system LEE translocated intimin receptor Tir |
| 7.23 (3.51) | <i>slyA</i> | <i>XF37_RS13030</i> | -167 | transcriptionalregulatorSlyA |
| 7.98 (3.34) | | <i>XF37_RS09695</i> | -166 | phage baseplate assembly protein V |
| 7.33 (4.04) | <i>udk</i> | <i>XF37_RS09865</i> | -78 | uridinekinase |
| 7.60 (4.19) | <i>grcA</i> | <i>XF37_RS06435</i> | -166 | autonomouslyglycyl radical cofactor GrcA |
| 7.48 (4.19) | <i>rppH</i> | <i>XF37_RS05180</i> | -166 | RNA pyrophosphohydrolase |
| 7.47 (4.19) | <i>ugd</i> | <i>XF37_RS10080</i> | -122 | UDP-glucose 6-dehydrogenase |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.28 (4.04) | <i>uhpA</i> | <i>XF37_RS00395</i> | -170 | transcriptionalregulatorUhpA |
| 7.55 (3.34) | <i>zur</i> | <i>XF37_RS26100</i> | -164 | zinc uptake transcriptional repressor Zur |
| 7.88 (4.19) | <i>yhbX</i> | <i>XF37_RS03325</i> | -163 | phosphoethanolaminetransferase |
| 7.86 (4.19) | <i>wcaK</i> | <i>XF37_RS09985</i> | -211 | colanic acid biosynthesis pyruvyl transferase WcaK |
| 7.20 (3.58) | <i>melR</i> | <i>XF37_RS25630</i> | -162 | transcriptionalregulatorMelR |
| 7.81 (3.47) | <i>wzx</i> | <i>XF37_RS10025</i> | -99 | O157 family O-antigenflippase |
| 7.55 (3.44) | <i>lptD</i> | <i>XF37_RS23995</i> | -161 | LPS assemblyproteinLptD |
| 8.09 (4.19) | <i>fepB</i> | <i>XF37_RS21125</i> | -45 | Fe ²⁺ -enterobactin ABC transporter substrate-binding protein |
| 7.82 (4.04) | <i>moeA</i> | <i>XF37_RS19645</i> | -159 | molybdopterinmolybdotransferaseMoeA |
| 7.50 (3.38) | | <i>XF37_RS09765</i> | -159 | phagetailprotein |
| 7.17 (3.36) | | <i>XF37_RS01750</i> | -159 | DUF4049 domain-containingprotein |
| 8.30 (4.19) | <i>yncD</i> | <i>XF37_RS14195</i> | -158 | TonB-dependent receptor |
| 7.76 (4.04) | | <i>XF37_RS06750</i> | -158 | molybdopterin-dependentoxidoreductase |
| 7.19 (3.58) | <i>ybfE</i> | <i>XF37_RS20685</i> | -158 | LexAregulatedprotein |
| 7.51 (3.47) | <i>treR</i> | <i>XF37_RS25000</i> | -157 | trehaloseoperonrepressorTreR |
| 7.69 (4.04) | | <i>XF37_RS00130</i> | -112 | hypotheticalprotein |
| 7.26 (4.19) | | <i>XF37_RS16850</i> | -156 | hypotheticalprotein |
| 7.20 (4.19) | <i>dppB</i> | <i>XF37_RS01425</i> | -156 | dipeptide ABC transporter permease DppB |
| 7.41 (4.19) | <i>bax</i> | <i>XF37_RS01260</i> | -155 | proteinbax |
| 7.74 (4.04) | | <i>XF37_RS04520</i> | -154 | lipoprotein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.56 (4.04) | | <i>XF37_RS24170</i> | -154 | fimbrialprotein |
| 8.21 (4.04) | | <i>XF37_RS20520</i> | -153 | hypotheticalprotein |
| 7.50 (4.19) | <i>mglB</i> | <i>XF37_RS08835</i> | -153 | galactose/glucose ABC transporter substrate-binding protein MglB |
| 7.33 (3.58) | <i>yfiF</i> | <i>XF37_RS06425</i> | -153 | tRNA/rRNAmethyltransferase |
| 7.33 (4.19) | <i>yncJ</i> | <i>XF37_RS14275</i> | -153 | YncJfamilyprotein |
| 7.28 (3.58) | <i>mdtI</i> | <i>XF37_RS13255</i> | -153 | multidrug/spermidine efflux SMR transporter subunit MdtI |
| 8.45 (3.51) | <i>yieP</i> | <i>XF37_RS27655</i> | -150 | FadRfamilytranscriptionalregulator |
| 7.42 (4.19) | <i>purH</i> | <i>XF37_RS26340</i> | -150 | bifunctionalphosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase/IMP cyclohydrolase |
| 8.55 (4.19) | <i>metJ</i> | <i>XF37_RS26685</i> | -148 | met regulón transcriptional regulator MetJ |
| 7.33 (4.19) | | <i>XF37_RS24180</i> | -148 | fimbrial biogenesis outer membrane usher protein |
| 7.22 (4.04) | | <i>XF37_RS17000</i> | -147 | hypotheticalprotein |
| 7.17 (4.19) | <i>glpT</i> | <i>XF37_RS08410</i> | -147 | glycerol-3-phosphate transporter |
| 7.96 (4.04) | | <i>XF37_RS00390</i> | -229 | hypotheticalprotein |
| 7.34 (3.34) | <i>ecpC</i> | <i>XF37_RS22655</i> | -146 | fimbrialusherEcpC |
| 7.30 (3.47) | | <i>XF37_RS01005</i> | -83 | UDP-glucose--(galactosyl) LPS alpha1,2-glucosyltransferase |
| 7.57 (3.58) | <i>gadA</i> | <i>XF37_RS01560</i> | -145 | glutamatedecarboxylase |
| 7.17 (3.37) | <i>fadD</i> | <i>XF37_RS12190</i> | -145 | long-chain-fatty-acid--CoA ligase FadD |
| 7.19 (4.04) | | <i>XF37_RS08430</i> | -144 | MFS transporter |
| 7.22 (4.19) | <i>robA</i> | <i>XF37_RS24310</i> | -143 | MDR effluxpumpAcrABtranscriptionalactivatorRobA |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.66 (4.04) | | <i>XF37_RS15715</i> | -142 | DUF1482 familyprotein |
| 7.17 (3.23) | <i>escS</i> | <i>XF37_RS00515</i> | -142 | type III secretion system LEE export apparatus protein EscS |
| 8.07 (4.19) | <i>trpE</i> | <i>XF37_RS14965</i> | -141 | anthranilatesynthasecomponent I |
| 7.70 (4.04) | <i>ypeA</i> | <i>XF37_RS07160</i> | -141 | GNAT familyacetyltransferase |
| 7.59 (3.34) | | <i>XF37_RS01010</i> | -282 | lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase |
| 7.18 (4.19) | <i>ggt</i> | <i>XF37_RS02100</i> | -141 | gamma-glutamyltransferase |
| 7.55 (4.19) | <i>gap</i> | <i>XF37_RS14365</i> | -140 | type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| 7.55 (3.34) | <i>dgcM</i> | <i>XF37_RS14520</i> | -140 | diguanylatecyclaseDgcM |
| 7.29 (4.04) | <i>ybhC</i> | <i>XF37_RS20220</i> | -140 | putative acyl-CoA thioester hydrolase |
| 7.43 (4.04) | <i>grpE</i> | <i>XF37_RS06265</i> | -139 | nucleotideexchange factor GrpE |
| 7.72 (3.44) | | <i>XF37_RS10020</i> | -138 | glycosyltransferase |
| 7.77 (3.34) | | <i>XF37_RS01755</i> | -97 | DUF4049 domain-containingprotein |
| 8.89 (4.19) | <i>folE</i> | <i>XF37_RS08820</i> | -136 | GTP cyclohydrolase I FolE |
| 7.34 (3.34) | <i>hns</i> | <i>XF37_RS15835</i> | -136 | DNA-binding transcriptional regulator H-NS |
| 7.65 (4.19) | | <i>XF37_RS15730</i> | -135 | phage integrase Arm DNA-binding domain-containing protein |
| 7.65 (4.19) | | <i>XF37_RS15330</i> | -135 | phage integrase Arm DNA-binding domain-containing protein |
| 8.09 (2.91) | <i>mntH</i> | <i>XF37_RS07360</i> | -69 | Nramp family divalent metal transporter |
| 7.39 (3.34) | <i>dinJ</i> | <i>XF37_RS22985</i> | -133 | type II toxin-antitoxin system antitoxin DinJ |
| 8.07 (4.04) | | <i>XF37_RS04035</i> | -48 | ABC transporter ATP-binding protein |
| 7.48 (4.04) | <i>cesT</i> | <i>XF37_RS00625</i> | -131 | type III secretion system LEE chaperone CesT |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.41 (3.33) | <i>cydD</i> | <i>XF37_RS19310</i> | -131 | cysteine/glutathione ABC transporter permease/ATP-binding protein CydD |
| 7.22 (4.04) | | <i>XF37_RS04975</i> | -218 | YscQ/HrcQ family type III secretion apparatus protein |
| 7.19 (3.23) | | <i>XF37_RS14595</i> | -131 | SDR family oxidoreductase |
| 7.86 (3.34) | | <i>XF37_RS26240</i> | -130 | SDR family oxidoreductase |
| 7.36 (3.36) | <i>coaA</i> | <i>XF37_RS26500</i> | -130 | type I pantothenate kinase |
| 7.21 (4.19) | <i>ompC</i> | <i>XF37_RS08515</i> | -205 | porin OmpC |
| 7.53 (4.19) | | <i>XF37_RS04995</i> | -106 | EscU/YscU/HrcU family type III secretion system export apparatus switch protein |
| 7.72 (3.47) | <i>ypfG</i> | <i>XF37_RS07045</i> | -127 | DUF1176 domain-containing protein |
| 7.55 (3.23) | <i>yfeX</i> | <i>XF37_RS07175</i> | -127 | porphyrinogen peroxidase |
| 7.40 (4.19) | <i>ylaC</i> | <i>XF37_RS21720</i> | -127 | YlaC family protein |
| 7.45 (4.19) | <i>ytfF</i> | <i>XF37_RS25145</i> | -126 | DMT family transporter |
| 7.38 (4.19) | <i>agaR</i> | <i>XF37_RS03550</i> | -126 | aga operon transcriptional regulator AgaR |
| 7.23 (4.19) | | <i>XF37_RS05015</i> | -92 | type III secretion system needle complex protein |
| 7.33 (3.34) | <i>ybjT</i> | <i>XF37_RS19405</i> | -126 | SDR family oxidoreductase |
| 7.23 (4.04) | | <i>XF37_RS10055</i> | -126 | mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase |
| 7.32 (3.34) | | <i>XF37_RS05030</i> | -260 | type III secretion apparatus protein OrgA/MxiK |
| 7.52 (4.04) | | <i>XF37_RS05080</i> | -110 | hypothetical protein |
| 7.44 (3.58) | <i>mhpR</i> | <i>XF37_RS22280</i> | -125 | DNA-binding transcriptional regulator |
| 7.19 (4.04) | <i>yebE</i> | <i>XF37_RS11980</i> | -125 | tellurite resistance TerB family protein |
| 7.88 (4.19) | <i>torY</i> | <i>XF37_RS11770</i> | -123 | NapC/NirT family cytochrome c |

