

PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE
RIBOSOME PROFILING PARA SU
APLICACIÓN EN CEPAS BACTERIANAS

POSTA A PUNTO DO PROTOCOLO DE RIBOSOME
PROFILING PARA A SÚA APLICACIÓN EN CEPAS
BACTERIANAS

SETTING UP A BACTERIAL RIBOSOME
PROFILING PROTOCOL

Paula Catarina Sánchez Pedreira

Centro: Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), UDC

Tutor: Antón Vila Sanjurjo

2015

PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE *RIBOSOME* **PROFILING PARA SU APLICACIÓN EN CEPAS** **BACTERIANAS**

Paula Catarina Sánchez Pedreira

RESUMEN

En el presente trabajo se han dado los primeros pasos para establecer un protocolo a seguir en un futuro para aplicarlo en la técnica de *Ribosome profiling* en cepas bacterianas, como las utilizadas en este proyecto (dos cepas de *Escherichia coli*, JM101 y JM101 KsgA19). Tras poner a punto el protocolo durante el transcurso del trabajo, se ha podido observar que se obtienen fragmentos de ARN de tamaños comprendidos entre los 40 y 20 nucleótidos, tamaño que se debe obtener al aplicar esta reciente técnica, *Ribosome profiling*.

INTRODUCCIÓN

Ribosome profiling

En los últimos años las técnicas de análisis global del genoma (Genome wide analysis) se han comenzado a utilizar rutinariamente para realizar distintos estudios sobre la función celular ([Ingolia., 2010](#)). Por ello, recientemente se ha iniciado la investigación sobre una técnica denominada *Ribosome profiling*, de la cual son muy pocos autores los que han comenzado a dar los primeros pasos en ella. Por esto, es necesario comenzar estudios para poner a punto protocolos a seguir para distintos tipos celulares, tanto eucariotas como procariotas.

El *Ribosome profiling* es una técnica, que poco a poco, se va abriendo camino en aquellas investigaciones enfocadas en conocer cuáles son las proteínas que están siendo sintetizadas en un momento concreto dentro de las células que son de su interés (tanto bacterias como células eucariotas), como sería, por ejemplo, el someterlas a estrés (aumentar o disminuir la temperatura a la que crecen, añadir en el medio en el que crecen

algún antibiótico, poner las células en un cultivo con cantidad limitada de algún nutriente esencial para ellas, etc.)

Esta novedosa técnica se basa en la secuenciación de aquellos fragmentos de ARN que son protegidos de las nucleasas por los ribosomas (aproximadamente un tamaño de ARN de unos 30 nucleótidos) en el momento en que están siendo traducidos ([Ingolia et al., 2009](#)), para así reconocer qué proteínas están siendo sintetizadas.

Para llevar a cabo *Ribosome profiling*, es imprescindible seguir una serie de pasos que aparecen representados en la **Figura 1** ([Ingolia et al., 2012](#)). Estos pasos pasan por la recogida de las células objeto de estudio (por ejemplo, filtrando el medio en el que están creciendo), continuando por la lisis celular para recoger los ribosomas que se encuentran unidos al ARN mensajero. Una vez que se obtienen los ribosomas se realiza una digestión con una nucleasa para eliminar todo el ARN que no nos interesa. Tras esta digestión se recogen los ribosomas utilizando una centrifugación a altas revoluciones, y a partir del pellet recogido se realiza la purificación del ARN mensajero que estaba protegido del ataque de la nucleasa gracias a los ribosomas.