| | | | | |
|-------------|--------------|---------------------|------|--|
| 7.67 (4.19) | | <i>XF37_RS05540</i> | -52 | CRISPR-associated helicase/endonuclease Cas3 |
| 8.28 (4.04) | <i>rcnR</i> | <i>XF37_RS09455</i> | -121 | Ni(II)/Co(II)-binding transcriptional repressor RcnR |
| 7.36 (4.04) | <i>yfdX</i> | <i>XF37_RS07445</i> | -121 | YfdXfamilyprotein |
| 7.40 (3.47) | | <i>XF37_RS06065</i> | -50 | DUF5507 domain-containingprotein |
| 7.84 (3.33) | <i>ybiI</i> | <i>XF37_RS19770</i> | -119 | C4-type zinc finger proteinYbiI |
| 7.28 (3.19) | <i>ytfB</i> | <i>XF37_RS25165</i> | -119 | celldivisionproteinYtfB |
| 7.27 (3.34) | <i>amiC</i> | <i>XF37_RS05245</i> | -119 | N-acetylmuramoyl-L-alanineamidaseAmiC |
| 7.21 (4.04) | <i>yejO</i> | <i>XF37_RS08630</i> | -119 | autotransporterYejO |
| 7.48 (4.19) | | <i>XF37_RS10880</i> | -118 | hypotheticalprotein |
| 7.56 (3.44) | <i>rdgC</i> | <i>XF37_RS22060</i> | -117 | recombination-associatedproteinRdgC |
| 7.40 (3.58) | <i>glpQ</i> | <i>XF37_RS08415</i> | -117 | glycerophosphodiesterphosphodiesterase |
| 7.26 (3.44) | <i>espR3</i> | <i>XF37_RS11295</i> | -114 | T3SS effector leucine-rich repeat protein EspR3 |
| 7.21 (3.34) | | <i>XF37_RS00075</i> | -114 | fimbria/pilusperiplasmic chaperone |
| 7.22 (4.19) | | <i>XF37_RS21250</i> | -113 | type VI secretion system tip protein VgrG |
| 7.20 (3.34) | | <i>XF37_RS06100</i> | -30 | tyrosine-type recombinase/integrase |
| 7.39 (3.58) | <i>ygcW</i> | <i>XF37_RS05475</i> | -112 | SDR familyoxidoreductase |
| 7.36 (3.51) | <i>fnr</i> | <i>XF37_RS14555</i> | -112 | fumarate/nitratereductiontranscriptionalregulatorFnr |
| 7.26 (3.44) | <i>aslA</i> | <i>XF37_RS27425</i> | -112 | arylsulfataseAslA |
| 7.25 (3.34) | <i>mutM</i> | <i>XF37_RS00965</i> | -112 | bifunctional DNA-formamidopyrimidine glycosylase/DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.41 (4.04) | | <i>XF37_RS06110</i> | -244 | hypotheticalprotein |
| 7.51 (3.51) | <i>bor</i> | <i>XF37_RS16420</i> | -109 | serumresistancelipoprotein Bor |
| 8.02 (4.04) | | <i>XF37_RS07500</i> | -125 | LacI family DNA-binding transcriptional regulator |
| 7.55 (3.28) | <i>ynjF</i> | <i>XF37_RS12440</i> | -108 | CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein |
| 7.42 (3.36) | | <i>XF37_RS01295</i> | -107 | innermembraneprotein YiaB |
| 7.41 (4.19) | | <i>XF37_RS07530</i> | -39 | hypotheticalprotein |
| 7.50 (3.44) | | <i>XF37_RS07715</i> | -120 | hypotheticalprotein |
| 7.29 (3.58) | <i>yajL</i> | <i>XF37_RS21890</i> | -104 | proteindeglycase YajL |
| 7.18 (3.34) | <i>basR</i> | <i>XF37_RS25655</i> | -104 | two-component system response regulator BasR |
| 8.39 (4.19) | | <i>XF37_RS11585</i> | -103 | DUF2511 domain-containingprotein |
| 7.72 (4.04) | <i>lysA</i> | <i>XF37_RS05140</i> | -103 | diaminopimelatedecarboxylase |
| 7.50 (3.33) | <i>tsx</i> | <i>XF37_RS21960</i> | -103 | nucleoside-specific channel-forming protein Tsx |
| 7.48 (4.19) | | <i>XF37_RS26065</i> | -103 | hypotheticalprotein |
| 7.44 (3.36) | | <i>XF37_RS04985</i> | -102 | EscS/YscS/HrcS family type III secretion system export apparatus protein |
| 7.44 (3.58) | | <i>XF37_RS10010</i> | -46 | glycosyltransferase |
| 7.63 (4.19) | <i>artJ</i> | <i>XF37_RS19455</i> | -101 | ABC transporter substrate-binding protein ArtJ |
| 7.31 (4.19) | <i>yqfA</i> | <i>XF37_RS04740</i> | -101 | hemolysin III familyprotein |
| 7.64 (3.33) | <i>yfcL</i> | <i>XF37_RS07990</i> | -100 | YfcLfamilyprotein |
| 7.24 (4.04) | | <i>XF37_RS10845</i> | -300 | toxin YdaTfamilyprotein |
| 7.40 (4.04) | | <i>XF37_RS14085</i> | -58 | leucine-rich repeat domain-containing protein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.19 (3.23) | <i>argO</i> | <i>XF37_RS04615</i> | -99 | arginineexporterArgO |
| 7.45 (4.04) | <i>ycdI</i> | <i>XF37_RS14335</i> | -98 | LysR substrate-binding domain-containing protein |
| 8.30 (3.51) | <i>map</i> | <i>XF37_RS23425</i> | -97 | type I methionylaminopeptidase |
| 8.03 (4.19) | <i>flhD</i> | <i>XF37_RS11670</i> | -97 | flagellartranscriptionalregulatorFlhD |
| 7.19 (3.34) | | <i>XF37_RS15375</i> | -168 | hypotheticalprotein |
| 7.52 (4.19) | <i>menD</i> | <i>XF37_RS08275</i> | -97 | 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3- cyclohexene-1-carboxylic-acid synthase |
| 7.29 (4.19) | <i>pyrG</i> | <i>XF37_RS05430</i> | -97 | CTP synthase (glutaminehydrolyzing) |
| 8.03 (3.51) | | <i>XF37_RS15560</i> | -265 | hypotheticalprotein |
| 7.19 (3.51) | | <i>XF37_RS16270</i> | -227 | general stress protein |
| 7.89 (3.44) | | <i>XF37_RS16745</i> | -31 | Arc family DNA-binding protein |
| 7.52 (3.51) | | <i>XF37_RS10560</i> | -95 | host specificityprotein J |
| 7.43 (3.34) | | <i>XF37_RS09620</i> | -95 | AAA familyATPase |
| 7.28 (4.04) | <i>pdxH</i> | <i>XF37_RS13050</i> | -95 | pyridoxamine 5'-phosphate oxidase |
| 7.79 (3.36) | <i>wzzB</i> | <i>XF37_RS10085</i> | -94 | LPS O-antigen chain length determinant protein WzzB |
| 7.33 (2.76) | | <i>XF37_RS17685</i> | -166 | ATP-grasp domain-containing protein |
| 7.88 (4.19) | <i>adeP</i> | <i>XF37_RS00150</i> | -92 | adenine permease AdeP |
| 7.80 (4.04) | <i>rpsP</i> | <i>XF37_RS06285</i> | -91 | 30S ribosomal protein S16 |
| 7.58 (3.36) | | <i>XF37_RS18025</i> | -32 | type 1 fimbrialprotein |
| 7.51 (4.04) | | <i>XF37_RS18060</i> | -44 | hypotheticalprotein |
| 8.47 (4.19) | <i>tdR</i> | <i>XF37_RS03895</i> | -89 | DNA-binding transcriptional activator TtdR |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.27 (3.28) | | <i>XF37_RS18270</i> | -262 | threonine-rich inner membrane protein GfcA |
| 7.76 (4.04) | | <i>XF37_RS10885</i> | -88 | hypotheticalprotein |
| 7.26 (4.04) | | <i>XF37_RS11815</i> | -88 | hypotheticalprotein |
| 8.16 (4.19) | <i>uraA</i> | <i>XF37_RS06880</i> | -87 | uracil permease |
| 7.19 (3.51) | | <i>XF37_RS18490</i> | -227 | general stress protein |
| 7.23 (4.19) | | <i>XF37_RS09555</i> | -87 | hypotheticalprotein |
| 7.47 (4.04) | <i>kgtP</i> | <i>XF37_RS06390</i> | -86 | alpha-ketoglutarate permease |
| 7.47 (4.04) | <i>rhtB</i> | <i>XF37_RS27290</i> | -86 | homoserine/homoserine lactone efflux protein |
| 8.11 (4.19) | <i>cadA</i> | <i>XF37_RS25560</i> | -85 | lysinedecarboxylaseCadA |
| 8.05 (4.19) | <i>exbB</i> | <i>XF37_RS04150</i> | -83 | tol-pal system-associated acyl-CoA thioesterase |
| 7.53 (4.04) | | <i>XF37_RS20425</i> | -35 | hypotheticalprotein |
| 7.63 (3.34) | <i>yfgJ</i> | <i>XF37_RS06810</i> | -83 | zinc ribbon domain-containing protein |
| 7.42 (3.36) | <i>wzy</i> | <i>XF37_RS10015</i> | -83 | O157 family O-antigenpolymerase |
| 7.42 (4.19) | <i>cysD</i> | <i>XF37_RS05585</i> | -83 | sulfate adenylyltransferasesubunitCysD |
| 7.18 (4.19) | | <i>XF37_RS20460</i> | -163 | dicarboxylate/amino acid:cationsymporter |
| 7.20 (4.04) | | <i>XF37_RS20530</i> | -43 | type 1 fimbrialprotein |
| 7.31 (3.37) | <i>yccM</i> | <i>XF37_RS18240</i> | -82 | 4Fe-4S bindingprotein |
| 7.30 (3.58) | | <i>XF37_RS09265</i> | -82 | DUF2190 familyprotein |
| 7.17 (4.04) | <i>ygiQ</i> | <i>XF37_RS04110</i> | -82 | YgiQ family radical SAM protein |
| 7.18 (4.19) | | <i>XF37_RS21270</i> | -194 | RHS repeatprotein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.19 (3.28) | | <i>XF37_RS07725</i> | -80 | helix-turn-helix domain-containing protein |
| 7.67 (4.04) | <i>dcuS</i> | <i>XF37_RS25595</i> | -79 | sensor histidinekinase |
| 7.29 (3.51) | | <i>XF37_RS22515</i> | -38 | adhesin |
| 7.24 (4.04) | | <i>XF37_RS23165</i> | -106 | hypotheticalprotein |
| 7.72 (4.19) | <i>hycA</i> | <i>XF37_RS05715</i> | -76 | formatehydrogenlyaseregulatorHycA |
| 7.18 (3.33) | <i>ompC</i> | <i>XF37_RS14080</i> | -204 | porinOmpC |
| 7.78 (4.19) | <i>sad</i> | <i>XF37_RS13805</i> | -75 | succinate-semialdehydedehydrogenase |
| 7.41 (3.51) | | <i>XF37_RS24845</i> | -185 | hypotheticalprotein |
| 7.26 (3.44) | <i>ompL</i> | <i>XF37_RS27040</i> | -75 | porinOmpL |
| 7.30 (4.04) | | <i>XF37_RS01235</i> | -74 | AraCfamilytranscriptionalregulator |
| 7.29 (4.04) | | <i>XF37_RS25815</i> | -300 | YtcAfamilylipoprotein |
| 7.53 (3.33) | <i>espF</i> | <i>XF37_RS00675</i> | -72 | type III secretion system LEE effector EspF |
| 7.28 (4.19) | | <i>XF37_RS26755</i> | -111 | hypotheticalprotein |
| 7.59 (3.51) | <i>grlA</i> | <i>XF37_RS00540</i> | -69 | type III secretion system LEE transcriptional regulator GrlA |
| 7.51 (4.04) | <i>proS</i> | <i>XF37_RS23290</i> | -69 | proline--tRNA ligase |
| 7.30 (3.51) | <i>ybcK</i> | <i>XF37_RS09120</i> | -265 | recombinase familyprotein |
| 7.68 (3.58) | <i>wzxC</i> | <i>XF37_RS09980</i> | -63 | colanic acid undecaprenyl disphosphateflippaseWzxC |
| 8.00 (3.58) | | <i>XF37_RS06115</i> | -62 | hypotheticalprotein |
| 7.59 (4.04) | <i>emrK</i> | <i>XF37_RS07480</i> | -62 | multidrug efflux MFS transporter periplasmic adaptor subunit EmrK |
| 7.30 (4.04) | <i>rfaY</i> | <i>XF37_RS01000</i> | -128 | lipopolysaccharide core heptose(II) kinase RfaY |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.68 (4.19) | <i>ybcL</i> | <i>XF37_RS09125</i> | -204 | Raf kinase inhibitor-like protein YbcL |
| 7.93 (4.04) | <i>adhP</i> | <i>XF37_RS14050</i> | -60 | alcohol dehydrogenase AdhP |
| 7.60 (4.04) | <i>ybdO</i> | <i>XF37_RS21065</i> | -81 | LysR family transcriptional regulator |
| 7.32 (4.04) | <i>glnA</i> | <i>XF37_RS27065</i> | -60 | glutamate--ammonia ligase |
| 7.46 (3.23) | <i>ybeF</i> | <i>XF37_RS20945</i> | -60 | YbeF family transcriptional regulator |
| 7.37 (4.19) | <i>ulaG</i> | <i>XF37_RS25250</i> | -59 | L-ascorbate 6-phosphate lactonase |
| 7.17 (4.04) | | <i>XF37_RS06845</i> | -59 | hypothetical protein |
| 7.83 (4.04) | <i>yceJ</i> | <i>XF37_RS17355</i> | -96 | cytochrome b |
| 7.63 (4.19) | <i>sapA</i> | <i>XF37_RS14765</i> | -57 | peptide ABC transporter substrate-binding protein SapA |
| 7.17 (3.37) | <i>ycgV</i> | <i>XF37_RS16025</i> | -76 | autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein |
| 7.21 (3.44) | <i>yehJ</i> | <i>XF37_RS15855</i> | -128 | YehJ family protein |
| 7.39 (4.19) | | <i>XF37_RS00385</i> | -56 | hypothetical protein |
| 8.43 (4.19) | <i>yehE</i> | <i>XF37_RS08800</i> | -55 | DNA-binding transcriptional regulator YehE |
| 7.39 (3.34) | <i>yciG</i> | <i>XF37_RS14990</i> | -200 | general stress protein |
| 7.31 (3.36) | <i>mdtM</i> | <i>XF37_RS24595</i> | -55 | multidrug efflux MFS transporter MdtM |
| 7.45 (3.47) | | <i>XF37_RS22595</i> | -52 | alpha/beta hydrolase |
| 7.62 (3.47) | <i>yciI</i> | <i>XF37_RS15765</i> | -177 | YciI family protein |
| 7.44 (3.33) | <i>yphF</i> | <i>XF37_RS06600</i> | -51 | substrate-binding domain-containing protein |
| 7.40 (4.04) | <i>yddA</i> | <i>XF37_RS13955</i> | -104 | ABC transporter ATP-binding protein/permease |
| 7.29 (4.19) | | <i>XF37_RS04965</i> | -50 | hypothetical protein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 8.04 (3.19) | <i>ydhU</i> | <i>XF37_RS12885</i> | -90 | thiosulfate reductase cytochrome B subunit |
| 7.58 (4.19) | <i>pdeB</i> | <i>XF37_RS21725</i> | -48 | cyclic-guanylate-specific phosphodiesterase PdeB |
| 7.37 (4.19) | | <i>XF37_RS17710</i> | -48 | DUF4236 domain-containingprotein |
| 7.19 (4.19) | <i>yijO</i> | <i>XF37_RS26610</i> | -48 | AraCfamilytranscriptionalregulator |
| 7.49 (4.04) | | <i>XF37_RS20450</i> | -47 | acyclic terpene utilization AtuA family protein |
| 7.67 (4.04) | <i>ydhY</i> | <i>XF37_RS12865</i> | -263 | ferredoxin-likeprotein |
| 7.35 (4.04) | <i>ydjA</i> | <i>XF37_RS12405</i> | -126 | NAD(P)H nitroreductase |
| 7.27 (3.36) | <i>dcuC</i> | <i>XF37_RS20980</i> | -46 | anaerobic C4-dicarboxylate transporterDcuC |
| 7.82 (3.51) | <i>yeiE</i> | <i>XF37_RS08800</i> | -38 | DNA-binding transcriptional regulator YeiE |
| 7.92 (4.19) | | <i>XF37_RS18115</i> | -45 | hypotheticalprotein |
| 7.86 (4.19) | | <i>XF37_RS07855</i> | -45 | hypotheticalprotein |
| 7.81 (4.19) | <i>yihO</i> | <i>XF37_RS27035</i> | -45 | MFS transporter |
| 8.57 (4.19) | <i>iclR</i> | <i>XF37_RS26285</i> | -44 | glyoxylate bypass operon transcriptional repressor IclR |
| 7.47 (4.19) | <i>ratA</i> | <i>XF37_RS06240</i> | -44 | type II toxin-antitoxin system toxin RatA |
| 7.45 (4.19) | <i>yfeR</i> | <i>XF37_RS07285</i> | -44 | LysRfamilytranscriptionalregulator |
| 7.53 (4.04) | <i>yfaA</i> | <i>XF37_RS08475</i> | -216 | DUF2138 domain-containingprotein |
| 7.28 (4.04) | <i>yfcV</i> | <i>XF37_RS07915</i> | -77 | type 1 fimbrialprotein |
| 7.52 (4.19) | <i>cecR</i> | <i>XF37_RS19810</i> | -42 | DNA-binding transcriptional regulator CecR |
| 7.51 (3.51) | | <i>XF37_RS18030</i> | -42 | molecular chaperone |
| 7.22 (3.14) | | <i>XF37_RS24800</i> | -42 | MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|--|
| 7.21 (4.04) | | <i>XF37_RS07750</i> | -42 | HNH endonuclease |
| 7.20 (3.34) | <i>yibH</i> | <i>XF37_RS01155</i> | -42 | HlyDfamilysecretionprotein |
| 7.85 (4.19) | <i>yhaJ</i> | <i>XF37_RS03665</i> | -114 | DNA-binding transcriptional regulator YhaJ |
| 7.74 (4.04) | <i>hxpA</i> | <i>XF37_RS08150</i> | -39 | hexitolphosphataseHxpA |
| 9.13 (4.04) | <i>yhhX</i> | <i>XF37_RS02115</i> | -234 | oxidoreductase |
| 7.21 (3.36) | <i>yhjR</i> | <i>XF37_RS01470</i> | -270 | cellulosebiosynthesisproteinBcsR |
| 7.33 (4.19) | <i>ydeP</i> | <i>XF37_RS13925</i> | -39 | acidresistance putative oxidoreductaseYdeP |
| 8.43 (4.19) | | <i>XF37_RS20110</i> | -38 | hypotheticalprotein |
| 7.35 (3.36) | <i>yiaY</i> | <i>XF37_RS01190</i> | -154 | L-threoninedehydrogenase |
| 7.29 (3.58) | <i>yjaB</i> | <i>XF37_RS26315</i> | -30 | acetyltransferase |
| 7.51 (2.91) | | <i>XF37_RS22730</i> | -37 | hypotheticalprotein |
| 7.42 (3.47) | <i>yjcS</i> | <i>XF37_RS25810</i> | -216 | alkyl sulfatase YjcS |
| 7.22 (3.19) | <i>escP</i> | <i>XF37_RS00595</i> | -37 | type III secretion system LEE needle length regulator EscP |
| 9.04 (4.19) | <i>mdtJ</i> | <i>XF37_RS13250</i> | -36 | multidrug/spermidine efflux SMR transporter subunit MdtJ |
| 7.98 (4.04) | <i>glk</i> | <i>XF37_RS07375</i> | -36 | glucokinase |
| 7.28 (3.44) | <i>nudK</i> | <i>XF37_RS07040</i> | -36 | GDP-mannosepyrophosphataseNudK |
| 7.23 (3.38) | | <i>XF37_RS06095</i> | -36 | site-specific integrase |
| 7.56 (4.04) | | <i>XF37_RS18485</i> | -35 | class I SAM-dependent methyltransferase |
| 7.56 (4.04) | | <i>XF37_RS16265</i> | -35 | class I SAM-dependent methyltransferase |
| 7.46 (4.19) | <i>yjeJ</i> | <i>XF37_RS25490</i> | -50 | YjeJfamilyprotein |

| | | | | |
|-------------|-------------|---------------------|------|---|
| 7.49 (4.19) | <i>gcd</i> | <i>XF37_RS23645</i> | -34 | quinoproteinglucosedehydrogenase |
| 7.47 (3.47) | <i>lgoT</i> | <i>XF37_RS24515</i> | -33 | MFS transporter |
| 7.44 (3.36) | <i>hcp</i> | <i>XF37_RS19385</i> | -32 | hydroxylaminedeductase |
| 7.40 (4.04) | <i>yjgM</i> | <i>XF37_RS24930</i> | -32 | GNAT family N-acetyltransferase |
| 7.21 (2.76) | <i>yjfZ</i> | <i>XF37_RS25190</i> | -138 | DUF2686 familyprotein |
| 7.33 (3.19) | <i>adhE</i> | <i>XF37_RS15825</i> | -31 | bifunctionalacetaldehyde-CoA/alcoholdehydrogenase |
| 7.32 (3.33) | <i>nagA</i> | <i>XF37_RS20730</i> | -30 | N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase |
| 7.44 (4.04) | <i>yjiC</i> | <i>XF37_RS24680</i> | -56 | DUF2686 familyprotein |
| 7.49 (3.44) | <i>ynhF</i> | <i>XF37_RS12950</i> | -96 | cytochrome bd-I accessory subunit CydH |
| 7.27 (3.19) | <i>yojI</i> | <i>XF37_RS08535</i> | -75 | microcin J25 efflux ABC transporter YojI |
| 7.52 (4.04) | <i>ypjA</i> | <i>XF37_RS06080</i> | -300 | adhesin-likeautotransporterYpjA/EhaD |
| 7.60 (3.51) | <i>yqeF</i> | <i>XF37_RS05110</i> | -50 | acetyl-CoA C-acetyltransferase |
| 7.39 (3.58) | <i>ysdE</i> | <i>XF37_RS00355</i> | -70 | proteinYsdE |

7. ANEXO II

Tabla 12: Analisis de expresión diferencial. Genes expresados diferencialmente en lacepa salvaje cultivada en medio LB limitado en hierro (+ 300 μ M BPD) y la cepa Δfur a diferencia de la cepa salvaje cultivada en medio LB y su anotación estructural según su localización en fagos o en islas genómicas donde: (1) islas de patogenicidad; (2) islas simbióticas; (3) islas metabólicas; y (4) islas de resistencia.

| Gen ID | Descripción | Gen | Proceso biológico | Secuencia fur-box | Fago | Islas genómicas | salvaje + BPD vs salvaje | | Δfur vs salvaje | |
|--------------|--|-----------------------------------|--|-------------------|------|-----------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | | P.Value | Fold Change | P.Value | Fold Change |
| XF37_RS00035 | ATP synthase subunit delta | <i>atpHpapEuncH b3735 JW3713</i> | proton motive force-driven ATP synthesis | No | No | No | 3,85E-04 | 1,66 | | |
| XF37_RS00040 | ATP synthase subunit alpha | <i>atpApapAuncA b3734 JW3712</i> | proton motive force-driven ATP synthesis | No | No | No | 3,00E-04 | 1,79 | | |
| XF37_RS00045 | ATP synthase gamma chain | <i>atpGpapCuncG b3733 JW3711</i> | proton motive force-driven ATP synthesis | No | No | No | 1,60E-04 | 1,77 | 2,02E-04 | 1,55 |
| XF37_RS00130 | hypothetical protein | | | Sí | No | No | 1,73E-04 | -3,19 | | |
| XF37_RS00255 | Sugar phosphatase YidA | <i>yidA b3697 JW3674</i> | | No | No | No | 5,53E-03 | 1,84 | 8,11E-04 | 1,66 |
| XF37_RS00285 | Small heat shock protein IbpA | <i>ibpA hslThpN b3687 JW3664</i> | negative regulation of translation | No | No | No | 2,85E-04 | -1,75 | 2,22E-04 | -1,75 |
| XF37_RS00290 | Small heat shock protein IbpB | <i>ibpB hslShtpE b3686 JW3663</i> | protein stabilization | No | No | No | 8,93E-03 | -3,61 | 7,70E-03 | -3,41 |
| XF37_RS0 | type III secretion system LEE effector | <i>espG</i> | | No | No | 1 | | | 3,76E-02 | -1,56 |

| | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--------------------------------------|--|----|----|----|--|----------|-------|----------|-------|
| 0480 | EspG | | | | | | | | | | |
| XF37_RS0 0870 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | No | | 1,05E-02 | | 1,58 | |
| XF37_RS0 0900 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | No | | 8,10E-03 | | 2,28 | |
| XF37_RS0 0930 | Orotatephosphori- bosyltransferase | <i>pyrE b3642 JW3617</i> | 'de novo' pyrimidinenucleo- basebiosyntheticprocess | No | No | No | | 1,57E-05 | 1,96 | 7,93E-06 | 1,93 |
| XF37_RS0 0935 | Nucleoidocclusion factor SlmA | <i>slmAttkyicB b3641 JW5641</i> | division septum site selec- tion | No | No | No | | 4,53E-05 | 1,61 | | |
| XF37_RS0 0945 | Coenzyme A biosyn- thesis bifunctional protein CoaBC | <i>coaBCdfp b3639 JW5642</i> | coenzyme A biosynthe- ticprocess | No | No | No | | 7,56E-03 | 1,68 | 5,67E-04 | 1,56 |
| XF37_RS0 1040 | 2-amino-3- ketobutyrate coenzyme A ligase | <i>kbl b3617 JW3592</i> | biosyntheticprocess | No | No | No | | 3,76E-04 | 1,70 | 9,78E-05 | 1,63 |
| XF37_RS0 1045 | L-threonine 3- dehydrogenase | <i>tdh b3616 JW3591</i> | L-serinebiosyntheticprocess | No | No | No | | 5,41E-05 | 1,92 | 5,81E-05 | 1,77 |
| XF37_RS0 1065 | 2 3-bisphosphoglyce- rate-independent phosphoglycerate mu- tase | <i>gpmIpgmIyibO b3612 JW3587</i> | cellularcarbohydratemetab- olicprocess | No | No | No | | 1,76E-04 | -1,80 | 5,51E-04 | -1,55 |
| XF37_RS0 1075 | Glutaredoxin 3 | <i>grxCyibM b3610 JW3585</i> | cell redox homeostasis | No | No | No | | | | 1,68E-04 | 2,06 |
| XF37_RS0 1100 | L-lactatedehydroge- nase | <i>lldDlctD b3605 JW3580</i> | aerobic respiration | No | No | No | | 7,44E-03 | -1,53 | | |
| XF37_RS0 1105 | Putative L-lactate- | <i>lldRlctR b3604 JW3579</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | | 3,74E-03 | -2,15 | 2,44E-03 | -1,75 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|---------------------------------------|----------------------------------|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| | dehydrogenaseoperon-regulatoryprotein | | | | | | | | | |
| XF37_RS01175 | putative GST-like protein YibF | <i>yibF b3592 JW3565</i> | glutathionemetabolicprocess | No | No | No | 8,96E-04 | 1,91 | 1,46E-04 | 1,73 |
| XF37_RS01255 | Periplasmicalpha-amylase | <i>malS b3571 JW3543</i> | alpha-glucancatabolicprocess | No | No | No | 2,32E-02 | -2,15 | 3,03E-02 | -1,83 |
| XF37_RS01335 | Cold shock proteinCspA | <i>cspAcspS b3556 JW3525</i> | negative regulation of termination of DNA-templated transcription | No | No | No | 2,92E-02 | -2,54 | 2,64E-02 | -2,99 |
| XF37_RS01345 | hypotheticalprotein | <i>yiaF b3554 JW5655</i> | | No | No | No | | | 9,67E-06 | -1,76 |
| XF37_RS01350 | Glyoxylate/hydroxypyruvatereductase B | <i>ghrBtkrAyaie b3553 JW5656</i> | D-gluconatemetabolicprocess | No | No | No | 1,59E-03 | 2,28 | 3,37E-03 | 2,10 |
| XF37_RS01455 | Cellulosebiosynthesis-proteinBcsG | <i>bcsGyhjU b3538 JW3506</i> | cellulosebiosyntheticprocess | No | No | No | 6,50E-04 | -1,81 | 4,83E-04 | -1,62 |
| XF37_RS01550 | Cytoplasmictrehalase | <i>treF b3519 JW3487</i> | cellularhyperosmotic response | No | No | No | | | 2,34E-02 | 1,56 |
| XF37_RS01555 | hypotheticalprotein | <i>yhjA b3518 JW3486</i> | anaerobicelectrontransportchain | No | No | No | 3,04E-03 | -2,50 | 2,78E-03 | -2,28 |
| XF37_RS01600 | Acid stress chaperone HdeA | <i>hdeAyhCyhiB b3510 JW3478</i> | cellular response to acidic pH | No | No | No | | | 3,66E-02 | 1,69 |
| XF37_RS01615 | Hemin import ATP-binding protein HmuV | <i>fhuC b0151 JW0147</i> | iron ion import across plasma membrane | No | No | No | 1,38E-05 | 1,97 | 9,43E-06 | 2,08 |
| XF37_RS01625 | hypotheticalprotein | | | No | No | No | 1,44E-03 | 3,70 | 2,05E-05 | 3,72 |
| XF37_RS0 | Intracellular heme | | | No | No | No | 4,55E-05 | 2,07 | 2,47E-05 | 1,85 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|-------------------------------------|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| 1630 | transport protein HutX | | | | | | | | | |
| XF37_RS0 1635 | Anaerobilinsynthase | <i>hemNyhJ b3867 JW3838</i> | porphyrin-containing com- pound biosynthetic process | No | No | No | 2,22E-04 | 2,51 | 2,84E-04 | 2,38 |
| XF37_RS0 1640 | Hemin-binding periplasmic protein HmuT | <i>btuFyadT b0158 JW0154</i> | cobalamintransport | No | No | No | 5,79E-03 | 2,57 | 1,82E-04 | 2,80 |
| XF37_RS0 1645 | Hemin receptor | <i>cirAcirfeuA b2155 JW2142</i> | iron ion homeostasis | Sí | No | No | 1,76E-05 | 2,23 | 8,45E-03 | 4,28 |
| XF37_RS0 1650 | Hemintransportprotei- nHemS | | | No | No | No | 2,26E-03 | 3,88 | 1,12E-03 | 6,65 |
| XF37_RS0 1690 | Glutathionereductase | <i>gor b3500 JW3467</i> | cell redox homeostasis | No | No | No | 2,26E-03 | 1,55 | | |
| XF37_RS0 1850 | Nickel-bindingperi- plasmicprotein | <i>nika b3476 JW3441</i> | negative chemotaxis | No | No | No | 9,58E-04 | -1,72 | 3,10E-03 | -1,68 |
| XF37_RS0 1880 | hypotheticalprotein | | | No | No | 1 | 3,15E-03 | 1,63 | | |
| XF37_RS0 1945 | hypotheticalprotein | | | No | No | 1 | 1,93E-02 | -2,39 | 2,40E-02 | -1,98 |
| XF37_RS0 2020 | Leu/Ile/Val-binding protein | <i>livJ b3460 JW3425</i> | branched-chain amino acid transport | Sí | No | No | 2,01E-02 | 1,60 | 2,44E-03 | 1,54 |
| XF37_RS0 2155 | Aspartate-semialdehy- dedehydrogenase | <i>asdhom b3433 JW3396</i> | 'de novo' L-methionine bio- synthetic process | No | No | No | 3,99E-05 | 1,58 | 2,72E-03 | 1,55 |
| XF37_RS0 2210 | Thiosulfatesulfur- transferaseGlpE | <i>glpE b3425 JW3388</i> | glycerolmetabolicprocess | No | No | No | 3,38E-03 | 1,53 | | |
| XF37_RS0 2255 | Maltodex- trinphosphorylase | <i>malP b3417 JW5689</i> | alpha-glucancatabolicpro- cess | No | No | No | 4,42E-02 | -1,70 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS0 2270 | Fe/S biogenesis protein NfuA | <i>nfuA</i> <i>gntY</i> <i>hgi</i> <i>b3414</i> <i>JW3377</i> | carbonutilization | No | No | No | 4,70E-04 | 1,79 | 3,69E-04 | 1,75 |
| XF37_RS0 2290 | putative [Fe-S]-dependent transcriptional repressor FeoC | <i>feoC</i> <i>yhgG</i> <i>b3410</i> <i>JW3373</i> | ironimportintocell | No | No | No | 2,95E-03 | -1,89 | 2,94E-03 | -1,60 |
| XF37_RS0 2465 | Nitrite reductase (NADH) small subunit | <i>nirD</i> <i>b3366</i> <i>JW3329</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 1,81E-02 | -3,81 | 1,83E-02 | -3,64 |
| XF37_RS0 2470 | Nitritereductase [NAD(P)H] | <i>nirB</i> <i>b3365</i> <i>JW3328</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 4,04E-02 | -5,74 | 4,11E-02 | -5,46 |
| XF37_RS0 2510 | cAMP-activated global transcriptional regulator CRP | <i>crp</i> <i>cap</i> <i>csm</i> <i>b3357</i> <i>JW5702</i> | carbon catabolite repression of transcription | No | No | No | 7,84E-06 | 1,62 | 1,28E-02 | 1,51 |
| XF37_RS0 2615 | Bacterioferritin | <i>bfr</i> <i>b3336</i> <i>JW3298</i> | intracellular sequestering of iron ion | No | No | No | 8,72E-03 | -1,58 | 3,84E-03 | -2,67 |
| XF37_RS0 2625 | 30S ribosomal protein S10 | <i>rpsJ</i> <i>nusE</i> <i>b3321</i> <i>JW3283</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 4,67E-02 | -1,56 | 3,73E-02 | -1,60 |
| XF37_RS0 2635 | 50S ribosomal protein L4 | <i>rplD</i> <i>eryA</i> <i>b3319</i> <i>JW3281</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 2,18E-02 | -1,66 | 1,61E-02 | -1,87 |
| XF37_RS0 2710 | 50S ribosomal protein L18 | <i>rplR</i> <i>b3304</i> <i>JW3266</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 4,53E-03 | -1,52 | 1,41E-03 | -1,56 |
| XF37_RS0 2925 | DNA-bindingprotein Fis | <i>fis</i> <i>b3261</i> <i>JW3229</i> | DNA-templatedtranscription | No | No | No | 1,99E-02 | -1,76 | 1,63E-02 | -1,76 |
| XF37_RS0 3125 | Glutamate synthase [NADPH] small chain | <i>gltD</i> <i>aspB</i> <i>b3213</i> <i>JW3180</i> | ammoniaassimilationcycle | No | No | No | 3,63E-04 | -1,58 | | |
| XF37_RS0 3130 | Glutamate synthase [NADPH] large chain | <i>gltB</i> <i>aspB</i> <i>b3212</i> <i>JW3179</i> | ammoniaassimilationcycle | No | No | No | 3,27E-02 | -1,53 | 2,92E-02 | -1,57 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--|--|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS0 3145 | GlyoxalaseElbB | <i>elbB elb2 yzzB b3209 JW3176</i> | isoprenoidbiosyntheticpro- cess | No | No | No | | 3,20E-03 | 1,58 | |
| XF37_RS0 3175 | Ribosomehibernation- promoting factor | <i>hpfyhbH b3203 JW3170</i> | negative regulationoftrans- lation | No | No | No | | 4,12E-04 | 2,11 | |
| XF37_RS0 3260 | 50S ribosomal protein L21 | <i>rplU b3186 JW3153</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 2,00E-02 | -1,66 | 7,88E-03 | -1,71 |
| XF37_RS0 3355 | 30S ribosome-binding factor | <i>rbfA P15B yhbB b3167 JW3136</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 3,15E-02 | -1,59 | | |
| XF37_RS0 3385 | ATP-dependent RNA helicase DeaD | <i>deaDcsdAmssBrhLD b3162 JW5531</i> | cellular response tocold | No | No | No | | 3,35E-03 | | -1,72 |
| XF37_RS0 3395 | hypotheticalprotein | <i>yhbW b3160 JW3129</i> | | No | No | No | 3,06E-04 | 1,68 | 8,79E-05 | 1,58 |
| XF37_RS0 3410 | Ubiquinone biosyn- thesis accessory factor UbiJ | <i>ubiTyhbT b3157 JW3126</i> | ubiquinone biosynthetic process from chorismate | No | No | No | 8,53E-04 | -2,37 | 8,66E-05 | -2,93 |
| XF37_RS0 3440 | hypotheticalprotein | <i>yraQ b3151 JW3120</i> | | No | No | No | 2,23E-03 | 2,30 | 7,10E-04 | 1,83 |
| XF37_RS0 3775 | Ribosomal RNA large subunit methyltrans- ferase G | <i>rlmGygjO b3084 JW5513</i> | rRNA base methylation | No | No | No | 1,31E-03 | -1,55 | 6,72E-04 | -1,61 |
| XF37_RS0 3835 | Aerotaxis receptor | <i>aer air yqjJ b3072 JW3043</i> | chemotaxis | Sí | No | No | 1,63E-02 | -2,10 | 1,56E-02 | -2,21 |
| XF37_RS0 3845 | NADPH-dependent ferric-chelate reduc- tase | <i>yqjH b3070 JW3041</i> | cellular response to iron ion starvation | Sí | No | No | 2,80E-03 | 1,59 | 3,53E-05 | 1,90 |
| XF37_RS0 3855 | G/U mismatch-spe- cific DNA glycosylase | <i>mugygjF b3068 JW3040</i> | base-excision repair, AP site formation | No | No | No | 1,76E-05 | 1,57 | 3,71E-04 | 1,87 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|---|---|--|----|----|----|----------|----------|----------------|
| XF37_RS03905 | Dihydroneopterinaldolase | <i>folBygiG b3058 JW3030</i> | folicacidbiosyntheticprocess | No | No | No | | 5,82E-03 | -1,52 |
| XF37_RS04000 | OutermembraneproteinTolC | <i>tolC colE1-i mtcBmu-kArefI toc weeA b3035 JW5503</i> | bile acid and bile salt transport | No | No | No | 1,55E-02 | -1,67 | |
| XF37_RS04015 | 3' 5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA | <i>cpdAicc b3032 JW3000</i> | cellwallmodification | No | No | No | | 6,88E-03 | 1,51 |
| XF37_RS04020 | hypotheticalprotein | <i>yqiAyzzI b3031 JW2999</i> | | No | No | No | 4,21E-02 | 1,56 | 3,57E-03 1,64 |
| XF37_RS04030 | Metal-pseudopaline receptor CntO | <i>fhuAtonA b0150 JW0146</i> | iron ion homeostasis | No | No | No | | 1,88E-02 | 1,54 |
| XF37_RS04050 | hypotheticalprotein | <i>fepB b0592 JW0584</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | | 7,87E-04 | 1,56 |
| XF37_RS04110 | hypotheticalprotein | <i>ygiQygiR b4469 JW5501</i> | | Sí | No | No | 2,19E-05 | -1,69 | 1,27E-05 -1,79 |
| XF37_RS04150 | BiopolymertransportproteinExbB | <i>exbB b3006 JW2974</i> | bacteriocintransport | Sí | No | No | | 1,17E-02 | 2,08 |
| XF37_RS04155 | BiopolymertransportproteinExbD | <i>exbD b3005 JW2973</i> | bacteriocintransport | No | No | No | 1,69E-03 | 2,09 | 5,62E-03 2,34 |
| XF37_RS04185 | Hydrogenase-2 small-chain | <i>hybOyghV b2997 JW2965</i> | anaerobicelectrontransportchain | No | No | No | | 5,62E-05 | -1,56 |
| XF37_RS04190 | Formatedehydrogenasenitrate-inducible iron-sulfursubunit | <i>hybA b2996 JW2964</i> | anaerobicelectrontransportchain | No | No | No | 2,30E-03 | -1,82 | 6,62E-04 -2,06 |
| XF37_RS04200 | Hydrogenase-2 largechain | <i>hybC b2994 JW2962</i> | anaerobicelectrontransportchain | No | No | No | | 1,13E-02 | -1,80 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|---|----------------------------------|--|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS04205 | Hydrogenase 2 maturation protease | <i>hybD b2993 JW2961</i> | protein modification process | No | No | No | | 1,06E-03 | -1,68 | |
| XF37_RS04400 | putative Fe(2+)-trafficking protein | <i>yggX b2962 JW2929</i> | cellular response to oxidative stress | No | No | No | 1,30E-02 | 2,48 | 5,41E-03 | 1,68 |
| XF37_RS04425 | L-asparaginase 2 | <i>ansB b2957 JW2924</i> | asparagine catabolic process | No | No | No | 1,27E-02 | -3,25 | 1,37E-02 | -3,10 |
| XF37_RS04475 | Glutathione synthetase | <i>gshB gsh-II b2947 JW2914</i> | glutathione biosynthetic process | No | No | No | 1,21E-04 | 1,56 | 5,49E-03 | 1,52 |
| XF37_RS04605 | Fructose-bisphosphate aldolase class 2 | <i>fbaA fba fda b2925 JW2892</i> | gluconeogenesis | No | No | No | 2,33E-03 | 1,70 | 4,88E-04 | 1,59 |
| XF37_RS04745 | tRNA-modifying protein YgfZ | <i>ygfZ yzzW b2898 JW2866</i> | iron-sulfur cluster assembly | No | No | No | 3,47E-03 | 1,58 | | |
| XF37_RS04790 | Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase | <i>idiygfV b2889 JW2857</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 2,07E-02 | 1,52 | 3,91E-04 | 1,76 |
| XF37_RS05345 | L-serine dehydratase 2 | <i>sdaB b2797 JW2768</i> | gluconeogenesis | No | No | No | 4,94E-03 | -1,94 | 1,30E-03 | -1,75 |
| XF37_RS05585 | Sulfate adenylyltransferase subunit 2 | <i>cysD b2752 JW2722</i> | hydrogen sulfide biosynthetic process | Sí | No | No | 8,43E-04 | 1,64 | 3,57E-04 | 1,63 |
| XF37_RS05705 | Hydrogenase maturation factor HypB | <i>hypB b2727 JW2697</i> | protein maturation | No | No | No | 2,11E-02 | -1,88 | 1,38E-02 | -2,16 |
| XF37_RS05760 | Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglH | <i>ascB b2716 JW2686</i> | carbohydrate catabolic process | No | No | No | 4,38E-03 | -1,63 | 4,36E-03 | -1,52 |
| XF37_RS05840 | Nicotinamide-nucleotide amidohydrolase PncC | <i>pncC ygaD b2700 JW2670</i> | pyridine nucleotide biosynthetic process | No | No | No | 3,82E-03 | 1,58 | 2,40E-03 | 1,78 |
| XF37_RS05905 | S-ribosylhomocysteinylase | <i>luxS ygaG b2687 JW2662</i> | L-methionine salvage from S-adenosylmethionine | No | No | No | 1,59E-03 | 1,94 | 2,92E-04 | 1,93 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|---|------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS05940 | Glycine betaine/proline betaine-binding periplasmic protein | <i>proXproU b2679 JW2654</i> | amino acid import across plasma membrane | No | No | No | 2,86E-03 | -1,53 | | |
| XF37_RS05950 | Glycine betaine/proline betaine transport system ATP-binding protein ProV | <i>proV b2677 JW2652</i> | amino acid import across plasma membrane | No | No | No | 2,89E-03 | -1,80 | 4,47E-03 | -1,78 |
| XF37_RS05955 | Ribonucleoside-diphosphate reductase 2 subunit beta | <i>nrdFygaD b2676 JW2651</i> | deoxyribonucleotide-biosyntheticprocess | No | No | No | 1,01E-06 | 5,83 | 1,50E-03 | 4,70 |
| XF37_RS05960 | Ribonucleoside-diphosphate reductase 2 subunit alpha | <i>nrdE b2675 JW2650</i> | deoxyribonucleotide-biosyntheticprocess | No | No | No | 1,98E-02 | 4,95 | 7,50E-03 | 4,02 |
| XF37_RS05965 | ProteinNrdI | <i>nrdIygaO b2674 JW2649</i> | proteinmodificationprocess | No | No | No | 1,50E-03 | 2,32 | 7,90E-05 | 2,17 |
| XF37_RS05970 | Glutaredoxin-likeproteinNrdH | <i>nrdHygaN b2673 JW2648</i> | cell redox homeostasis | No | No | No | 4,58E-04 | 3,67 | 1,06E-03 | 2,93 |
| XF37_RS05975 | hypotheticalprotein | <i>ynjA b1753 JW1742</i> | | No | No | No | 7,13E-04 | 1,82 | 5,08E-05 | 1,81 |
| XF37_RS06000 | DNA-bindingproteinStpA | <i>stpAhnsB b2669 JW2644</i> | | Sí | No | No | 4,49E-03 | -1,83 | 1,05E-02 | -1,50 |
| XF37_RS06215 | hypotheticalprotein | | | Sí | Sí | 1 | 1,98E-02 | -1,51 | 1,19E-02 | -1,55 |
| XF37_RS06285 | 30S ribosomal protein S16 | <i>rpsP b2609 JW2590</i> | cytoplasmictranslation | Sí | No | No | 2,52E-02 | -1,73 | 3,28E-02 | -1,65 |
| XF37_RS06305 | Peptidoglycan-associatedlipoprotein | <i>yfiB b2605 JW2586</i> | | No | No | No | 8,71E-03 | -1,73 | 1,45E-02 | -1,71 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS0 6345 | Ribosome-associate- dinhibitor A | <i>raiAyfiA b2597 JW2578</i> | negative regulation of trans- lational elongation | No | No | No | 3,14E-05 | -3,48 | | |
| XF37_RS0 6420 | Thioredoxin 2 | <i>trxCyfiG b2582 JW2566</i> | | No | No | No | 5,34E-03 | 1,69 | 1,90E-03 | 1,75 |
| XF37_RS0 6435 | Autonomously glycy- l radical cofactor | <i>grcAyfiD b2579 JW2563</i> | threonine catabolic process | Sí | No | No | 6,15E-04 | -2,29 | 2,75E-03 | -1,99 |
| XF37_RS0 6580 | Flavoheemoprotein | <i>hmpfsrBhmpA b2552 JW2536</i> | cellular response to nitrosa- tive stress | No | No | No | 4,77E-03 | 5,60 | 7,03E-04 | 3,06 |
| XF37_RS0 6585 | Serinehydroxymethyl- transferase | <i>glyA b2551 JW2535</i> | folic acid metabolic process | No | No | No | 6,66E-05 | 1,70 | 1,10E-03 | 1,61 |
| XF37_RS0 6715 | 2Fe-2S ferredoxin | <i>fdx b2525 JW2509</i> | electron transport chain | No | No | No | 2,42E-04 | -1,58 | 3,11E-04 | -1,55 |
| XF37_RS0 6820 | Inosine-5'-monop- hosphate dehydroge- nase | <i>guaBguaR b2508 JW5401</i> | GMP biosynthetic process | No | No | No | 1,99E-04 | 1,52 | | |
| XF37_RS0 6825 | GMP synthase [gluta- mine-hydrolyzing] | <i>guaA b2507 JW2491</i> | glutamine metabolic process | No | No | No | 5,14E-05 | 1,52 | 7,61E-05 | 1,59 |
| XF37_RS0 6870 | Phosphoribosyl- formylglycinamidi- necyclo-ligase | <i>purMpurG b2499 JW2484</i> | 'de novo' IMP biosyntheti- c process | No | No | No | 1,03E-04 | 1,60 | | |
| XF37_RS0 6890 | putative protein YfgD | <i>yfgD b2495 JW2480</i> | | No | No | No | | | 6,55E-03 | 1,58 |
| XF37_RS0 6985 | Phosphoribosylami- noimidazole-succino- carboxamidesynthase | <i>purC b2476 JW2461</i> | 'de novo' IMP biosyntheti- c process | No | No | No | 4,91E-03 | 1,53 | 3,16E-04 | 1,71 |
| XF37_RS0 7055 | Transaldolase | <i>talA b2464 JW2448</i> | carbohydrate metabolic pro- cess | No | No | No | | | 7,56E-03 | 1,60 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|---|-------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS07190 | N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase | <i>murQyfeU b2428 JW2421</i> | 1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramic acidcatabolicprocess | No | No | No | 2,87E-02 | -1,60 | | |
| XF37_RS07200 | OxidoreductaseUcpA | <i>ucpA yfeF b2426 JW5394</i> | | No | No | No | 6,29E-03 | -1,77 | 9,67E-04 | -1,70 |
| XF37_RS07255 | Cysteinesynthase A | <i>cysKcysZ b2414 JW2407</i> | cellular amino acid biosynthetic process | No | No | No | | | 6,40E-03 | 1,55 |
| XF37_RS07335 | hypotheticalprotein | <i>yfeC b2398 JW2393</i> | | No | No | No | 9,10E-03 | -1,69 | 1,33E-02 | -1,61 |
| XF37_RS07375 | Glucokinase | <i>glk b2388 JW2385</i> | glycolyticprocess | Sí | No | No | 1,09E-02 | -1,73 | | |
| XF37_RS07420 | Glutamate-pyruvateaminotransferaseAlaC | <i>alaCyfdZ b2379 JW2376</i> | alaninebiosyntheticprocess | Sí | No | No | 7,50E-03 | 2,48 | 3,88E-03 | 2,32 |
| XF37_RS07445 | ProteinYfdX | <i>yfdX b2375 JW2372</i> | | Sí | No | No | 4,12E-04 | 1,50 | | |
| XF37_RS07895 | hypotheticalprotein | <i>yfcZ b2343 JW2340</i> | | No | No | No | 8,72E-03 | -1,80 | 1,13E-02 | -1,66 |
| XF37_RS08055 | Amidophosphoribosyltransferase | <i>purF b2312 JW2309</i> | 'de novo' IMP biosyntheticprocess | No | No | No | 2,38E-02 | 1,57 | | |
| XF37_RS08070 | Histidine-bindingperiplasmicprotein | <i>hisJ b2309 JW2306</i> | L-histidine import across plasma membrane | Sí | No | No | | | 2,03E-04 | 1,59 |
| XF37_RS08105 | Disulfide-bond oxidoreductaseYfcG | <i>yfcG b2302 JW2299</i> | response to oxidative stress | No | No | No | | | 2,27E-03 | 1,59 |
| XF37_RS08130 | Phosphateacetyltransferase | <i>pta b2297 JW2294</i> | acetatebiosyntheticprocess | No | No | No | 1,05E-02 | 1,74 | 9,89E-05 | 1,51 |
| XF37_RS08135 | Acetatekinase | <i>ackAack b2296 JW2293</i> | acetatebiosyntheticprocess | No | No | No | 4,19E-03 | 1,53 | 2,47E-03 | 1,51 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS0 8140 | hypotheticalprotein | <i>yfbV b2295 JW2292</i> | negative regulation of chromosome organization | No | No | No | 9,61E-05 | -2,05 | 1,04E-02 | -1,93 |
| XF37_RS0 8170 | HTH-type transcriptional regulator HdfR | <i>lrhA genR b2289 JW2284</i> | DNA-templated transcription | No | No | No | 1,87E-02 | -1,55 | | |
| XF37_RS0 8180 | NADH-quinone oxidoreductase subunit B | <i>nuoB b2287 JW5875</i> | aerobic respiration | No | No | No | 2,38E-03 | -2,71 | 5,74E-04 | -2,74 |
| XF37_RS0 8185 | NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D | <i>nuoC nuoD b2286 JW5375</i> | respiratory electron transport chain | No | No | No | 1,27E-03 | -2,19 | 5,54E-03 | -2,26 |
| XF37_RS0 8190 | NADH-quinone oxidoreductase subunit E | <i>nuoE b2285 JW2280</i> | respiratory electron transport chain | No | No | No | 2,46E-04 | -2,53 | 2,03E-03 | -2,36 |
| XF37_RS0 8195 | NADH-quinone oxidoreductase subunit F | <i>nuoF b2284 JW2279</i> | aerobic respiration | No | No | No | 1,63E-02 | -1,78 | 9,58E-03 | -1,83 |
| XF37_RS0 8200 | NADH-quinone oxidoreductase subunit G | <i>nuoG b2283 JW2278</i> | aerobic respiration | No | No | No | 1,79E-02 | -2,82 | 1,71E-02 | -2,99 |
| XF37_RS0 8210 | NADH-quinone oxidoreductase subunit I | <i>nuoI b2281 JW2276</i> | aerobic respiration | No | No | No | 3,21E-05 | -2,63 | 8,32E-06 | -2,70 |
| XF37_RS0 8320 | putative 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase ArnD | <i>arnD pmrJ yfbH b2256 JW2250</i> | 4-amino-4-deoxy-alpha-L-arabinopyranosyl undecaprenyl phosphate biosynthetic process | No | No | No | 2,42E-03 | -1,57 | | |
| XF37_RS0 8330 | Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase | <i>arnC pmrF yfbF b2254 JW2248</i> | 4-amino-4-deoxy-alpha-L-arabinopyranosyl undecaprenyl phosphate biosynthetic process | No | No | No | 4,39E-02 | -1,90 | | |
| XF37_RS0 8350 | hypotheticalprotein | <i>yfaZ b2250 JW5371</i> | | No | No | No | 3,39E-02 | -1,66 | 3,24E-02 | -1,61 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS0 8395 | Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C | <i>glpC b2243 JW2237</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 1,72E-02 | -3,20 | 1,80E-02 | -3,20 |
| XF37_RS0 8400 | Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B | <i>glpB b2242 JW2236</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 9,94E-03 | -2,32 | 1,12E-02 | -2,16 |
| XF37_RS0 8405 | Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A | <i>glpA b2241 JW2235</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 3,26E-02 | -2,32 | 3,30E-02 | -2,26 |
| XF37_RS0 8415 | Glycerophosphodiesterphosphodiesteraseperiplasmic | <i>glpQ b2239 JW2233</i> | glycerolmetabolicprocess | Sí | No | No | 1,70E-03 | -2,81 | 7,95E-04 | -2,08 |
| XF37_RS0 8425 | HTH-type transcriptional regulator GltC | <i>yfaH b2238 JW2232</i> | | No | No | No | | | 1,54E-03 | 1,68 |
| XF37_RS0 8445 | Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta | <i>nrdBftsB b2235 JW2229</i> | 2'-deoxyribonucleotide biosyntheticprocess | No | No | No | 1,26E-02 | 2,11 | 2,61E-02 | 2,10 |
| XF37_RS0 8455 | Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit alpha | <i>nrdAdnaF b2234 JW2228</i> | 2'-deoxyribonucleotide biosyntheticprocess | No | No | No | 2,35E-02 | 2,49 | 5,48E-03 | 2,01 |
| XF37_RS0 8515 | Outermembraneprotein C | <i>ompCmeoA par b2215 JW2203</i> | cellular response to DNA damage stimulus | Sí | No | No | 4,22E-02 | -2,19 | 2,62E-02 | -2,13 |
| XF37_RS0 8540 | Malate:quinoneoxidoreductase | <i>mqoyojH b2210 JW2198</i> | tricarboxylicacidcycle | Sí | No | No | 8,37E-04 | 1,50 | | |
| XF37_RS0 8560 | Periplasmicnitratereductase | <i>napAyojCyoyDyojE b2206 JW2194</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 3,04E-02 | -2,65 | 3,28E-02 | -2,48 |
| XF37_RS0 8625 | Nitrate/nitrite res- | <i>narP b2193 JW2181</i> | nitrateassimilation | No | No | No | 2,56E-03 | -1,62 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|-------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| | ponse regulatorprotei- nNarL | | | | | | | | | |
| XF37_RS0 8655 | 50S ribosomal protein L25 | <i>rply b2185 JW2173</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 2,61E-02 | -1,65 | 3,33E-02 | -1,59 |
| XF37_RS0 8675 | putative proteinYejG | <i>yejG b2181 JW2169</i> | | No | No | No | | | 4,69E-03 | -1,52 |
| XF37_RS0 8790 | Endonuclease 4 | <i>nfo b2159 JW2146</i> | base-excisionrepair | No | No | No | 9,56E-05 | 1,65 | | |
| XF37_RS0 8810 | Colicin I receptor | <i>cirAcirfeuA b2155 JW2142</i> | iron ion homeostasis | Sí | No | No | 4,67E-04 | 2,63 | 3,93E-03 | 3,20 |
| XF37_RS0 8835 | D-galactose-binding periplasmic protein | <i>mglB b2150 JW2137</i> | chemotaxis | Sí | No | No | 2,45E-03 | -2,11 | | |
| XF37_RS0 8855 | NAD-dependentdihy- dropyrimidinedehy- drogenasesubunitPreT | <i>preTyeiT b2146 JW2133</i> | pyrimidinenucleobasecata- bolicprocess | No | No | No | 3,35E-02 | -1,69 | 2,79E-02 | -1,80 |
| XF37_RS0 8870 | Cytidinedeaminase | <i>cdd b2143 JW2131</i> | cytidinedeamination | No | No | No | | | 3,14E-04 | 1,69 |
| XF37_RS0 9070 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | 8,80E-03 | -1,94 | 9,22E-03 | -1,97 |