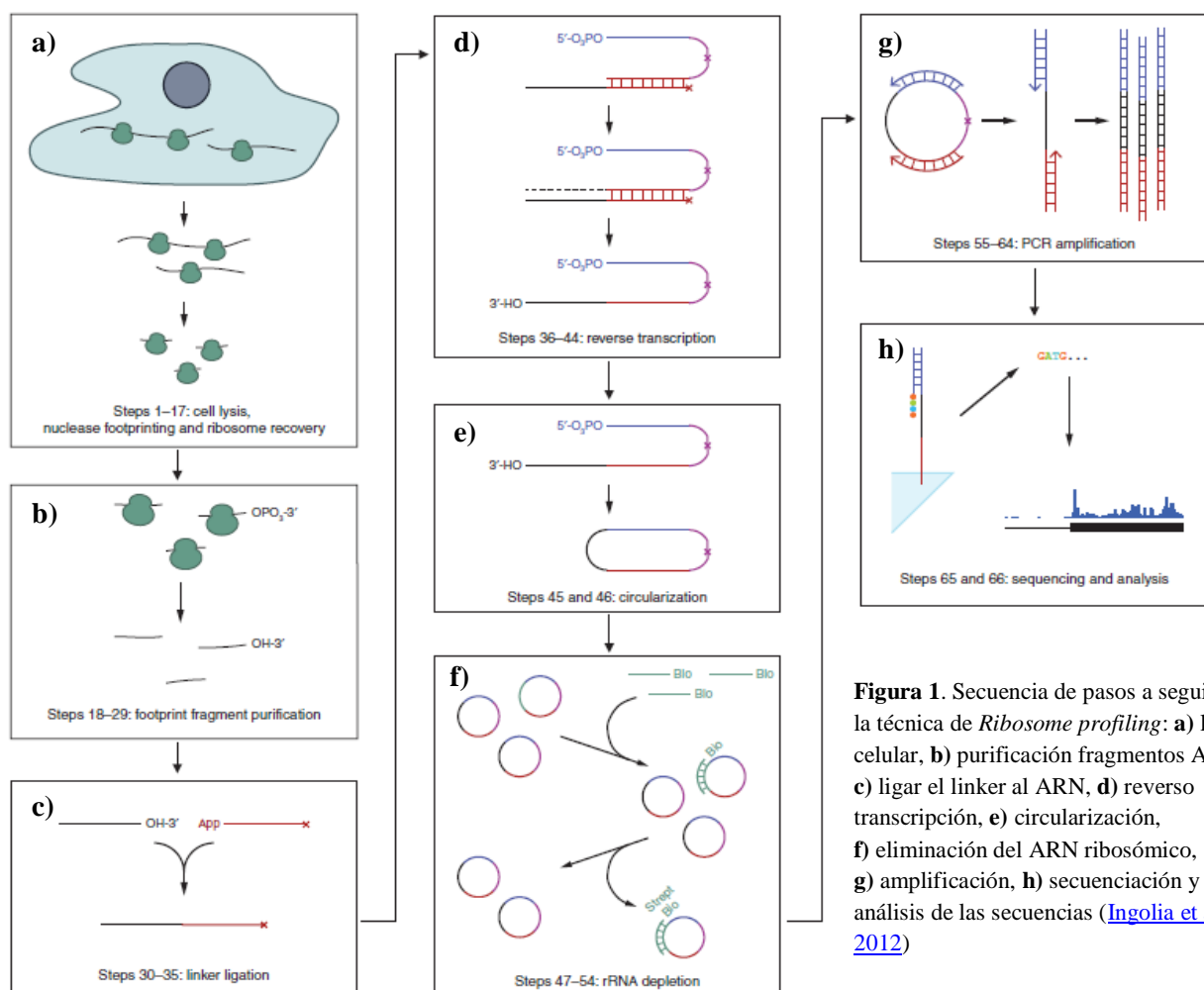


Figura 1. Secuencia de pasos a seguir en la técnica de *Ribosome profiling*: **a)** lisis celular, **b)** purificación fragmentos ARN, **c)** ligar el linker al ARN, **d)** reverse transcripción, **e)** circularización, **f)** eliminación del ARN ribosómico, **g)** amplificación, **h)** secuenciación y análisis de las secuencias ([Ingolia et al., 2012](#))

Una vez que se obtiene la secuencia del ARN mensajero, es necesario realizar una desfosforilación de los fragmentos, puesto que la nucleasa utilizada deja un grupo fosfato de residuo en el extremo 3' que debe ser eliminado para poder continuar con los siguientes pasos. Una vez que se tienen los fragmentos de ARN mensajero listos, se comienza con la preparación de las librerías de cDNA, para lo cual es necesario unir linkers a cada uno de los extremos de los fragmentos de ARN y una cola poliadenilada en el extremo 3' para que se pueda unir el primer y se lleve a cabo la transcripción reversa, es decir, que a partir de una secuencia de ARN se obtenga una secuencia de ADN. Por último se circulariza las secuencias de ADN obtenidas, se amplifica mediante PCR y por último se realiza la secuenciación de éste, proporcionándonos la secuencia de nucleótidos de ADN correspondiente a las de ARN mensajero que estaban siendo traducidas por los ribosomas en el momento concreto de interés ([Ingolia 2010](#); [Oh et al., 2011](#); [Ingolia et al., 2012](#)). Así los datos obtenidos al terminar con todos los pasos de la técnica de *Ribosome profiling* nos proporciona una información que relaciona la medida global de ARN mensajero y los niveles de proteína que se encuentran dentro de la célula ([Ingolia et al., 2012](#)).

Las aplicaciones que se le pueden dar al *Ribosome profiling*, gracias a que brinda la oportunidad de observar únicamente aquellas secuencias que están siendo traducidas en un momento concreto, son:

- Cuando se coexpresan isoformas alternativas de ARN mensajero dentro de una célula, la traducción de los sitios de iniciación aguas arriba puede ocultar la presencia de los que se encuentran aguas abajo. Estos sitios de iniciación internos pueden encontrarse gracias al *Ribosome profiling*, tras realizar un tratamiento con harringtonina (fármaco que inmoviliza a los ribosomas inmediatamente después de la iniciación de la traducción) ([Ingolia et al., 2012](#))
- Puede servir para medir la expresión génica a nivel de síntesis proteica ([Ingolia et al., 2012](#))
- Para avanzar en el estudio de aquellos mecanismos de traducción o cotraducción *in vivo* ([Ingolia et al., 2012](#))

La técnica de *Ribosome profiling* tiene ventajas sobre la técnica de Polisome profiling (técnica que ayuda a medir el ARN mensajero que constituye las diferentes fracciones de ribosomas usando microarrays) ([Ingolia et al., 2012](#)) puesto que da medidas de expresión más precisas.

Kasugamicina

Las cepas utilizadas a lo largo de este proyecto son JM101 y JM101 KsgA19. La última contiene una mutación que le confiere resistencia al antibiótico kasugamicina (Ksg), mientras que JM101 se considera como la cepa “salvaje”.

El antibiótico kasugamicina es un aminoglucósido que inhibe la iniciación de la traducción bloqueando la unión del ARN de transferencia a la subunidad 30S de los ribosomas de las bacterias, puesto que se posiciona dentro del canal de ARN mensajero, concretamente entre los residuos universalmente conservados A794 y G926 del ARN ribosómico 16S, que aparecen representados en la **Figura 2** ([Schuwirth et al., 2006](#)). Esto es lo que ocurriría en una bacteria que carece de resistencia al antibiótico Ksg, como es el caso de la cepa de *E. coli* JM101.

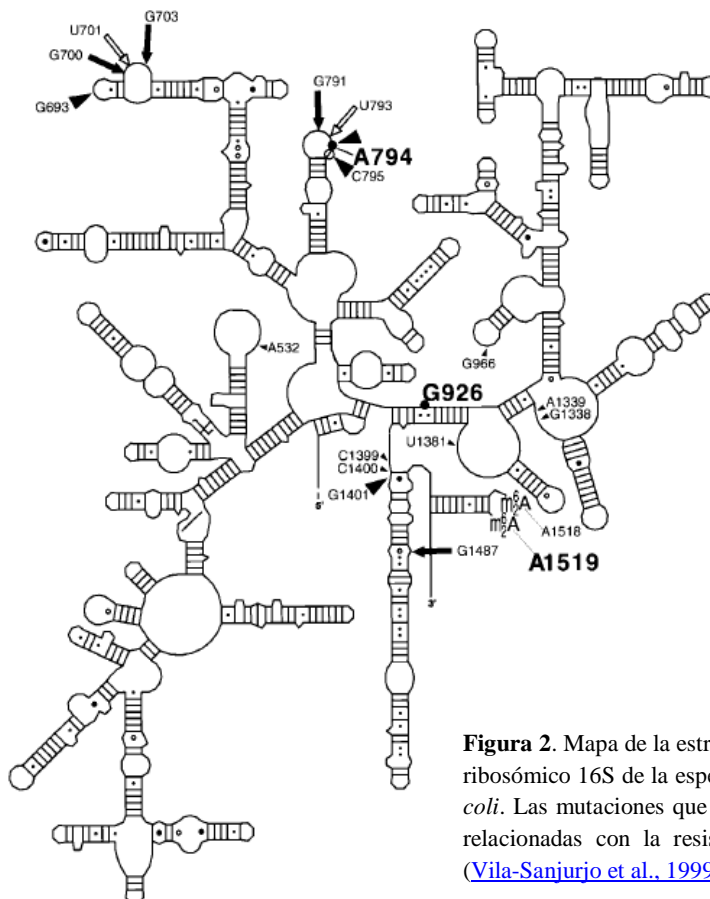


Figura 2. Mapa de la estructura secundaria del ARN ribosómico 16S de la especie bacteriana *Escherichia coli*. Las mutaciones que aparecen en negritas están relacionadas con la resistencia al antibiótico Ksg ([Vila-Sanjurjo et al., 1999](#))

La resistencia a la kasugamicina que se presenta en algunas bacterias, como en el caso de la cepa JM101 KsgA19, parece que se podría explicar como la pérdida de afinidad de la subunidad 30S al antibiótico. En el caso de JM101 KsgA19, la mutación se encuentra

en una metilasa llamada KsgA que modifica dos adeninas cerca del extremo 3' del ARN ribosómico 16 S.

El gen *ksgA* es el encargado de codificar para una metiltransferasa que tiene el papel de metilar dos adeninas que se encuentran posicionadas cerca del extremo 3' del ARN 16S en la subunidad 30S ([Helser et al., 1971](#); [Helser et al., 1972](#)). En el artículo de [Schuwirth et al. \(2006\)](#) se comenta que las adeninas que son metiladas por la metiltransferasa están alejadas del sitio de unión de la kasugamicina, por lo que esa metilación tendría que provocar un cambio conformacional que estaría asociado a la adquisición de resistencia a la Ksg. Este cambio conformacional es el que observaron [Demirci et al. \(2010\)](#). Los resultados que obtuvieron fueron que al evitar que la metilación de las adeninas tuviese lugar, se producía resistencia a la Ksg, puesto que al no estar metiladas, la base U793 ocupaba el lugar que normalmente ocupaban las adeninas metiladas y además las bases adyacentes, A792 y A794, mostraban un pequeño cambio (**Figura 3**). Todo esto da lugar a un cambio conformacional (predicho por [Schuwirth et al., 2006](#)) provocando que el sitio de unión de la Ksg quede ocluido por la U793. Por lo tanto, se puede decir que este cambio de conformación en la hélice 24a provoca la resistencia a la Ksg ([Demirci et al., 2010](#)).