| XF37_RS0 9455 | Transcriptional repres- sorRcnR | <i>rcnRyohL b2105 JW2092</i> | negative regulation of DNA-templated transcrip- tion | Sí | No | No | 8,90E-03 | -1,52 | | |
| XF37_RS0 9510 | Fructose-bisphospha- tealdolaseclass 1 | <i>fbaBdhna b2097 JW5344</i> | glycolyticprocess | No | No | No | 4,05E-03 | 1,56 | | |
| XF37_RS0 9565 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | 2,90E-03 | -1,67 | | |
| XF37_RS0 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | 1,84E-03 | -1,76 | 5,54E-03 | -1,55 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--------------------------------------|--|----|----|----------|----------|-------|----------|-------|
| 9610 | | | | | | | | | | |
| XF37_RS0 9880 | hypotheticalprotein | | | No | No | No | 1,88E-02 | -1,52 | | |
| XF37_RS0 9945 | GDP-mannose 4 6- dehydratase | <i>gmdyefAyefN b2053 JW2038</i> | 'de novo' GDP-L-fucose- biosyntheticprocess | No | No | No | 3,13E-03 | 1,52 | 3,64E-02 | 1,74 |
| XF37_RS0 9950 | GDP-L-fucosesynt- hase | <i>fchwcaGyefB b2052 JW2037</i> | 'de novo' GDP-L-fucose- biosyntheticprocess | No | No | No | 3,37E-02 | 1,95 | 1,51E-03 | 1,60 |
| XF37_RS0 9970 | Phosphomannomu- tase/phosphoglucomu- tase | <i>manBcpsGrfbl b2048 JW2033</i> | GDP-mannosebiosynthe- ticprocess | No | No | No | | | 1,09E-03 | 1,54 |
| XF37_RS1 0010 | UDP-Glc:alpha-D- GlcNAc-dip- hosphoundecaprenol beta-1 3-glucosyl- transferase WfgD | <i>yibD b3615 JW3590</i> | cellular response to phos- phate starvation | Sí | No | 2, 3 & 4 | | | 8,98E-03 | -1,57 |
| XF37_RS1 0040 | GDP-mannose 4 6- dehydratase | <i>gmdyefAyefN b2053 JW2038</i> | 'de novo' GDP-L-fucose- biosyntheticprocess | No | No | 2, 3 & 4 | 1,14E-03 | -1,84 | 5,33E-04 | -1,65 |
| XF37_RS1 0090 | Histidine biosynthesis bifunctional protein HisIE | <i>hisIhisIE b2026 JW2008</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 5,50E-03 | 3,03 | 2,30E-06 | 2,97 |
| XF37_RS1 0095 | Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF | <i>hisF b2025 JW2007</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 5,56E-03 | 1,98 | 3,67E-05 | 2,17 |
| XF37_RS1 0100 | 1-(5-phosphoribosyl)- 5-[(5-phosphoribosy- lamino)methylideneam- ino] imidazole-4- | <i>hisA b2024 JW2006</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 1,16E-02 | 1,81 | 2,68E-05 | 2,00 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------|--|--------------------------------------|------------------------------------|----|----|----|----------|-------|----------|------|
| | carboxamide isomerase | | | | | | | | | |
| XF37_RS1_0105 | Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH | <i>hisH b2023 JW2005</i> | glutaminemetabolicprocess | No | No | No | 1,53E-03 | 2,18 | 5,86E-05 | 2,23 |
| XF37_RS1_0110 | Histidine biosynthesis bifunctional protein HisB | <i>hisB b2022 JW2004</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 4,79E-04 | 2,20 | 1,49E-03 | 2,26 |
| XF37_RS1_0115 | Histidinol-phosphate aminotransferase | <i>hisC b2021 JW2003</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 4,50E-03 | 2,58 | 2,05E-03 | 2,73 |
| XF37_RS1_0120 | Histidinoldehydrogenase | <i>hisD b2020 JW2002</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 1,81E-03 | 2,25 | 2,93E-06 | 2,13 |
| XF37_RS1_0125 | ATP phosphoribosyltransferase | <i>hisG b2019 JW2001</i> | histidinebiosyntheticprocess | No | No | No | 2,72E-05 | 1,92 | 2,34E-04 | 1,99 |
| XF37_RS1_0160 | Putative sulfur carrier protein YeeD | <i>yeeD b2012 JW1994</i> | | No | No | No | | | 1,60E-02 | 1,57 |
| XF37_RS1_0305 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | No | 6,25E-04 | -1,88 | | |
| XF37_RS1_0390 | Shiga toxin subunit A | | | No | Sí | No | | | 1,35E-02 | 1,52 |
| XF37_RS1_0685 | Colicin I receptor | <i>yoeA b4582 JW1980 b1995 b1998</i> | siderophoretransmembrane-transport | No | No | 1 | | | 3,13E-03 | 1,51 |
| XF37_RS1_0755 | putative FMN/FAD exporter YeeO | <i>yeeO b1985 JW1965</i> | dipeptidetransmembrane-transport | No | No | No | 1,44E-03 | 1,74 | 3,08E-02 | 2,00 |
| XF37_RS1_0870 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | | | 2,31E-03 | 1,57 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------------------|--|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 1145 | Protein/nucleicacid-deglycase 1 | <i>hchAyedUyzzC b1967 JW1950</i> | DNA repair | No | No | No | | | 1,52E-03 | 1,57 |
| XF37_RS1 1230 | FlagellarproteinFliO | <i>fliOflaPflbD b1947 JW5316</i> | bacterial-typeflagellumorganization | No | No | No | 2,62E-04 | -1,65 | 5,32E-03 | -1,93 |
| XF37_RS1 1235 | Flagellar motor switch protein FliN | <i>fliNflaNmotD b1946 JW1930</i> | bacterial-type flagellum-dependent swimming motility | No | No | No | 1,87E-02 | -2,28 | 1,08E-02 | -4,74 |
| XF37_RS1 1240 | Flagellar motor switch protein FliM | <i>fliM cheC2 fla AII fla QII b1945 JW1929</i> | bacterial-type flagellum-dependent swimming motility | No | No | No | | | 5,63E-03 | -2,12 |
| XF37_RS1 1245 | hypotheticalprotein | <i>fliL cheC1 fla AI fla QI b1944 JW1928</i> | bacterial-type flagellum-dependent swarming motility | No | No | No | 2,67E-04 | -1,91 | 1,44E-04 | -2,81 |
| XF37_RS1 1270 | Flagellar motor switch protein FliG | <i>fliGfla AII.2 fla BII b1939 JW1923</i> | bacterial-typeflagellumassembly | No | No | No | 1,13E-02 | -2,64 | 8,61E-03 | -5,57 |
| XF37_RS1 1275 | Flagellar M-ring protein | <i>fliF fla AII.1 fla BI b1938 JW1922</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | 9,97E-03 | -2,26 | 8,66E-03 | -3,50 |
| XF37_RS1 1310 | Putative sulfur carrier protein YedF | <i>yedF b1930 JW1915</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 2,62E-04 | -1,55 | | |
| XF37_RS1 1335 | Flagellarsecretion chaperone FliS | <i>fliS b1925 JW1910</i> | bacterial-typeflagellumassembly | No | No | No | 8,58E-03 | -2,60 | 6,36E-03 | -4,80 |
| XF37_RS1 1340 | Flagellarhook-associatedprotein 2 | <i>fliDflaVflbC b1924 JW1909</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | 4,64E-03 | -2,12 | 6,23E-03 | -2,71 |
| XF37_RS1 1345 | hypotheticalprotein | <i>fliCflaF hag b1923 JW1908</i> | | No | No | No | 1,25E-02 | -4,41 | 9,80E-03 | -9,39 |
| XF37_RS1 1350 | RNA polymerase sigma factor FliA | <i>fliAflaDrpoF b1922 JW1907</i> | bacterial-typeflagellumassembly | No | No | No | 1,85E-02 | -1,66 | 9,75E-03 | -2,97 |
| XF37_RS1 1525 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | | | 1,73E-02 | -1,50 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|--|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS1 1535 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | | 1,93E-02 | -1,86 | |
| XF37_RS1 1540 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | | 7,66E-03 | -2,18 | |
| XF37_RS1 1575 | hypotheticalprotein | | | No | Sí | 1 | 6,45E-03 | -1,83 | 1,09E-02 | -1,85 |
| XF37_RS1 1610 | Bacterial non-heme ferritin | <i>fnAfm gen-165 rsgA b1905 JW1893</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 4,39E-06 | -2,67 | 1,53E-04 | -3,66 |
| XF37_RS1 1630 | hypotheticalprotein | <i>yecJ b4537 JW1891</i> | | No | No | No | | | 3,47E-03 | -2,16 |
| XF37_RS1 1660 | Trehalose-6-phosphate synthase | <i>otsA b1896 JW5312</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | | | 3,31E-06 | -1,89 |
| XF37_RS1 1690 | Chemotaxisprotein-CheA | <i>cheA b1888 JW1877</i> | aerotaxis | No | No | No | 2,50E-03 | -1,75 | 3,82E-03 | -2,21 |
| XF37_RS1 1695 | Chemotaxisprotein-CheW | <i>cheW b1887 JW1876</i> | aerotaxis | No | No | No | 1,22E-02 | -2,88 | 1,40E-02 | -3,90 |
| XF37_RS1 1700 | Methyl-accepting chemotaxis protein II | <i>tarcheM b1886 JW1875</i> | cellular response to amino acid stimulus | No | No | No | 2,22E-02 | -3,36 | 1,87E-02 | -4,50 |
| XF37_RS1 1720 | Chemotaxisprotein-CheY | <i>cheY b1882 JW1871</i> | aerotaxis | No | No | No | 5,22E-04 | -2,10 | 1,11E-03 | -2,82 |
| XF37_RS1 1725 | Proteinphosphatase-CheZ | <i>cheZ b1881 JW1870</i> | bacterial-type flagellum-dependent swarming motility | No | No | No | 9,01E-03 | -2,34 | 8,18E-03 | -3,32 |
| XF37_RS1 1930 | Murein DD-endopeptidaseMepM | <i>mepMyebA b1856 JW5304</i> | capsule polysaccharide-biosyntheticprocess | No | No | No | 1,08E-02 | -1,72 | 1,88E-03 | -1,84 |
| XF37_RS1 1950 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | <i>zwf b1852 JW1841</i> | glucosemetabolicprocess | No | No | No | 1,71E-03 | 1,52 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 1970 | hypotheticalprotein | <i>yebG b1848 JW1837</i> | DNA repair | No | No | No | 9,36E-03 | -1,69 | 7,72E-03 | -1,80 |
| XF37_RS1 1975 | ProteinYebF | <i>yebF b1847 JW1836</i> | | No | No | No | 1,58E-02 | 2,00 | 2,04E-03 | 1,90 |
| XF37_RS1 1980 | Innermembraneprotei- nYebE | <i>yebE b1846 JW1835</i> | | Sí | No | No | 1,59E-03 | -1,50 | | |
| XF37_RS1 2005 | ProteinYobA | <i>yobA b1841 JW1830</i> | copper ion transport | No | No | No | 2,27E-02 | -2,03 | 3,10E-02 | -2,26 |
| XF37_RS1 2015 | hypotheticalprotein | <i>yebY b1839 JW1828</i> | | No | No | No | 1,66E-02 | 2,15 | 3,89E-04 | 2,10 |
| XF37_RS1 2065 | ProteaseHtpX | <i>htpX b1829 JW1818</i> | proteolysis | No | No | No | 1,76E-04 | -1,62 | | |
| XF37_RS1 2130 | PTS system mannose- specific EIIAB com- ponent | <i>manXgptBptsL b1817 JW1806</i> | glucose import across plasma membrane | No | No | No | 5,05E-05 | -2,12 | 1,76E-03 | -1,52 |
| XF37_RS1 2205 | Carnitinemonooxyge- naseoxygenasesubunit | <i>yeaW b1802 JW5294</i> | carnitinemetabolicprocess | No | No | No | 4,53E-03 | -2,04 | 5,67E-03 | -1,86 |
| XF37_RS1 2230 | putative proteinYeaR | <i>yeaR b1797 JW1786</i> | | No | No | No | | | 6,40E-03 | 2,16 |
| XF37_RS1 2235 | ProteinYoaG | <i>yoaG b1796 JW1785</i> | | No | No | No | | | 5,24E-03 | 2,41 |
| XF37_RS1 2275 | HTH-type transcrip- tional regulator NimR | <i>nimRyeaM b1790 JW1779</i> | negative regulation of DNA-templated transcrip- tion | No | No | No | 2,47E-02 | -1,61 | 2,61E-02 | -1,63 |
| XF37_RS1 2315 | MltA-interactingpro- tein | <i>mipAyeaF b1782 JW1771</i> | peptidoglycanbiosynthe- ticprocess | No | No | No | 2,83E-02 | -1,51 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|----------------------------------|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 2345 | D-arabitol-phosphate- dehydrogenase | <i>ydjL b1776 JW1765</i> | | No | No | No | 1,43E-02 | -1,89 | 5,60E-03 | -1,77 |
| XF37_RS1 2355 | putative zinc-type al- cohol dehydrogenase- like protein YdjJ | <i>ydjJ b1774 JW1763</i> | | No | No | No | 6,53E-03 | -1,88 | 2,26E-03 | -1,69 |
| XF37_RS1 2360 | putative protein YdjI | <i>ydjI b1773 JW1762</i> | carbohidratemetabolicpro- cess | No | No | No | 6,77E-03 | -1,67 | | |
| XF37_RS1 2425 | NADP-specificgluta- matedehydrogenase | <i>gdhA b1761 JW1750</i> | glutamatedehydrogenasepro- cess | No | No | No | | | 2,85E-02 | 1,69 |
| XF37_RS1 2445 | Thiosulfatesulfur- transferase YnjE | <i>ynjE b1757 JW5287</i> | transsulfuration | No | No | No | 6,70E-04 | -1,57 | 1,13E-04 | -1,59 |
| XF37_RS1 2515 | Periplasmic chaperone Spy | <i>spy b1743 JW1732</i> | chaperone-mediatedprotein- folding | No | No | No | | | 3,28E-03 | 1,90 |
| XF37_RS1 2550 | PTS system N N'-di- acetylchitobiose-spe- cific EIIA component | <i>chbAcelC b1736 JW1725</i> | N,N'-diacetylchitobioseim- port | No | No | No | 9,43E-03 | -1,84 | 1,40E-02 | -1,68 |
| XF37_RS1 2615 | ATP-dependent 6- phosphofructokinase isozyme 2 | <i>pfkB b1723 JW5280</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 3,21E-03 | 1,56 | 5,85E-03 | 1,73 |
| XF37_RS1 2720 | Phosphoenolpyruva- tesynthase | <i>ppsA b1702 JW1692</i> | gluconeogenesis | No | No | No | 1,38E-03 | 1,87 | 8,65E-03 | 1,70 |
| XF37_RS1 2800 | putative protein | <i>ydiJ b1687 JW1677</i> | lactatecatabolicprocess | No | No | No | 4,00E-03 | -2,19 | 2,63E-03 | -2,19 |
| XF37_RS1 2810 | hypotheticalprotein | <i>ydiH b1685 JW1675</i> | | No | No | No | | | 2,05E-02 | 1,52 |
| XF37_RS1 2815 | ProteinSufA | <i>sufAydiC b1684 JW1674</i> | iron-sulfurclusterassembly | Sí | No | No | 2,08E-03 | 2,60 | 1,05E-03 | 2,48 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|----------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 2820 | FeS cluster assembly protein SufB | <i>sufBynhE b1683 JW5273</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | 2,04E-06 | 3,84 | 4,80E-04 | 3,10 |
| XF37_RS1 2825 | putative ATP-dependent transporter SufC | <i>sufCynhD b1682 JW1672</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | 1,70E-03 | 3,51 | 3,20E-04 | 3,22 |
| XF37_RS1 2830 | FeS cluster assembly protein SufD | <i>sufDynhC b1681 JW1671</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | 5,41E-07 | 3,54 | 1,87E-03 | 2,98 |
| XF37_RS1 2835 | Cysteine desulfurase | <i>sufScsdBynhB b1680 JW1670</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | | | 4,63E-04 | 2,21 |
| XF37_RS1 2840 | Cysteinedesulfuration-proteinSufE | <i>sufEynhA b1679 JW1669</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | 1,20E-03 | 1,98 | 1,24E-03 | 1,95 |
| XF37_RS1 2885 | Putative cytochrome YdhU | <i>ydhU b1670 JW1660</i> | respiratoryelectrontransportchain | Sí | No | No | 4,41E-04 | 1,51 | | |
| XF37_RS1 2960 | Superoxidedismutase [Fe] | <i>sodB b1656 JW1648</i> | removalofsuperoxideradicals | No | No | No | 5,52E-03 | -2,24 | 3,13E-03 | -4,95 |
| XF37_RS1 2970 | Glutaredoxin 4 | <i>grxDydhD b1654 JW1646</i> | cell redox homeostasis | Sí | No | No | | | 8,05E-03 | -1,60 |
| XF37_RS1 3010 | Superoxidedismutase [Cu-Zn] | <i>sodC b1646 JW1638</i> | removalofsuperoxideradicals | No | No | No | 3,21E-03 | 1,55 | 3,01E-02 | 2,33 |
| XF37_RS1 3055 | Tyrosine--tRNA ligase | <i>tyrS b1637 JW1629</i> | tRNAaminoacylation | No | No | No | 4,33E-05 | 1,62 | | |
| XF37_RS1 3075 | Endonuclease III | <i>nth b1633 JW1625</i> | base-excision repair, AP site formation | No | No | No | 1,38E-03 | -2,05 | 2,96E-04 | -1,82 |
| XF37_RS1 3115 | OriC-binding nucleoid-associated protein | <i>cnuydgT b1625 JW1617</i> | negative regulation of DNA-templated transcription | No | No | No | 8,39E-03 | -1,74 | | |
| XF37_RS1 3130 | Adenosinedeaminase | <i>add b1623 JW1615</i> | adenosinecatabolicprocess | No | No | No | | | 5,10E-03 | 1,60 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|-----------------------------------|--|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS1 3150 | 7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase | <i>hdhAhsdH b1619 JW1611</i> | bileacidcatabolicprocess | No | No | No | | 2,24E-03 | 1,71 | |
| XF37_RS1 3175 | ProteinYdgA | <i>ydgA b1614 JW1606</i> | bacterial-type flagellum-dependent swarming motility | No | No | No | 1,48E-02 | -1,61 | | |
| XF37_RS1 3185 | Fumaratehydrataseclass I aerobic | <i>fumA b1612 JW1604</i> | tricarboxylicacidcycle | No | No | No | 3,05E-02 | -1,69 | 1,82E-02 | -2,37 |
| XF37_RS1 3190 | Fumaratehydrataseclass II | <i>fumC b1611 JW1603</i> | fumaratemetabolicprocess | No | No | No | 2,86E-04 | 1,71 | 1,89E-02 | 1,80 |
| XF37_RS1 3295 | ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD 1 | <i>bioD2 ynfK b1593 JW5264</i> | biotinbiosyntheticprocess | Sí | No | No | 1,25E-03 | -1,76 | 1,42E-03 | -1,71 |
| XF37_RS1 3345 | hypotheticalprotein | <i>ynfB b1583 JW1575</i> | | No | No | No | 2,49E-03 | -1,53 | | |
| XF37_RS1 3400 | hypotheticalprotein | | | No | No | 1 | 1,24E-02 | 1,52 | | |
| XF37_RS1 3475 | Crossover junctionendodeoxyribonucleaseRusA | <i>rusA rus ybcP b0550 JW0538</i> | DNA recombination | No | Sí | 1 | 3,25E-02 | -1,85 | 3,33E-02 | -1,85 |
| XF37_RS1 3895 | Type-1 fimbrialprotein Achain | <i>fimApilA b4314 JW4277</i> | celladhesion | Sí | No | No | 2,06E-03 | -2,10 | 5,71E-03 | -2,26 |
| XF37_RS1 3900 | Chaperone protein-FocC | <i>fimC b4316 JW4279</i> | cellwallorganization | No | No | No | 2,70E-03 | -2,90 | 1,14E-03 | -2,39 |
| XF37_RS1 3905 | Outer membrane usher protein FimD | <i>fimD b4317 JW5780</i> | pilusassembly | No | No | No | 3,88E-04 | -1,65 | 2,52E-04 | -1,66 |
| XF37_RS1 3915 | ProteinFimG | <i>ydeR b1503 JW1497</i> | cell adhesion involved in single-species biofilm formation | No | No | No | 2,74E-04 | -2,25 | 2,41E-04 | -1,83 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 3920 | Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin | <i>ydeQ b1502 JW1496</i> | cell adhesion involved in single-species biofilm formation | No | No | No | 3,32E-04 | -1,51 | | |
| XF37_RS1 3965 | hypothetical protein | <i>pqqLyddC b1494 JW1489</i> | proteolysis | No | No | No | | | 1,16E-03 | 1,87 |
| XF37_RS1 4025 | putative D D-dipeptide transport ATP-binding protein DdpF | <i>ddpFyddO b1483 JW1478</i> | dipeptide transport | No | No | No | 4,44E-05 | -2,16 | 2,54E-04 | -2,69 |
| XF37_RS1 4030 | Peroxiredoxin OsmC | <i>osmC b1482 JW1477</i> | hyperosmotic response | No | No | No | | | 2,31E-02 | 1,82 |
| XF37_RS1 4050 | Alcohol dehydrogenase propanol-preferring | <i>adhPyddN b1478 JW1474</i> | acetaldehyde catabolic process | Sí | No | No | 7,25E-04 | 1,50 | 4,61E-02 | 1,74 |
| XF37_RS1 4065 | Formate dehydrogenase nitrate-inducible iron-sulfur subunit | <i>fdnH b1475 JW1471</i> | anaerobic electron transport chain | No | No | No | 1,30E-02 | -2,49 | 1,69E-02 | -2,31 |
| XF37_RS1 4070 | Formate dehydrogenase nitrate-inducible major subunit | <i>fdnG b1474 JW1470</i> | anaerobic electron transport chain | No | No | No | 3,72E-02 | -1,89 | 4,47E-02 | -1,74 |
| XF37_RS1 4125 | putative isomerase YddE | <i>yddE b1464 JW1459</i> | biosynthetic process | Sí | No | No | | | 5,23E-03 | 1,65 |
| XF37_RS1 4130 | Arylamine N-acetyltransferase | <i>nhoAyddI b1463 JW1458</i> | | No | No | No | 1,93E-03 | 1,52 | 1,70E-03 | 1,52 |
| XF37_RS1 4190 | putative protein YncE | <i>yncE b1452 JW1447</i> | | No | No | No | 1,72E-04 | 2,15 | 9,94E-04 | 3,04 |
| XF37_RS1 4220 | putative protein YdcY | <i>ydcY b1446 JW1441</i> | | No | No | No | 3,51E-02 | -1,50 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 4280 | 23S rRNA 5-hydroxycytidine synthase | <i>rlhA ydcP b1435 JW1431</i> | rRNA modification | No | No | No | 1,06E-02 | -1,90 | 8,44E-03 | -1,90 |
| XF37_RS1 4300 | Telluritemethyltransferase | <i>tehB b1430 JW1426</i> | methylation | No | No | No | 2,47E-03 | 2,29 | 3,47E-04 | 1,99 |
| XF37_RS1 4465 | D-lactate dehydrogenase | <i>ldhA hslI htpH b1380 JW1375</i> | mixed acid fermentation | Sí | No | No | 1,13E-03 | 2,11 | 1,51E-03 | 1,98 |
| XF37_RS1 4610 | Thiolperoxidase | <i>tpxyzJ b1324 JW1317</i> | cellular response to oxidative stress | No | No | No | | | 4,58E-04 | 1,63 |
| XF37_RS1 4690 | Thiosulfate sulfurtransferase PspE | <i>pspE b1308 JW1301</i> | | No | No | No | | | 1,77E-02 | 1,64 |
| XF37_RS1 4710 | Phage shock protein A | <i>pspA b1304 JW1297</i> | negative regulation of DNA-binding transcription factor activity | No | No | No | 1,41E-02 | -1,55 | 2,26E-02 | -1,60 |
| XF37_RS1 4845 | hypothetical protein | <i>yciZ b4596 JW1277</i> | | No | No | No | 1,11E-02 | -1,91 | | |
| XF37_RS1 4980 | Tryptophan synthase beta chain | <i>trpB b1261 JW1253</i> | aromatic amino acid family biosynthetic process | No | No | No | 3,21E-04 | 1,53 | 8,69E-03 | 1,54 |
| XF37_RS1 5170 | hypothetical protein | | | No | Sí | 1 | 1,23E-02 | -1,60 | | |
| XF37_RS1 5480 | hypothetical protein | | | No | Sí | 1 | | | 1,52E-03 | 2,50 |
| XF37_RS1 5765 | Protein YciI | <i>yciI b1251 JW1243</i> | | Sí | No | No | 7,94E-03 | 1,65 | 1,73E-03 | 1,63 |
| XF37_RS1 5895 | Nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarJ | <i>narJ b1226 JW1217</i> | chaperone-mediated protein complex assembly | No | No | No | 1,74E-02 | -3,66 | 1,77E-02 | -3,33 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 5900 | Respiratory nitrate reductase 1 beta chain | <i>narH b1225 JW1216</i> | anaerobic electron transport chain | No | No | No | 4,58E-02 | -3,65 | 4,80E-02 | -3,33 |
| XF37_RS1 5905 | Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain | <i>narG bisD narC b1224 JW1215</i> | anaerobic electron transport chain | No | No | No | 4,82E-02 | -3,75 | 4,84E-02 | -3,69 |
| XF37_RS1 5940 | Putative cation transport regulator ChaB | <i>chaB b1217 JW1208</i> | | No | No | No | | | 4,68E-04 | 1,71 |
| XF37_RS1 6170 | hypothetical protein | <i>ycgN b1181 JW5180</i> | | No | No | No | 3,57E-03 | -3,35 | 3,42E-04 | -3,35 |
| XF37_RS1 6195 | hypothetical protein | <i>ycgJ b1177 JW1166</i> | | No | No | No | | | 5,30E-04 | 1,83 |
| XF37_RS1 6235 | Protease 7 | <i>ompT b0565 JW0554</i> | proteolysis | No | No | 1 | 4,73E-02 | -2,82 | | |
| XF37_RS1 6240 | Carboxylesterase B | | | No | No | 1 | 6,88E-04 | -1,90 | | |
| XF37_RS1 6370 | hypothetical protein | | | No | Sí | 1 | | | 1,79E-05 | 2,46 |
| XF37_RS1 6525 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] | <i>icd icdA icdE b1136 JW1122</i> | electron transport chain | No | Sí | No | 3,80E-04 | 2,19 | 1,33E-02 | 2,25 |
| XF37_RS1 6615 | hypothetical protein | | | No | Sí | No | | | 1,24E-02 | 1,57 |
| XF37_RS1 6975 | hypothetical protein | <i>ydaW b1361 JW5211</i> | | No | Sí | 1 | | | 6,42E-03 | 1,53 |
| XF37_RS1 7010 | hypothetical protein | | | No | Sí | 1 | 9,69E-06 | -1,62 | 9,77E-04 | -1,54 |
| XF37_RS1 7075 | putative L D-transpeptidase YcfS | <i>ycfS b1113 JW5820</i> | cell wall organization | No | No | No | 9,90E-04 | -2,06 | 2,50E-03 | -2,06 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--------------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 7125 | Purinenucleosidephosphoramidase | <i>hinTycfF b1103 JW1089</i> | D-alanine catabolic process | No | No | No | 1,77E-02 | -1,59 | | |
| XF37_RS1 7225 | Flagellar hook-associated protein 3 | <i>flgLflaTflaU b1083 JW1070</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | 6,52E-03 | -1,62 | 2,18E-03 | -3,14 |
| XF37_RS1 7230 | Flagellar hook-associated protein 1 | <i>flgKflaSflaW b1082 JW1069</i> | bacterial-type flagellum assembly | No | No | No | 1,64E-02 | -1,88 | 8,24E-03 | -3,73 |
| XF37_RS1 7235 | Peptidoglycan hydrolase FlgJ | <i>flgJflaFXflaZ b1081 JW1068</i> | bacterial-type flagellum assembly | No | No | No | | | 2,55E-02 | -1,84 |
| XF37_RS1 7240 | Flagellar P-ring protein | <i>flgIflaFIXflaM b1080 JW1067</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | 1,54E-03 | -2,10 | 2,49E-03 | -4,28 |
| XF37_RS1 7245 | Flagellar L-ring protein | <i>flgHflaFVIIIflaY b1079 JW5153</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | 2,88E-04 | -1,55 | 2,88E-06 | -2,58 |
| XF37_RS1 7255 | Flagellar basal-body rod protein FlgF | <i>flgFflaFVIflaX b1077 JW1064</i> | bacterial-type flagellum-dependent cell motility | No | No | No | | | 2,41E-02 | -2,21 |
| XF37_RS1 7260 | Flagellar hook protein FlgE | <i>flgEflaFVflaK b1076 JW1063</i> | bacterial-type flagellum-dependent swarming motility | No | No | No | 3,47E-02 | -1,71 | 1,66E-02 | -2,77 |
| XF37_RS1 7265 | Basal-body rod modification protein FlgD | <i>flgDflaFIVflaV b1075 JW1062</i> | bacterial-type flagellum organization | No | No | No | 1,88E-02 | -2,52 | 1,18E-02 | -7,61 |
| XF37_RS1 7280 | Flagella basal body P-ring formation protein FlgA | <i>flgA b1072 JW1059</i> | bacterial-type flagellum assembly | No | No | No | | | 1,94E-03 | -1,88 |
| XF37_RS1 7285 | Negative regulator of flagellin synthesis | <i>flgM b1071 JW1058</i> | bacterial-type flagellum organization | No | No | No | 1,64E-02 | -1,67 | 9,99E-03 | -3,42 |
| XF37_RS1 7290 | Flagella synthesis protein FlgN | <i>flgN b1070 JW1057</i> | bacterial-type flagellum assembly | No | No | No | 6,73E-03 | -2,16 | 8,68E-03 | -3,64 |
| XF37_RS1 7320 | Glutaredoxin 2 | <i>grxB b1064 JW1051</i> | | No | No | No | | | 1,56E-03 | 1,83 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 7340 | BiofilmregulatorBssS | <i>bssSyceP b1060 JW5152</i> | regulation of single-species biofilm formation | No | No | No | 5,63E-03 | -1,52 | | |
| XF37_RS1 7640 | Colicin I receptor | <i>cirAcirfeuA b2155 JW2142</i> | iron ion homeostasis | Sí | Sí | 1 | | | 7,10E-03 | 1,81 |
| XF37_RS1 7680 | General stress protein 16U | | | No | Sí | 1 | | | 1,69E-03 | 1,60 |
| XF37_RS1 7980 | hypotheticalprotein | <i>fabFfabJ b1095 JW1081</i> | fattyacidbiosyntheticpro- cess | No | No | 1 | 6,44E-04 | -4,52 | | |
| XF37_RS1 8010 | hypotheticalprotein | | | No | No | 1 | 2,12E-04 | -3,04 | | |
| XF37_RS1 8100 | Deferrochelatase/per- oxidaseEfeB | <i>efeBycdB b1019 JW1004</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 3,16E-04 | 1,61 | 1,19E-03 | 1,82 |
| XF37_RS1 8105 | Iron uptake system component EfeO | <i>efeOycdO b1018 JW1003</i> | response toantibiotic | No | No | No | 5,17E-03 | 3,11 | 2,25E-04 | 3,69 |
| XF37_RS1 8190 | Glucose-1-phospha- tase | <i>agp b1002 JW0987</i> | dephosphorylation | No | No | No | | | 4,44E-02 | 1,56 |
| XF37_RS1 8260 | Cold shock-like pro- tein CspG | <i>cspGcspI b0990 JW0974</i> | negative regulation of ter- mination of DNA-templated transcription | No | No | No | 1,85E-02 | -2,02 | 1,69E-02 | -1,93 |
| XF37_RS1 8280 | hypotheticalprotein | <i>gfcCymcB b0985 JW0968</i> | | No | No | No | 8,47E-03 | -1,55 | | |
| XF37_RS1 8300 | Tyrosine-proteinki- naseetk | <i>etkyccC b0981 JW0964</i> | extracellularpolysaccharide- biosyntheticprocess | No | No | No | 4,67E-02 | -1,58 | | |
| XF37_RS1 8485 | hypotheticalprotein | <i>ybcY b0562 JW0551</i> | | Sí | No | 1 | 7,37E-03 | -1,54 | | |
| XF37_RS1 8660 | Antigen 43 | <i>flu yeeQyzzX b2000 JW1982</i> | | No | No | No | 5,11E-03 | -1,93 | 2,14E-03 | -2,45 |

| | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|---|----|----|----|----------|----------|----------|-------|--|
| XF37_RS1 8805 | hypotheticalprotein | | | Sí | Sí | 1 | | 4,04E-04 | 2,09 | | |
| XF37_RS1 8960 | Cell divisioninhibitor- SulA | <i>sulA</i> sfIA b0958 JW0941 | cellular response to DNA damage stimulus | Sí | No | 1 | 8,41E-03 | 1,51 | | | |
| XF37_RS1 8985 | Ribosomemodulation factor | <i>rmf</i> b0953 JW0936 | negative regulation of trans- lation in response to stress | No | No | 1 | 1,10E-02 | -1,80 | | | |
| XF37_RS1 9105 | Outermembraneporin F | <i>ompF</i> cmlBcoa cry tolF b0929 JW0912 | ion transmembranetransport | Sí | No | No | 2,56E-02 | -4,33 | 2,75E-02 | -3,74 | |
| XF37_RS1 9110 | Aspartateaminotrans- ferase | <i>aspC</i> b0928 JW0911 | L-phenylalaninebiosynthe- ticprocess | No | No | No | 9,95E-04 | 1,52 | 1,93E-03 | 1,69 | |
| XF37_RS1 9240 | Pyruvate formate-ly- ase 1-activating en- zyme | <i>pflA</i> act b0902 JW0885 | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 4,13E-03 | -1,70 | 2,15E-03 | -1,92 | |
| XF37_RS1 9260 | putative hydrolaseY- caC | <i>ycaC</i> b0897 JW0880 | | No | No | No | | | 1,65E-02 | 1,54 | |
| XF37_RS1 9270 | Anaerobicdimethylsu- lfoxidereductasechain B | <i>dmsB</i> b0895 JW0878 | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 5,97E-03 | -1,94 | 1,85E-03 | -3,97 | |
| XF37_RS1 9275 | Dimethylsulfoxidere- ductaseDmsA | <i>dmsA</i> b0894 JW5118 | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 1,01E-02 | -1,77 | 5,41E-03 | -2,34 | |
| XF37_RS1 9305 | Thioredoxinreductase | <i>trxB</i> b0888 JW0871 | cell redox homeostasis | No | No | No | 3,51E-06 | 1,77 | 1,88E-04 | 1,71 | |
| XF37_RS1 9355 | Macrolide export ATP-binding/per- mease protein MacB | <i>macB</i> bybjZ b0879 JW0863 | response toantibiotic | No | No | No | 1,80E-04 | 2,15 | 5,94E-05 | 2,18 | |
| XF37_RS1 9395 | Pyruvatedehydroge- nase [ubiquinone] | <i>poxB</i> b0871 JW0855 | pyruvatecatabolicprocess | No | No | No | 3,06E-05 | 1,85 | 1,95E-02 | 1,64 | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--|--|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS1 9500 | Putrescine-bindingperiplasmicprotein | <i>potF b0854 JW0838</i> | putrescine transport | No | No | No | | 1,19E-02 | 1,74 | |
| XF37_RS1 9515 | Oxygen-insensitive NADPH nitroreductase | <i>nfsA mda18 mdaA ybjB b0851 JW0835</i> | | No | No | No | 1,00E-03 | 1,72 | 4,01E-03 | 1,59 |
| XF37_RS1 9605 | hypothetical protein | | | No | No | No | 1,25E-02 | -1,81 | 1,67E-02 | -1,51 |
| XF37_RS1 9675 | putative protein YbiU | <i>ybiU b0821 JW0805</i> | | No | No | No | 1,17E-04 | 1,89 | 8,88E-03 | 1,96 |
| XF37_RS1 9725 | DNA protection during starvation protein | <i>dps pexB vtm b0812 JW0797</i> | cellular iron ion homeostasis | Sí | No | No | 6,39E-04 | -4,36 | 6,94E-04 | -3,88 |
| XF37_RS1 9760 | Catecholatesiderophore receptor Fiu | <i>fiu ybiL b0805 JW0790</i> | iron ion homeostasis | Sí | No | No | 1,23E-04 | 2,52 | 4,68E-03 | 2,82 |
| XF37_RS1 9765 | PKHD-type hydroxylase | <i>ybiX b0804 JW5105</i> | cellular iron ion homeostasis | No | No | No | 3,82E-05 | 4,24 | 4,25E-04 | 6,14 |
| XF37_RS1 9805 | ATP-dependent RNA helicase RhIE | <i>rhIE b0797 JW0781</i> | response to heat | No | No | No | | 1,74E-02 | | -1,53 |
| XF37_RS1 9865 | Molybdopterinsynthase catalytic subunit | <i>moaE chlA5 b0785 JW0768</i> | Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process | No | No | No | 8,57E-03 | 2,26 | 5,42E-03 | 2,04 |
| XF37_RS1 9870 | Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit | <i>moaD chlA4 chlM b0784 JW0767</i> | Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process | No | No | No | 2,42E-03 | 2,39 | 7,10E-04 | 2,11 |
| XF37_RS1 9875 | Cyclicpyranopterinmonophosphatesynthase | <i>moaC chlA3 b0783 JW0766</i> | Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process | No | No | No | 5,09E-04 | 2,95 | 2,26E-05 | 2,27 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|---|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS1 9880 | Molybdenumcofactor- biosynthesisprotein B | <i>moaB chlA2 b0782 JW0765</i> | Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process | No | No | No | 5,38E-04 | 2,52 | 5,70E-04 | 2,54 |
| XF37_RS1 9885 | GTP 3' 8-cyclase | <i>moaAbisAchlA chlA1 narA b0781 JW0764</i> | Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process | No | No | No | 2,47E-04 | 2,34 | 5,18E-03 | 1,87 |
| XF37_RS2 0265 | Molybdate-bin- dingproteinModA | <i>modA b0763 JW0746</i> | molybdate ion transport | No | No | No | 1,56E-02 | -1,58 | 1,76E-02 | -1,63 |
| XF37_RS2 0305 | 2 3-bisphosphoglyce- rate-dependent phosphoglycerate mu- tase | <i>gpmAgmpmpgmgmA b0755 JW0738</i> | gluconeogenesis | Sí | No | No | | | 1,85E-04 | 2,18 |
| XF37_RS2 0315 | hypotheticalprotein | <i>ybgS b0753 JW0736</i> | | No | No | No | | | 1,77E-02 | 1,75 |
| XF37_RS2 0365 | Cell divisioncoordina- torCpoB | <i>cpoBybgF b0742 JW0732</i> | celldivision | No | No | No | 5,25E-03 | -1,52 | | |
| XF37_RS2 0405 | Cytochromebd-Iubi- quinol oxidase subunit X | <i>cydXybgT b4515 JW0724</i> | aerobic electrontrans- portchain | No | No | No | 3,90E-05 | -2,34 | 5,48E-04 | -1,92 |
| XF37_RS2 0480 | Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subu- nit alpha | <i>sucD b0729 JW0718</i> | proteinautophosphorylation | No | No | No | | | 2,32E-02 | 1,58 |
| XF37_RS2 0485 | Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subu- nit beta | <i>sucC b0728 JW0717</i> | succinyl-CoAmetabolicpro- cess | No | No | No | | | 4,47E-02 | 1,64 |
| XF37_RS2 0495 | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component | <i>sucA b0726 JW0715</i> | tricarboxylicacidcycle | No | No | No | 3,95E-02 | 1,55 | | |
| XF37_RS2 0500 | Succinate dehydroge- naseiron-sulfursubunit | <i>sdhB b0724 JW0714</i> | aerobic respiration | No | No | No | 1,62E-02 | -2,43 | 8,37E-03 | -2,50 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|---|----|----|----|----------|----------|----------|-------|
| XF37_RS2 0505 | Succinate dehydroge- nase flavoprotein- subunit | <i>sdhA b0723 JW0713</i> | aerobic respiration | No | No | No | | 3,50E-02 | -1,75 | |
| XF37_RS2 0575 | GTP cyclohydrolase 1 type 2 | <i>ybgI b0710 JW0700</i> | DNA repair | No | No | No | | 9,85E-05 | 1,52 | |
| XF37_RS2 0620 | hypothetical protein | <i>ybfA b0699 JW0688</i> | response to radiation | No | No | No | 8,16E-03 | -2,11 | 4,37E-03 | -1,67 |
| XF37_RS2 0700 | Ferric uptake regula- tion protein | <i>fur b0683 JW0669</i> | negative regulation of DNA-templated transcrip- tion | Sí | No | No | | 5,42E-03 | -3,25 | |
| XF37_RS2 0790 | tRNA-2-methylthio- N(6)-dimethylal- lyl adenosine synthase | <i>miaB ylaA b0661 JW0658</i> | tRNA methylation | No | No | No | 3,44E-03 | -1,53 | 2,41E-04 | -1,71 |
| XF37_RS2 0830 | Glutamine transport ATP-binding protein GlnQ | <i>gltL b0652 JW0647</i> | L-aspartate import across plasma membrane | Sí | No | No | | 2,83E-05 | -2,18 | |
| XF37_RS2 0885 | LPS-assembly lipopro- tein LptE | <i>lptE rlpB b0641 JW0636</i> | Gram-negative bacterium- type cell outer membrane assembly | No | No | No | 3,95E-02 | -1,60 | | |
| XF37_RS2 0955 | Sec-independent pro- tein translocase pro- tein TatE | <i>tatE ybeC b0627 JW0622</i> | protein transport by the Tat complex | No | No | No | 1,72E-02 | -1,53 | 4,14E-03 | -1,63 |
| XF37_RS2 0970 | Cold shock-like pro- tein CspE | <i>cspE gicA smcC b0623 JW0618</i> | negative regulation of ter- mination of DNA-templated transcription | No | No | No | 4,15E-03 | 1,77 | | |
| XF37_RS2 1045 | Universal stress pro- tein UP12 | <i>uspG ybdQ yzzU b0607 JW0600</i> | protein adenylation | No | No | No | 7,91E-03 | -1,72 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--------------------------------|---|----|----|----|----------|------|----------|------|
| XF37_RS2 1105 | 2 3-dihydro-2 3-dihydroxybenzoate dehydrogenase | <i>entA b0596 JW0588</i> | enterobactinbiosyntheticprocess | No | No | No | 3,10E-04 | 4,85 | 2,44E-06 | 5,64 |
| XF37_RS2 1110 | Enterobactinsynthesecomponent B | <i>entBentG b0595 JW0587</i> | enterobactinbiosyntheticprocess | No | No | No | 2,29E-04 | 6,12 | 2,97E-04 | 7,30 |
| XF37_RS2 1115 | Enterobactinsynthesecomponent E | <i>entE b0594 JW0586</i> | enterobactinbiosyntheticprocess | No | No | No | 1,11E-03 | 2,41 | 2,33E-03 | 2,94 |
| XF37_RS2 1120 | IsochorismatesyntheseEntC | <i>entC b0593 JW0585</i> | enterobactinbiosyntheticprocess | No | No | No | 1,67E-06 | 3,29 | 4,26E-06 | 3,58 |
| XF37_RS2 1125 | Ferrienterobactin-bindingperiplasmicprotein | <i>fepB b0592 JW0584</i> | cellular response to DNA damage stimulus | Sí | No | No | 9,17E-03 | 2,34 | 3,52E-05 | 4,04 |
| XF37_RS2 1130 | EnterobactinexporterEntS | <i>entSybdA b0591 JW0583</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | | | 1,24E-03 | 1,88 |
| XF37_RS2 1145 | Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC | <i>fepC b0588 JW0580</i> | ferric-enterobactin import into cell | No | No | No | 8,59E-04 | 1,65 | 2,02E-03 | 1,84 |
| XF37_RS2 1155 | Enterobactinsynthesecomponent F | <i>entF b0586 JW0578</i> | amino acid activation for nonribosomal peptide biosynthetic process | No | No | No | 7,43E-03 | 2,70 | 2,71E-03 | 3,47 |
| XF37_RS2 1160 | EnterobactinbiosynthesisproteinYbdZ | <i>ybdZ b4511 JW0577</i> | enterobactinbiosyntheticprocess | No | No | No | 5,66E-03 | 4,99 | 8,67E-03 | 6,02 |
| XF37_RS2 1165 | Enterochelin esterase | <i>fes b0585 JW0576</i> | enterobactincatabolicprocess | No | No | No | 1,35E-05 | 2,79 | 7,64E-04 | 3,22 |
| XF37_RS2 1170 | Ferrienterobactin receptor | <i>fepAfepeuB b0584 JW0586</i> | colicintransport | Sí | No | No | 1,82E-04 | 2,22 | 4,09E-02 | 3,09 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--------------------------------------|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS2 1175 | Enterobactinsyntha- secomponent D | <i>entD b0583 JW5085</i> | enterobactinbiosynthe- ticprocess | No | No | No | 2,17E-03 | 1,68 | 1,22E-02 | 1,96 |
| XF37_RS2 1625 | Inosine-guanosineki- nase | <i>gsk b0477 JW0466</i> | GMP salvage | No | No | No | | | 8,72E-04 | -1,77 |
| XF37_RS2 1635 | Ferrochelatase | <i>hemHpopAvisA b0475 JW0464</i> | heme biosyntheticprocess | No | No | No | | | 9,88E-03 | 1,52 |
| XF37_RS2 1680 | hypotheticalprotein | <i>ybaM b0466 JW0455</i> | cellular response to cell en- velope stress | No | No | No | 1,78E-02 | -1,51 | | |
| XF37_RS2 1700 | Multidrug efflux pump subunit AcrB | <i>acrBacrE b0462 JW0451</i> | xenobiotic detoxification by transmembrane export across the cell outer mem- brane | No | No | No | | | 3,25E-02 | 2,47 |
| XF37_RS2 1760 | Nitrogen regulatory protein P-II 2 | <i>glnKybaI b0450 JW0440</i> | regulationofnitrogenutiliza- tion | No | No | No | | | 2,11E-02 | 1,80 |
| XF37_RS2 1830 | Trigger factor | <i>tig b0436 JW0426</i> | 'de novo' cotranslatio- nalprotein folding | No | No | No | | | 1,13E-02 | -1,53 |
| XF37_RS2 1915 | 1-deoxyxylulose-5- phosphate syntha- seYajO | <i>yajO b0419 JW0409</i> | thiaminemetabolicprocess | No | No | No | | | 1,30E-03 | 1,51 |
| XF37_RS2 1995 | QueuinetRNA-ri- bosyltransferase | <i>tgt b0406 JW0396</i> | queuosinebiosyntheticpro- cess | No | No | No | 7,59E-03 | 2,00 | | |
| XF37_RS2 2080 | hypotheticalprotein | <i>aroM b0390 JW0381</i> | | No | No | No | 1,39E-02 | -1,64 | 1,96E-02 | -1,68 |
| XF37_RS2 2085 | putative proteinYaiA | <i>yaiA b0389 JW0380</i> | | No | No | No | | | 7,88E-03 | 1,51 |
| XF37_RS2 2170 | Delta-aminolevulini- caciddehydratase | <i>hemBncf b0369 JW0361</i> | heme biosyntheticprocess | Sí | No | No | 2,12E-04 | 1,71 | 1,31E-04 | 1,66 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-------------------------------------|--|----|----|-------|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS2 2240 | hypotheticalprotein | <i>yaiL b0354 JW0345</i> | | No | No | No | 1,17E-02 | -1,56 | | |
| XF37_RS2 2300 | Beta-galactosidase | <i>lacZ b0344 JW0335</i> | lactosecatabolicprocess | No | No | No | 8,61E-03 | -1,74 | | |
| XF37_RS2 2370 | hypotheticalprotein | <i>yahO b0329 JW0321</i> | response toradiation | No | No | 2 & 3 | | | 5,63E-04 | 1,73 |
| XF37_RS2 2390 | Aldehydereducta- seYahK | <i>yahK b0325 JW0317</i> | | No | No | No | 1,17E-03 | 1,61 | 2,06E-04 | 1,56 |
| XF37_RS2 2485 | NAD/NADP-depend- ent betaine aldehyde dehydrogenase | <i>betB b0312 JW0304</i> | glycine betaine biosynthetic process from choline | No | No | 1 & 4 | 2,77E-06 | 1,79 | 7,63E-03 | 1,60 |
| XF37_RS2 2530 | Lactateutilizationpro- tein C | <i>ykgG b0308 JW5042</i> | | No | No | 1 & 4 | 1,82E-02 | -1,63 | 1,94E-02 | -1,55 |
| XF37_RS2 2535 | Lactateutilizationpro- tein B | <i>ykgF b0307 JW0300</i> | lactateoxidation | No | No | 1 & 4 | 1,33E-02 | -2,16 | 1,46E-02 | -1,99 |
| XF37_RS2 2765 | hypotheticalprotein | | | No | No | 1 & 4 | | | 1,69E-03 | 1,70 |
| XF37_RS2 2915 | Sigma factor-binding protein Crl | <i>crl b0240 JW0230</i> | positive regulation of DNA- templated transcription | No | No | No | 8,85E-03 | 1,85 | 5,88E-03 | 1,82 |
| XF37_RS2 2995 | hypotheticalprotein | <i>yafK b0224 JW0214</i> | cellwallorganization | No | No | No | | | 2,98E-02 | -1,70 |
| XF37_RS2 3425 | Methionineamino pep- tidase | <i>map b0168 JW0163</i> | proteininitiatormethionine- removal | Sí | No | No | 3,38E-03 | 1,65 | 4,58E-04 | 1,51 |
| XF37_RS2 3450 | Periplasmicserineen- doproteaseDegP | <i>degPhtrAptd b0161 JW0157</i> | chaperone-mediatedprotein- folding | No | No | No | | | 4,56E-02 | 1,61 |
| XF37_RS2 3495 | Glutamate-1-semial- | <i>hemLgsapopC b0154 JW0150</i> | protoporphyrinogen IX biosyntheticprocess | No | No | No | 8,85E-04 | 1,72 | 5,41E-03 | 1,62 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| | dehyde 2 1-aminomu- tase | | | | | | | | | |
| XF37_RS2 3635 | Carbonicanhydrase 2 | <i>can cynT2 yadF b0126 JW0122</i> | carbonutilization | No | No | No | 1,08E-03 | 2,87 | 2,00E-04 | 2,41 |
| XF37_RS2 3685 | Dihydrolipoyl- dehydrogenase | <i>lpdAlpd b0116 JW0112</i> | 2-oxoglutarate metaboli- cprocess | No | No | No | 3,33E-03 | 1,85 | | |
| XF37_RS2 3690 | Dihydrolipoyllysine- residue acetyltransfer- ase component of py- ruvate dehydrogenase complex | <i>aceF b0115 JW0111</i> | acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate | No | No | No | 7,49E-04 | 1,93 | | |
| XF37_RS2 3695 | Pyruvatedehydroge- nase E1 component | <i>aceE b0114 JW0110</i> | glycolyticprocess | No | No | No | 9,63E-03 | 2,07 | | |
| XF37_RS2 3740 | GMP reductase | <i>guaC b0104 JW0101</i> | IMP salvage | No | No | No | 3,99E-05 | 1,81 | 4,22E-04 | 1,60 |
| XF37_RS2 3895 | 3-isopropylmalate dehydrogenase | <i>leuB b0073 JW5807</i> | cellular response to amino acid starvation | No | No | No | 9,43E-04 | -1,76 | 1,16E-03 | -1,95 |
| XF37_RS2 3900 | 3-isopropylmalate dehydrataselar- gesubunit | <i>leuC b0072 JW0071</i> | leucinebiosyntheticprocess | No | No | No | 4,09E-03 | -4,00 | 3,04E-03 | -3,89 |
| XF37_RS2 3905 | 3-isopropylmalate dehydratasessmallsu- bunit | <i>leuD b0071 JW0070</i> | leucinebiosyntheticprocess | No | No | No | 9,87E-04 | -2,60 | 1,36E-03 | -2,39 |
| XF37_RS2 3915 | HTH-type transcrip- tional regulator SgrR | <i>sgrRyabN b0069 JW0068</i> | negative regulation of DNA-templated transcrip- tion | No | No | No | 1,60E-02 | -1,52 | | |
| XF37_RS2 4235 | Transaldolase B | <i>talByaaK b0008 JW0007</i> | carbohydrametabolicpro- cess | No | No | No | 5,62E-03 | 1,55 | 5,47E-04 | 1,73 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-------------------------------|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS2 4380 | Phosphopentomutase | <i>deoBdrmyR b4383 JW4346</i> | 5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthetic process | No | No | No | 9,90E-03 | 1,88 | 4,71E-05 | 1,86 |
| XF37_RS2 4395 | putative protein YjjI | <i>yjjIyjjH b4380 JW4343</i> | anaerobic respiration | No | No | No | 2,11E-02 | -1,53 | | |
| XF37_RS2 4410 | hypothetical protein | <i>yjjU b4377 JW4340</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 6,10E-04 | 1,65 | 1,72E-04 | 1,65 |
| XF37_RS2 4420 | Osmotically-inducible protein Y | <i>osmY b4376 JW4338</i> | chaperone-mediated protein folding | No | No | No | 1,41E-02 | 2,14 | 6,25E-04 | 2,16 |
| XF37_RS2 4430 | Pyrimidine 5'-nucleotidase YjjG | <i>yjjG b4374 JW4336</i> | response to xenobiotic stimulus | No | No | No | 3,10E-04 | 1,66 | 3,03E-04 | 1,52 |
| XF37_RS2 4460 | Ferric iron reductase protein FhuF | <i>fhuFyjjS b4367 JW4331</i> | reductive iron assimilation | Sí | No | No | 7,68E-06 | 1,91 | 7,89E-06 | 1,96 |
| XF37_RS2 4520 | Methyl-accepting chemotaxis protein I | <i>tsrcheD b4355 JW4318</i> | cell motility | No | No | No | 1,80E-02 | -2,08 | 1,53E-02 | -2,43 |
| XF37_RS2 4695 | Mannanatedehydrolase | <i>uxuA b4322 JW4285</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 1,54E-04 | -1,57 | | |
| XF37_RS2 4805 | hypothetical protein | | | No | No | 1 | 9,07E-03 | -1,78 | 5,41E-03 | -1,66 |
| XF37_RS2 4855 | hypothetical protein | | | No | No | 1 | 9,28E-05 | -1,84 | | |
| XF37_RS2 4885 | Aldehyde reductase Ahr | <i>ahryjgB b4269 JW5761</i> | fatty acid metabolic process | No | No | 1 | 2,81E-03 | 1,88 | 4,05E-04 | 1,56 |
| XF37_RS2 5010 | Trehalose-6-phosphate hydrolase | <i>treColgH b4239 JW4198</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | 2,11E-02 | -2,14 | | |
| XF37_RS2 5015 | Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase | <i>nrdD b4238 JW4197</i> | 2'-deoxyribonucleotide biosynthetic process | No | No | No | 5,83E-03 | 2,00 | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|--|---|---|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS2 5025 | Soluble cytochrome b562 | | | No | No | No | 5,81E-04 | -2,39 | 1,93E-03 | -3,03 |
| XF37_RS2 5045 | Fructose-1 6- bisphosphatase class 1 | <i>fbpfdp b4232 JW4191</i> | fructose 1,6-bisphosphate metabolicprocess | No | No | No | 2,10E-05 | 1,91 | 2,59E-03 | 1,64 |
| XF37_RS2 5150 | Iron-sulfur cluster re- pair protein YtfE | <i>ytfE b4209 JW4167</i> | iron incorporation into metallo-sulfur cluster | No | No | No | 1,50E-03 | 3,96 | 1,35E-05 | 3,17 |
| XF37_RS2 5210 | 30S ribosomal protein S6 | <i>rpsF b4200 JW4158</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | | | 1,50E-02 | -1,55 |
| XF37_RS2 5435 | Fumaratereducta- seflavoproteinsubunit | <i>frdA b4154 JW4115</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 1,04E-02 | -1,78 | 7,59E-03 | -2,42 |
| XF37_RS2 5440 | Fumaratereductasei- ron-sulfursubunit | <i>frdB b4153 JW4114</i> | anaerobicrespiration | No | No | No | 8,24E-03 | -1,58 | 2,82E-03 | -2,33 |
| XF37_RS2 5530 | Divalent-cation tole- ranceproteinCutA | <i>cutA cutA1 cycY b4137 JW4097</i> | response tocopper ion | No | No | No | 1,52E-03 | 1,59 | 1,61E-03 | 1,70 |
| XF37_RS2 5540 | hypotheticalprotein | <i>yjdC cutA3 b4135 JW5733</i> | regulation of DNA-tem- plated transcription | No | No | No | 4,52E-03 | 1,85 | 6,06E-03 | 1,77 |
| XF37_RS2 5585 | putative proteinYjdJ | <i>yjdJ b4127 JW4088</i> | | No | No | No | 1,31E-04 | 2,63 | 2,23E-02 | 2,01 |
| XF37_RS2 5610 | Fumarate hydratase class I anaerobic | <i>fumB b4122 JW4083</i> | cellular response to DNA damage stimulus | No | No | No | | | 3,74E-03 | -1,77 |
| XF37_RS2 5690 | hypotheticalprotein | <i>yjdNphnB b4107 JW4068</i> | | No | No | No | | | 6,22E-04 | 1,62 |
| XF37_RS2 5870 | putative ferredoxin- like protein YdhX | <i>nrfCyjcJ b4072 JW4033</i> | | No | No | No | 7,82E-03 | -3,08 | 5,85E-03 | -3,26 |
| XF37_RS2 5880 | Cytochrome c-552 | <i>nrfA b4070 JW4031</i> | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 2,71E-03 | -2,29 | 2,94E-03 | -2,63 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------|--|--|--|----|----|----|----------|-------|----------|-------|
| XF37_RS2_5980 | Quinoneoxidoreductase 1 | <i>qorA</i> <i>qor1</i> <i>b4051</i> <i>JW4011</i> | | No | Sí | No | 3,87E-03 | 1,51 | 7,57E-03 | 1,70 |
| XF37_RS2_6105 | hypotheticalprotein | <i>yjbJ</i> <i>b4045</i> <i>JW4005</i> | | No | No | No | | | 7,28E-03 | 2,29 |
| XF37_RS2_6135 | Chorismatepyruvate-lyase | <i>ubiC</i> <i>b4039</i> <i>JW5713</i> | pyruvatebiosyntheticprocess | No | No | No | 6,98E-03 | 1,60 | 1,47E-03 | 1,54 |
| XF37_RS2_6145 | hypotheticalprotein | <i>malM</i> <i>malA</i> <i>b4037</i> <i>JW3997</i> | carbohidratetransport | No | No | No | 7,64E-04 | -3,29 | | |
| XF37_RS2_6155 | Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK | <i>malK</i> <i>b4035</i> <i>JW3995</i> | maltodextrintransmembranetransport | No | No | No | 2,25E-02 | -2,28 | | |
| XF37_RS2_6160 | Maltose/maltodextrin-binding periplasmic protein | <i>malE</i> <i>b4034</i> <i>JW3994</i> | carbohidratetransport | No | No | No | 3,97E-03 | -3,49 | | |
| XF37_RS2_6340 | Bifunctional purine biosynthesis protein PurH | <i>purH</i> <i>b4006</i> <i>JW3970</i> | 'de novo' IMP biosyntheticprocess | Sí | No | No | 6,80E-04 | 2,40 | 5,58E-05 | 2,67 |
| XF37_RS2_6345 | Phosphoribosylamine-glycine ligase | <i>purD</i> <i>b4005</i> <i>JW3969</i> | 'de novo' IMP biosyntheticprocess | No | No | No | 2,71E-03 | 1,86 | 1,06E-03 | 2,16 |
| XF37_RS2_6380 | Endonuclease V | <i>nfiyjaF</i> <i>b3998</i> <i>JW5547</i> | DNA repair | No | No | No | | | 1,29E-04 | 1,57 |
| XF37_RS2_6385 | Uroporphyrinogendecarboxylase | <i>hemE</i> <i>b3997</i> <i>JW3961</i> | heme B biosyntheticprocess | No | No | No | | | 1,01E-03 | 1,99 |
| XF37_RS2_6395 | Regulatorof sigma D | <i>rsd</i> <i>b3995</i> <i>JW3959</i> | negative regulation of DNA-templated transcription | No | No | No | | | 2,10E-02 | 2,28 |
| XF37_RS2 | 50S ribosomalprotein | <i>rplL</i> <i>b3986</i> <i>JW3949</i> | cytoplasmictranslation | No | No | No | 1,85E-02 | -1,82 | 1,58E-02 | -1,69 |