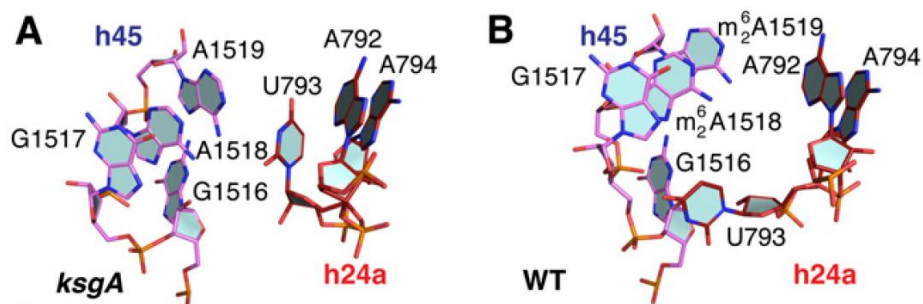


Figura 3. Mapas estructurales en los que se muestran los cambios ocurridos en la hélice 24a causados por la no metilación de las adeninas. Se observa el movimiento de la base U793 hacia el sitio de unión de la kasugamicina cuando las adeninas no están metiladas (**A**) y la conformación normal de la hélice 24a cuando las adeninas sí están metiladas (**B**) ([Demirci et al., 2010](#))

Se sabe que la adición de ciertos antibióticos al medio durante el crecimiento bacteriano produce una respuesta de expresión génica parecida a la de estrés celular. En el caso de la kasugamicina se ha apuntado la existencia de un efecto similar, pero sus detalles no han sido descritos ([Jones et al., 1992](#); [VanBogelen & Neidhardt, 1990](#))

Por todo esto, se eligen las cepas JM101 (“salvaje”) y JM101 KsgA19 (mutada) para realizar este proyecto, con el objetivo final de determinar las diferencias a nivel de

expresión génica global entre la cepa “salvaje” (JM101) y la cepa mutada (JM101 KsgA19), al exponerlas al antibiótico kasugamicina durante su crecimiento.

Los objetivos del presente trabajo son: 1. Establecer un protocolo a seguir para realizar la técnica de *Ribosome profiling* en bacterias; 2. Determinar los pasos críticos del protocolo; 3. Obtener una evaluación preliminar de los resultados obtenidos con esta técnica utilizando dos cepas de *Escherichia coli*.

RESULTADOS

Material y métodos

Para la realización de este trabajo se utilizaron las cepas de la especie bacteriana *E. coli* que he comentado anteriormente, JM101 (“salvaje”) y JM101 KsgA19 (mutada), que fueron expuestas al antibiótico kasugamicina.

El protocolo que se siguió se apoyó en los pasos que aparecen redactados en el artículo de [Oh et al. \(2011\)](#) e [Ingolia et al. \(2012\)](#), con las modificaciones oportunas para poner a punto el protocolo para las cepas de *E. coli* que cité anteriormente. Los pasos seguidos para la realización de la técnica de *Ribosome profiling*, junto con las modificaciones realizadas de los protocolos de [Oh et al. \(2011\)](#) e [Ingolia et al. \(2012\)](#), se detallan a continuación.

1. Cultivo bacteriano

Se realizaron overnights (cultivos de cada una de las cepas en 5 mL de medio líquido LB que se dejan crecer durante toda la noche) para después realizar el cultivo de las cepas seleccionadas para la realización del proyecto (JM101 y JM101 KsgA19) en 250 mL de medio LB líquido. Transcurrido el tiempo necesario, se eligieron aquellos overnights en los que se observó el medio turbio y por lo tanto ya saturado de bacterias. A partir de estos overnights se hizo una dilución 1:100, es decir, se inocularon 2.5 mL de este cultivo en los 250 mL de medio de cultivo LB nuevo.

Una vez inoculados los matraces con 250 mL de LB nuevo, se incubaron durante tres horas en una cámara a 37°C y con agitación constante. La secuencia de cultivo que se siguió en el presente trabajo, fue la que se explica a continuación. En dos matraces se

cultivó la cepa JM101 y en otros dos la cepa JM101 Ksg A19. A uno de los matraces que contenía la cepa JM101 y a otro que contenía la cepa JM101 KsgA19 se les añadió 0.25 mL del antibiótico kasugamicina 1M, después de que el cultivo pasar una hora creciendo a 37°C en el matraz, mientras que a los otros dos matraces no se les añadió ningún tipo de sustancia. Como ya he comentado con anterioridad, los cultivos se mantuvieron durante tres horas dentro de la estufa (a 37°C) y en agitación constante para que todo el medio de cultivo mantuviese unas condiciones uniformes. Al finalizar las tres horas se obtuvieron bacterias que sufrieron estrés por causa del antibiótico Ksg, y otras que crecieron en medio LB normal, es decir, sin ningún tipo de estrés.