| | | | | | | | | | |
|------------------|--|---|--|----|----|----|----------|-------|--|
| 6445 | L7/L12 | | | | | | | | |
| XF37_RS2 6595 | Acetylornithinedea- cetylase | <i>argE b3957 JW3929</i> | argininebiosyntheticprocess | No | No | No | 1,23E-03 | 1,81 | |
| XF37_RS2 6665 | Catalase-peroxidase | <i>katG b3942 JW3914</i> | cellular response tohydro- genperoxide | No | No | No | 2,43E-02 | -1,56 | |
| XF37_RS2 6685 | Metrepressor | <i>metJ b3938 JW3909</i> | methioninebiosyntheticpro- cess | Sí | No | No | 1,86E-02 | -1,59 | |
| XF37_RS2 6780 | Flavodoxin/ferredo- xin--NADP reductase | <i>fprmvrA b3924 JW3895</i> | iron-sulfurclusterassembly | No | No | No | 5,25E-04 | 3,95 | |
| XF37_RS2 6805 | Triosephosphateiso- merase | <i>tpiAtpi b3919 JW3890</i> | gluconeogenesis | No | No | No | 4,82E-04 | 1,86 | |
| XF37_RS2 6830 | Periplasmicprotei- n CpxP | <i>cpxPyiiO b4484 JW5558</i> | | No | No | No | 3,46E-04 | -1,57 | |
| XF37_RS2 6855 | Superoxidedismutase [Mn] | <i>sodA b3908 JW3879</i> | cellular response to sele- nium ion | No | No | No | 6,05E-03 | 2,57 | |
| XF37_RS2 6930 | Formate dehydroge- nase-O major subunit | <i>fdoG b3894 JW3865</i> | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 2,83E-02 | -3,36 | |
| XF37_RS2 6935 | Formatedehydroge- nase-O iron-sulfur- subunit | <i>fdoH b3893 JW3864</i> | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 5,75E-04 | -4,55 | |
| XF37_RS2 6940 | Formatedehydroge- nasecytochrome b556(fdo) subunit | <i>fdoI b3892 JW3863</i> | anaerobicelectrontrans- portchain | No | No | No | 4,28E-02 | -2,93 | |
| XF37_RS2 7135 | Molybdenum cofactor guanylyltransferase | <i>mobAchlB mob narB b3857 JW3829</i> | bis(molybdopterin guanine dinucleotide)molybdenum biosynthetic process | No | No | No | 1,62E-04 | 1,64 | |
| XF37_RS2 | Xaa-Pro dipeptidase | <i>pepQ b3847 JW3823</i> | peptidecatabolicprocess | No | No | No | 1,93E-04 | 1,60 | |