De cada uno de los cultivos se realizó una réplica para tener un control y observar si los resultados que se obtienen al final cambian de una a otra. Así, finalmente, se obtienen ocho muestras con las que trabajar.

2. Filtración de las bacterias

Tras realizar el cultivo de las bacterias, es necesario recogerlas, para lo cual se ha utilizado el método de filtración del cultivo en el que estaban creciendo.

Un paso crucial dentro del protocolo de *Ribosome profiling*, es llegar a realizar la filtración de una forma en la que las bacterias no continúen sintetizando proteínas, es decir, provocar que los ribosomas paren de traducir en el momento de interés. Para ello fue preciso averiguar una forma rápida para llevar a cabo este paso.

La primera prueba que se realizó fue bajar la temperatura de los cultivos (que estaba a 37°C) hasta unos 8°C con la ayuda de nitrógeno líquido. Para ello el matraz se agitó con cuidado sobre el nitrógeno líquido durante aproximadamente tres minutos y medio. Tras bajar la temperatura a 8°C (controlada por un termómetro) y sin dejar que el cultivo se congelase, el matraz se sumergió en hielo con agua, para mantener la temperatura del cultivo entre los 4°C y los 0°C. Esta bajada de temperatura es esencial para hacer que los ribosomas de las bacterias no se muevan del sitio en donde se encontraban, es decir, no desprotejan la secuencia de ARN mensajero sobre la que estaban.

Una vez que se bajó la temperatura se comenzó con la filtración. Para ello se utilizó una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro y un frasco y embudo de filtración. Se comenzó filtrando 150 mL de una sola vez, conectando el frasco de filtración al grifo y

aplicando un fluxo de agua fuerte. El tiempo de filtración era demasiado alto, sobrepasando los 45 minutos, por lo que se descartó filtrar 150 mL de cultivo de una sola vez.

A continuación se probó filtrar 50 mL en vez de 150 mL, utilizando el mismo proceso. El tiempo de filtración disminuyó, pero seguía siendo demasiado alto, unos 30 minutos, permitiendo que el medio de cultivo que se había filtrado, se pusiera a temperatura ambiente pudiendo provocar que los ribosomas que tendrían que estar sobre el ARN mensajero se movieran del sitio, que es precisamente lo que se desea evitar en esta técnica.

Tras estas pruebas se pensó en añadir 0.73 mL de Cloranfenicol 0.1M para inhibir la síntesis proteica (ya que se une al ribosoma 50S de las bacterias), dejándolo actuar durante unos 2 minutos antes de comenzar a enfriar el medio de cultivo y se realizó otra prueba. El Cloranfenicol ayuda a mantener a los ribosomas parados sobre la secuencia de ARN mensajero de aproximadamente 30 nucleótidos, pero para asegurarnos de que estos ribosomas no se movían del sitio, se bajó la temperatura igualmente. En este caso se bajó hasta unos 6°C (no menos, para evitar que las bacterias se congelasen) con la ayuda de nitrógeno líquido durante unos 4 minutos, y a continuación se mantuvo el matraz sumergido en hielo para evitar el aumento de temperatura.

Una vez que el cultivo se situó bajo el hielo se comenzó con la filtración, pero esta vez utilizando una bomba de vacío en vez de conectar el grifo al frasco de filtración. Además se utilizaron dos frascos y dos embudos de filtración en lugar de uno. En vez de filtrar en un solo frasco de filtración 150 mL, se añadió sobre un embudo de filtración 75 mL de cultivo y en el otro embudo otros 75 mL. Esta vez la filtración fue rápida (aproximadamente 5 minutos), con lo que se evitó que la temperatura del medio de cultivo ascendiera demasiado durante la filtración. Así, el tiempo de enfriamiento y filtración de 150 mL de cultivo se redujo de 45 minutos a unos 10-15 minutos.

Tras comprobar que con la bomba de vacío y la utilización de dos frascos de filtración, el tiempo de este proceso se reducía tanto, finalmente se decidió por filtrar 75 mL en cada uno de los frascos de filtración, para que las bacterias estuvieran el menor tiempo posible a temperatura ambiente y se mantuvieran a una temperatura por debajo de los 8°C.

Además de hacer este cambio, entre un cultivo de una cepa y el cultivo de otra cepa se estableció una media hora de diferencia en cuanto al comienzo de su incubación, para que diera tiempo a filtrar un cultivo sin que los otros pasasen más tiempo del debido en hielo, y todos los cultivos se comenzaran en enfriar cuando llevaran el mismo tiempo incubando (3 horas), para que no hubiera ningún tipo de variación con respecto a ese factor, y la filtración de todos los cultivos se llevasen a cabo bajo las mismas condiciones.

Una vez que con la filtración se elimina todo el medio de cultivo, las bacterias quedan como una masa viscosa sobre el filtro que se puede recoger con la ayuda de una espátula de goma pre-congelada en nitrógeno líquido.

Tras recoger las bacterias con la espátula, se sumergieron en nitrógeno líquido (lo más rápido posible) para congelarlas y meterlas en tubos Falcon y así poder mantenerlas almacenadas dentro de un congelador de -80°C y conservarlas en ese momento concreto en el que se encontraban (después de las 3 horas de crecimiento), hasta que se comenzara con el siguiente paso.