| | | | | | | | | |
|------------------|---|--|-------------------------------------|----|----|----|----------|-------|
| 7185 | | | | | | | | |
| XF37_RS2 7190 | Fatty acid oxidation complex subunit alpha | <i>fadBoldB b3846</i> <i>JW3822</i> | fattyacid beta-oxidation | No | No | No | 1,91E-02 | 1,50 |
| XF37_RS2 7265 | 5-methyltetrahydro- teroyltriglutamate-- homocysteinemethyl- transferase | <i>metE b3829 JW3805</i> | homocysteinemetabolicpro- cess | No | No | No | 3,34E-05 | 1,71 |
| XF37_RS2 7560 | Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase C | <i>ppiCparVA b3775</i> <i>JW3748</i> | | No | No | No | 2,08E-02 | 1,96 |
| XF37_RS2 7565 | Ketol-acidreductoiso- merase (NADP(+)) | <i>ilvC b3774 JW3747</i> | isoleucinebiosyntheticpro- cess | No | No | No | 3,75E-06 | 1,60 |
| XF37_RS2 7670 | Ribokinase | <i>rbsK b3752 JW3731</i> | D-ribosecatabolicprocess | No | No | No | 8,28E-04 | -1,61 |
| XF37_RS2 7675 | Ribose import binding protein RbsB | <i>rbsBprlBrbsP b3751</i> <i>JW3730</i> | D-ribosetransmembrane- transport | No | No | No | 6,15E-03 | -1,53 |
| XF37_RS2 7685 | Ribose import ATP- binding protein RbsA | <i>rbsA b3749 JW3728</i> | D-ribosetransmembrane- transport | No | No | No | 1,62E-04 | -1,56 |
| XF37_RS2 7710 | Aspartate--ammonia ligase | <i>asnA b3744 JW3722</i> | asparaginebiosyntheticpro- cess | No | No | No | 4,28E-04 | 1,82 |
| XF37_RS2 7720 | ProteinMioC | <i>mioCmieB b3742</i> <i>JW3720</i> | regulationofcelldivision | No | No | No | 3,44E-03 | 1,75 |