3. Lisis de las bacterias

Tras la filtración ya tenemos las bacterias congeladas y preparadas para el siguiente paso del protocolo. Este tercer paso consiste en la lisis de las bacterias para obtener los ribosomas que estarán protegiendo el ARN mensajero que nos interesa evaluar.

A partir de aquí hay que tener especial cuidado con las contaminaciones con RNAsas durante todo el proceso de *Ribosome profiling*, puesto que una contaminación con RNAsas podría suponer la pérdida total de datos o la obtención de datos erróneos. Por ello es preciso tratar el agua miliQ y los compuestos que se vayan a utilizar durante la técnica con DEPC (dietilpirocarbonato, compuesto que inactiva RNAsas, puesto que reacciona con los grupos amino, hidroxilo y tiol de las proteínas) para asegurarnos de que las sustancias utilizadas están totalmente libres de RNAasas que pudieran estropear las muestras obtenidas. Además, todo el material usado (bandejas para pesar compuestos, espátulas o cucharas para recogerlo) se lavó con agua tratada con DEPC y RNaseZAP (solución que elimina las RNAsas de las superficies en las que se aplica, *Ambion*®) para evitar contaminaciones. Por supuesto, el uso de guantes en todos los procesos e incluso evitar tocar con las manos los botes que se vayan a utilizar, es crucial. Además, el lugar de trabajo también debe ser limpiado con lejía diluida y alcohol.

Para realizar la lisis de las bacterias es necesario la utilización de un buffer de lisis, cuyos componentes son, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 20 mM Tris pH 8, 0.1% NP-40, 0.4% Triton X-100, 100 U/mL de DNasa I libre de RNasa, 0.5 U/μL de Superase.In (Ambion®) y Cloranfenicol 1mM. El MgCl₂ y el NH₄Cl fueron tratados con DEPC, al igual que toda el agua miliQ utilizada, para asegurarnos de que las sustancias utilizadas estaban totalmente libres de RNasas que pudieran estropear las muestras.

Una vez obtenido el buffer se realizó la siguiente mezcla: 8 mL de buffer de lisis, 10 μL de RNase Inhibitor (*EnzynomicsTM*) y 20 μL de DNasa. Todo ello se añadió a una batidora de pequeño volumen (Bead-Beater®, *BioSpec Products*), en la que también se añadieron unas pequeñas esferas de 0.1 mm (*BioSpec Products*; material Zirconia/Silica). Estas esferas ayudan a lisar las bacterias al batir la mezcla con la batidora.

Todos los materiales y soluciones que se utilizan en este paso deben estar en hielo, manteniéndolos a una temperatura menor a los 4°C, para que al añadir las muestras, éstas no sufran un aumento de temperatura mayor a los 4°C.

Tras añadir todos los productos en la batidora se batió durante 10 segundos. Pasados estos 10 segundos se obtuvo una suspensión, la cual se recogió (con cuidado de no coger las esferas), se pasó a tubos eppendorf (que vienen libres de RNasas) y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm (Centrifuge 5420 R v 2.2, rotor FA-45-30-11; *eppendorf*), a una temperatura de 4°C (para así mantener la temperatura baja) durante 10 minutos. Después de centrifugar la muestra se recogió el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf nuevo.

Ese sobrenadante se congeló sumergiéndolo en nitrógeno líquido. Una vez que las ocho muestras se congelaron se almacenaron en un congelador de -80 °C para ser utilizado en el siguiente paso.

4. Cuantificación de ARN

De cada una de las muestras obtenidas tras la lisis se realizó una dilución 1:100 (5 μL de muestra + 500 μL de Tris pH 8), para obtener la concentración de ARN que tenemos en ellas (**Tabla 1**) con la ayuda del Nanodrop. Tras medir esta concentración, se pudieron hacer los cálculos necesarios para preparar el siguiente paso del protocolo, la digestión del ARN que no está protegido por los ribosomas.

Sample ID	ng/ μ l	A260	A280	260/280	Constant
JM_187	7.91	0.2	0.2	1.11	40
JM_27	5.6	0.14	0.092	1.5	40
JM_X_187	4.86	0.1	0.1	0.84	40
JM_X_17	5.6	0.139	0.103	1.4	40
Ksg_227	8.21	0.2	0.2	1.04	40
Ksg_27	5.9	0.149	0.13	1.1	40
Ksg_X_17	5.4	0.136	0.125	1.1	40
Ksg_X_27	4.1	0.102	0.069	1.5	40

Tabla 1. Absorbancia y cantidad de ARN de cada una de las muestras recolectadas. JM_187 y JM_27 corresponden a la cepa JM101; JM_X_17 y JM_X_187 corresponden a la cepa JM101 con antibiótico; Ksg_227 y Ksg_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19; Ksg_X_17 y Ksg_X_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19 con antibiótico.

5. Digestión

Una vez que tenemos cuantificado el ARN podemos continuar con el siguiente paso. Ahora se trata de digerir todo el ARN que no esté protegido por los ribosomas.

Para ello se utiliza la Nucleasa S7 (750 U por muestra, *Roche Life Science*). De la muestra se necesitaban 0.5 mg de ARN. Como partiendo de los datos obtenidos en el Nanodrop las muestras tenían una mayor cantidad de ARN, fue necesario hacer diluciones para obtener un volumen final de 1.5 mL de muestra, para lo cual se utilizó el mismo buffer que se usó para la lisis.

A cada una de las muestras se les añadió 20 μ L de Nucleasa S7 (en la **Figura 4**, marcada con una flecha roja, se observa que esta es una cantidad suficiente de Nucleasa S7 para que la digestión sea la adecuada) y 7.5 μ L de CaCl_2 5 mM. Una vez que todas las muestras tenían estos reactivos se mantuvieron durante 1 hora a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ (Li et al., 2012). Tras esa hora incubando se les añadió a cada una de las muestras 20 μ L de EGTA 6 mM (compuesto que para la reacción), y se dejó actuar durante un minuto, para a continuación congelarlas y almacenarlas hasta que se comenzara con el siguiente paso.

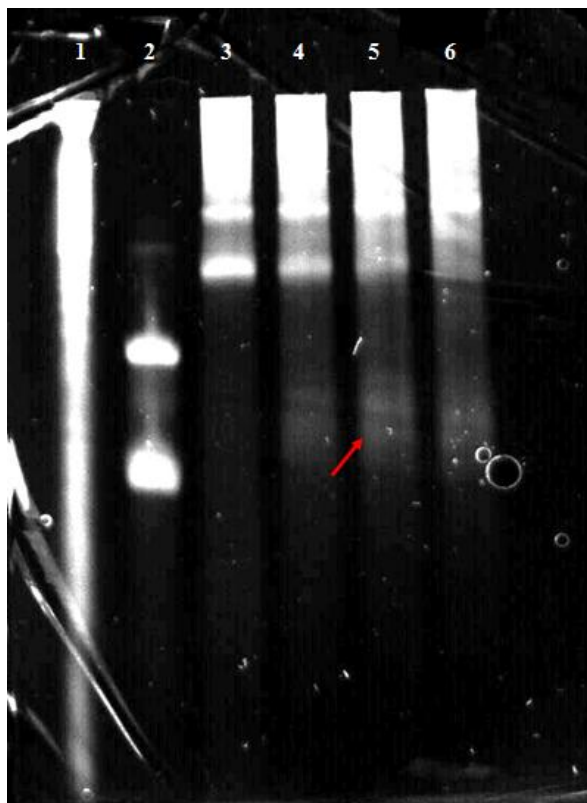


Figura 4. Pruebas con distinta cantidad de Nucleasa S7 para determinar la cantidad ideal para realizar la digestión. De izquierda a derecha aparece: pocillo 1, marcador; pocillo 2, primers de 30 y 40 nucleótidos; pocillo 3, muestra con ninguna cantidad de nucleasa; pocillo 4, muestra con 10 μL de nucleasa; pocillo 5, muestra con 20 μL de nucleasa; pocillo 6, muestra con 40 μL de nucleasa. Se observa que al añadir 20 μL (cantidad de nucleasa utilizada) aparece una banda en el gel entre los 30 y 40 nucleótidos, que es lo que nos interesa.

6. Purificación de ribosomas con ARN de interés

Una vez que la muestra se ha digerido se sigue con un paso de ultracentrifugación.

Este paso consiste en realizar una centrifugación de las muestras a una velocidad muy elevada (45000 rpm), durante 7 horas y 30 minutos y a una temperatura de 4°C (centrífuga Beckman Optima™ L-90K ultracentrífuga, rotor Ti70i).

Para realizar esta ultracentrifugación se necesita la preparación de un cojín de sacarosa y un buffer, que se dispondrán en unos tubos especiales que aguanten las altas revoluciones a las que son sometidos.

El cojín de sacarosa está compuesto por 0.5 g/mL de sacarosa, 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidor de RNasas (40 U/microlitro), buffer (MgCl_2 10 mM, NH_4Cl 100 mM, Tris pH8 20 mM, Cloranfenicol 1 mM, H_2O miliQ con DEPC) y agua miliQ tratada con DEPC. Cada tubo tiene que llevar 3.5 mL de la mezcla de cojín. El cojín de sacarosa se pone en el fondo del tubo que será donde queden atrapados todos los materiales que no tienen interés.

Cada uno de los tubos también lleva 22 mL de buffer encima de los 3.5 mL de cojín de sacarosa, para que cuando se ponga la muestra se encuentre en un medio estable.

Además, se le añade justo antes de añadir la muestra, Mercapetanol 5 mM. Este buffer lo hay que añadir con un cuidado extremo para que no se mezcle con la sacarosa.

Finalmente, a cada tubo se le añadirá un volumen final de 3 mL, en los que se encuentra la muestra de interés. Estos 3 mL están compuestos de 1.5 mL de muestra mezclada con 1.5 mL de sacarosa para que quede entre el cojín y el buffer, por lo que finalmente se tiene un volumen de 3 mL para añadir encima del cojín de sacarosa.