BIBLIOGRAFÍA

- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4):611-22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Dudek, C.-A., & Jahn, D. (2022). PRODORIC: state-of-the-art database of prokaryotic gene regulation. *Nucleic Acid Res.*, 50(D1):D295-D302. doi:10.1093/nar/gkab1110
- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A., & Sasakawa, C. (2002). Bicarbonate Ion Stimulates the Expression of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Genes in Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infection and Inunity*, 70(7): 3500–3509. doi:10.1128/IAI.70.7.3500-3509.2002
- Amigo N, Z. Q. (2016). Overexpressed Proteins in Hypervirulent Clade 8 and Clade 6 Strains of Escherichia coli O157:H7 Compared to E. coli O157:H7 EDL933 Clade 3 Strain. *PLoS One*, 11(11).
- Andreozzi, E., & Uhlich, G. (2020). PchE Regulation of Escherichia coli O157:H7 Flagella, Controlling the Transition to Host Cell Attachment. *International journal of molecular sciences*, 21(13): 4592. doi:10.3390/ijms21134592
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *Microbiology reviews*, 215-237.
- Arenas-Hernández, M., Rojas-López, M., Medrano-López, A., Nuñez-Reza, K., Puentes, J. L., Martínez-Laguna, Y., & Torres, A. (2014). Environmental regulation of the long polar fimbriae 2 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*, 357(2): 105–114. doi:10.1111/1574-6968.12513
- Arndt, D., Grant, J. G., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., & Liang, Y. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acid Research*. doi:10.1093/nar/gkw387
- Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., & Siegele, D. A. (2001). Global Analysis of Escherichia coli Gene Expression during the Acetate-Induced Acid Tolerance

- Response. *Journal of Bacteriology*, 183(7): 2178–2186. doi:10.1128/JB.183.7.2178-2186.2001
- Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hedge, M., Wood, T., & Jayaraman, A. (2007). Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on Escherichia coli O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. *Infection and Immunity*, 75(9): 4597–4607. doi:10.1128/IAI.00630-07
- Bardiau, M. (2010). Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet Res*, 41(5): 57. doi:10.1051/vetres/2010029
- Bergan, J. (2012). Shiga Toxins. *Toxicon*, (6):1085-107. doi:10.1016/j.toxicon.2012.07.016
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 .
- Brunder, W., Schidt, H., & Karch, H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 . *Microbiology*.
- Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology*, 24(4), 767–77.
- Carver T, H. S. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28;4:464-9. doi:10.1093/bioinformatics/btr703
- Castanie-Cornet, M.-P. (1999). Control of Acid Resistance in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 181(11): 3525–3535. doi: 10.1128/jb.181.11.3525-3535.1999
- Chan, Y. S. (2016). Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, (4):1597-1610. doi:10.1007/s00253-015-7236-3
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., & Qi Jin, Y. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acid Research*. doi:10.1093/nar/gki008
- Clarke, M., Hughes, D., Zhu, C., Boedeker, E., & Sperandio, V. (2006). The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *PNAS*, 103(27): 10420–10425. doi:10.1073/pnas.0604343103

- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18):3674-6. doi:10.1093/bioinformatics/bti610
- Connolly, J. P. (2015). From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 6: 568. doi:10.3389/fmicb.2015.00568
- Croxen, M. A. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pages26–38. doi:https://doi.org/10.1038/nrmicro2265
- Datsenko, K., & Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12): 6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297
- Dean-Nystrom, E. A. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves. *Infect Immun*, 66(9): 4560–4563. doi:10.1128/IAI.66.9.4560-4563.1998
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., & Jensen, L. J. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Proteome research*, 18(2):623-632. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00702
- Ferens, W. A. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*, 8(4):465-87. doi:10.1089/fpd.2010.0673
- Fitzhenry, R. (2006). Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes and Infection*, 8(7), 1741-1749. doi:https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.012
- Galperin, M., Makarova, K., Wolf, Y., & Koonin, E. (2015). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gku1223.
- Gaytán, M. O. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 129. doi:10.3389/fcimb.2016.00129

- Giovacchini, C. (2021). *Bolentín integrado de vigilancia*. Argentina: Ministerio de salud. Retrieved from https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-09/biv_560_se_30_con_informe_SUH.pdf
- Götz S., G.-G. J. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acid Research*, 34(20), 3420–3435. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Grass, G. (2006). Iron transport in Escherichia coli: All has not been said and done. *BioMetals*, 19, 159–172. doi:10.1007/s10534-005-4341-2
- Gruber, C., & Sperandio, V. (2015). Global analysis of posttranscriptional regulation by GlmY and GlmZ in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun*, 83(4), 1286–95. doi:10.1128/IAI.02918-14
- Ha, J., Wang, B., Fang, X., Means, W., McCormick, R., Gomelsky, M., & Zhu, M.-J. (2013). c-di-GMP signaling regulates E. coli O157:H7 adhesion. *Veterinary microbiology*.
- Hayashi, T., Shinagawa, H., Kozo, M., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., . . . Hattori, M. (2001). Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic Escherichiacoli O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12. *DNA Research*, 8, 11–22.
- Heimer, S. R., Welch, R. A., Perna, N. T., Pósfai, G., Evans, P. S., James, K. B., . . . Mobley, H. L. (2002). Urease of Enterohemorrhagic Escherichia coli: Evidence for Regulation by Fur and a trans-Acting Factor. *Infect Immun*, 70(2): 1027–1031. doi:10.1128/iai.70.2.1027-1031.2002
- Herold, S., Siebert, J., Huber, A., & Schmidt, H. (2005). Global Expression of Prophage Genes in Escherichia coli O157:H7 Strain EDL933 in Response to Norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3): 931–944. doi:10.1128/AAC.49.3.931-944.2005
- House, B., Kus, J. V., Prayitno, N., Mair, R., Que, L., Chingcuanco, F., . . . Foster, D. B. (2009). Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 virulence. *Microbiology Society*. doi:<https://doi.org/10.1099/mic.0.025171-0>
- Jia, T., Liu, B., Mu, H., Qian, C., Wang, L., Li, L., . . . Liu, B. (2021). A Novel Small RNA Promotes Motility and Virulence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in Response to Ammonium. *mBio*, 12. doi:10.1128/mBio.03605-20

- Jiang, L., Yang, W., Jiang, X., Yao, T., Wang, L., & Yang, B. (2021). Virulence-related O islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Microbes*, 13(1). doi:10.1080/19490976.2021.1992237
- Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol*, (1): 142–201. doi:10.1128
- Katouli, M. (2010). Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol*, 2(2):59-72. doi:22347551
- Kenny, B. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 65(7): 2606–2612. doi:10.1128/iai.65.7.2606-2612.1997
- Klopfenstein, D., Zhang, L., Pdersen, B., Ramírez, F., Warwick Vesztrocy, A., Naldi, A., . . . Tang, H. (2018). GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology Analyses. *Sci Rep*.
- Kurabayashi, K., Agata, T., Asano, H., Tomita, H., & Hirakawa, H. (2016). Fur Represses Adhesion to, Invasion of, and Intracellular Bacterial Community Formation within Bladder Epithelial Cells and Motility in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 84(11): 3220–3231. doi:10.1128/IAI.00369-16
- Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259); 680-685.
- Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., & Welch, R. A. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular microbiology*. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02997.x
- Lau, C. K., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *Microbiology Reviews*, 273–298. doi:https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049
- Ledesma, M. A. (2010). The Hemorrhagic Coli Pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 Is an Inducer of Proinflammatory Cytokine Secretion in Intestinal Epithelial Cells. *PLoS One*, 5(8): e12127. doi:10.1371/journal.pone.0012127
- Lee, S.-Y., & Kang, D.-H. (2015). Survival mechanism of *Escherichia coli* O157:H7 against combined treatment with acetic acid and sodium chloride. *Food microbiology*, 95-104. doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.021

- Lethem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., & Welch, R. A. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by Escherichia coli O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular Microbiology*, 45(2), 277–288.
- Lim, J. Y. (2010). A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, (1): 5–14.
- Lingwood, C. (1996). Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol*, (4):147-53. doi:10.1016/0966-842x(96)10017-2
- Liu, Y., Han, R., Wang, J., Yang, P., Wang, F., & Yang, B. (2020). Magnesium Sensing Regulates Intestinal Colonization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *mBio*. doi:10.1128/mBio.02470-20
- Lorenzo, d., Wee, S., Herrero, M., & Neilands, J. B. (1987). Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol*, 169(6): 2624–2630. doi:10.1128/jb.169.6.2624-2630.1987
- Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Gorvel, J.-P., & Comerci, D. J. (2011). In search of Brucella abortus type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cellular Microbiology*, 13(8), 1261–1274. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01618.x
- McWilliams, B. D. (2014). EHEC Adhesins. *Microbiol Spectr*, 2 (2). doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013
- Nairz, M., & Günter, W. (2020). Iron in infection and immunity. *Molecular Aspects of Medicine*. doi:https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100864
- Naskar, S., Hohl, M., Tassinari, M., & Low, H. H. (2020). The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Microreview*, 412-424. doi:10.1111/mmi.14664
- Naylor, S. W. (2003). Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in the Bovine Host. *Infect Immun*, 71(3): 1505–1512. doi:10.1128/IAI.71.3.1505-1512.2003
- Nguyen, Y. (2012). Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2 : 90. doi:10.3389/fcimb.2012.00090

- Owen, J. A., Punt, J., & Stranford, S. A. (2014). *Kuby Inmunología* (Séptima ed.). McGraw Hill.
- Persad, A. K. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. *Microbiol Spectr*, 2(4). doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
- Phillips, A. (2000). Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut*, 47(3): 377–381. doi:10.1136/gut.47.3.377
- Poirier, K., Faucher, S. P., Béland, M., Brousseau, R., Gannon, V., Martin, C., . . . Daigle, F. (2008). Escherichia coli O157:H7 Survives within Human Macrophages: Global Gene Expression Profile and Involvement of the Shiga Toxins. *Infection and Immunity*, 76(11): 4814–4822. doi:10.1128/IAI.00446-08
- Poirier, K., Faucher, S., Béland, M., Brousseau, R., Gannon, V., Martin, C., . . . Daigle, F. (2008). Escherichia coli O157:H7 Survives within Human Macrophages: Global Gene Expression Profile and Involvement of the Shiga Toxins. *Infection and Immunity*, 76(11): 4814–4822. doi:10.1128/IAI.00446-08
- Porcheron, G. I. (2015). Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 2-14.
- Ramakers, C., Ruijter, J., & Leka, R. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339(1):62-6. doi:10.1016/s0304-3940(02)01423-4
- Rashid, R., Tarr, P., & Moseley, S. L. (2006). Expression of the Escherichia coli IrgA homologue adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microb Pathog*, 41(6): 207–217. doi:10.1016/j.micpath.2006.07.006
- Rendón, M. A. (2007). Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25): 10637–10642. doi:10.1073/pnas.0704104104
- Rivas, M. (2008). Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing Escherichia coli Infections in Children, Argentina. *Emerg Infect Dis*, (5): 763–771. doi: 10.3201/eid1405.071050

- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverria, A. I., & Parma, A. E. (2004). ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRAGICA Y SINDROME UREMICO HEMOLITICO EN ARGENTINA. *Medicina*, 2004;64(4):352-356.
- Roman L. Tatusov, M. Y. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acid Research*, 28(1): 33–36. doi:10.1093/nar/28.1.33
- Runyen-Janecky, L. J. (2013). Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:55. doi:10.3389/fcimb.2013.00055
- Schmidt, H., Henkel, B., & Karch, H. (1997). A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 265-272.
- Schmidt, H., Karch, H., & Beutin, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the E. coli a-hemolysin family . *FEMSLE*.
- Sheldon, J. (2016). Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogenes. *Microbiology Spectrum*, 4(2). doi:doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0010
- Sheldon, Jessica R.; Laakson, Holly A; Heinrichs, David E. (2016). Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogenes. *Microbbiology Spectrum*, 4(2). doi:doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0010
- Slater, S. L. (2018). The Type III Secretion System. *Microbiol Immunol*, 416:51-72. doi:10.1007/82_2018_116.
- Soares, S. C., Geyik, H., Ramos, R. T., de Sá, P. H., Barbosa, E. G., Baumbach, J., . . . Azevedo, V. (2016). GIPSy: Genomic island prediction software. *Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.008
- Sudo, N., Soma, A., Muto, A., Iyoda, S., Suh, M., Kurihara, N., . . . Sekine, Y. (2014). A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic Escherichia coli. *Microbiol*, 60, 44–50. doi:10.2323/jgam.60.44

- Sun, H., Wang, M., Liu, Y., Wu, P., Yao, T., Yang, W., . . . Yang, B. (2022). Regulation of flagellar motility and biosynthesis in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Gut microbes*, 14. doi:10.1080/19490976.2022.2110822
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., . . . Mering, C. v. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acid research*. doi:10.1093/nar/gkaa1074
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., . . . Sasakawa, C. (2001). *tox*B Gene on pO157 of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infection and Immunity*, 69(11): 6660–6669. doi:10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001
- Tobe, T. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in Escherichia coli O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(40): 14941–14946. doi:10.1073/pnas.0604891103
- Tobe, T., Yen, H., Takahashi, H., Kagayama, Y., Ogasawara, N., & Oshima, T. (2014). Antisense Transcription Regulates the Expression of the Enterohemorrhagic Escherichia coli Virulence Regulatory Gene *ler* in Response to the Intracellular Iron Concentration. *PLoS One*, 9 (7). doi:10.1371/journal.pone.0101582
- Tuttle, J. (1999). Lessons from a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect*, 122(2):185-92. doi:10.1017/s0950268898001976
- van de Kar, N., Monnens, L., Karmali, M., & van Hinsbergh, V. (1992). Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). BACTERIAL IRON SOURCES: From Siderophores. *Microbiology*, 58:611–47. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123811

- Weiss, S. M. (2009). IRSp53 Links the Enterohemorrhagic E. coli Effectors Tir and EspFU for Actin Pedestal Formation. *Cell Host & Microbe*, 5(3), 244-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.003>
- Xue, Y., Zhang, H., Wang, H., Hu, J., Du, M., & Zhu, M.-J. (2014). Host inflammatory response inhibits Escherichia coli O157:H7 adhesion to gut epithelium through augmentation of mucin expression. *Infection and immunity*, 82(5):1921-30. doi:10.1128/IAI.01589-13
- Yang, B., Feng, L., Wang, F., & Wang, L. (2015). Enterohemorrhagic Escherichia coli senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection. *Nature Communications*, 6: 6592. doi:10.1038/ncomms7592
- Zumbrun, S., Hanson, L., Sinclair, J., Freedy, J., Melton-Celsa, A., Rodriguez-Canales, J., . . . O'Brien, A. (2010). Human Intestinal Tissue and Cultured Colonic Cells Contain Globotriaosylceramide Synthase mRNA and the Alternate Shiga Toxin Receptor Globotetraosylceramide. *Infect. Immun.*, 78, 4488-4499. doi:10.1128/IAI.00620-10