Tras tener las muestras en cada uno de los tubos, se llevaron a centrifugar. Después de las 7 horas y 30 minutos se retiraron los tubos de la ultracentrífuga. A continuación se recuperaron las muestras. Para ello se retiró el buffer y el cojín de sacarosa de los tubos, simplemente vertiéndolo. Una vez retirado en el fondo del tubo se pudo observar una mancha translúcida, que serían ribosomas unidos al ARN mensajero. Los ribosomas se resuspendieron en 100 μ L de agua miliQ libre de RNasas (tratada con DEPC) mezclada con SDS al 10% y Superase-In, puesto que es un paso muy crítico en el que no se puede cometer ninguna contaminación de este tipo, ya que se estropearía totalmente la muestra, aunque como comenté anteriormente, la contaminación por RNasas es un problema durante todos los pasos del protocolo, y que es necesario evitar.

Después de tener resuspendidas las muestras se comienza con el siguiente paso, que es la extracción del ARN.

7. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se utilizó la técnica de fenol-cloroformo.

En primer lugar se añade a cada una de las muestras 0.5 mL de fenol caliente (a 65°C). Después se le da un vórtex de 15 segundos para mezclar el fenol y la muestra. Una vez hecho esto, se centrifuga durante 2 minutos a 14000 rpm. Tras esta centrifugación obtenemos dos capas. La capa de arriba es donde está el ARN, por lo que es esa la que se recoge y se pone en un tubo eppendorf nuevo.

A continuación, a ese tubo se le añaden 0.5 mL de fenol frío (a unos 4°C) y se realizan los mismos pasos que en el caso anterior. Una vez que se obtienen las dos capas, se vuelve a recoger el sobrenadante que se pasa a otro tubo eppendorf nuevo.

Después de realizar este paso se le añaden, a cada una de las muestras, 0.5 mL de cloroformo, y se llevan a cabo las mismas fases que en los dos pasos anteriores.

Finalmente se recoge el sobrenadante y se le añaden 2 μL de GlycoBlue (compuesto coprecipitante de ácidos nucleicos de color azul; *Ambion*®) para poder ver el pellet. Además se le añade el doble de volumen de etanol que de muestra (en este caso serían 1 mL) y se mezcla. A continuación se le añade acetato de sodio 3M pH 5.5, para neutralizar la carga negativa del ARN, tras lo cual se almacenan las muestras a -80°C y se deja que el ARN precipite.

Tras dejar que el ARN precipite en un congelador de -20°C , se realiza una centrifugación a 14000 rpm y a 4°C durante 30 minutos. A continuación se elimina el sobrenadante dejando el pellet (que se ve de color azul gracias al GlycoBlue que se había añadido en pasos anteriores) y se añade 1 mL de etanol al 70% a cada uno de los tubos, lo que se centrifuga durante 2 minutos a 14000 rpm y a 4°C . Después se elimina otra vez todo el sobrenadante y se deja secar al aire hasta que las muestras se queden totalmente secas para poder continuar con los siguientes pasos.

Para resuspender el pellet se realiza una mezcla con 220 μL de H_2O con DEPC y 2 μL de Superase-In. A continuación se le añade a cada uno de los tubos 24 μL de esta mezcla y se resuspende con la ayuda de una pipeta. Esta preparación se puede almacenar a -80°C hasta su próximo uso.

Para determinar la concentración de ARN que hay en cada una de las muestras se analizan en el Nanodrop, obteniéndose los datos que se recogen en la **Tabla 2** que se comentan más adelante en el apartado de resultados.

8. Geles de acrilamida

Tras obtener los resultados que aparecen en la **Tabla 2** se realizó un gel de acrilamida y urea (*Novex*® TBE-Urea Gels) (**Figura A**) para observar las muestras. Para ello se utilizó un buffer compuesto por Tris 220 mM, ácido Bórico 180 mM y EDTA 5 mM. En cada pocillo se añadieron 2 μL de muestra más 2 μL de buffer de carga 2X (20 mM EDTA, 95% Formamida, 0.0125% BMB, X-Cyanol, SDS), tras desnaturalizar la muestra a 80°C durante 2 minutos. Además también se corrió en el gel un marcador de Ld10, que no funcionó a la perfección, como se puede observar en la **Figura A**.

Como ayuda para situar las bandas del ARN de interés en el gel, además del marcador (que se muestra en la **Figura B**), se buscó una forma de determinar el lugar de estas bandas (entre 20 y 40 pb). La solución fue utilizar un primer con 40 pb y otro con 30

pb. Para determinar la cantidad de primer que habría que añadir en el gel para que se observara bien, se corrió en un gel distintas cantidades de primer (**Figura B**). Una vez determinada la cantidad de primer (en este caso 1 μL , señalado en la **Figura B** con flechas rojas), se realizaron distintos geles con la totalidad de las muestras para así recortar las bandas que interesaban y seguir con el siguiente paso.

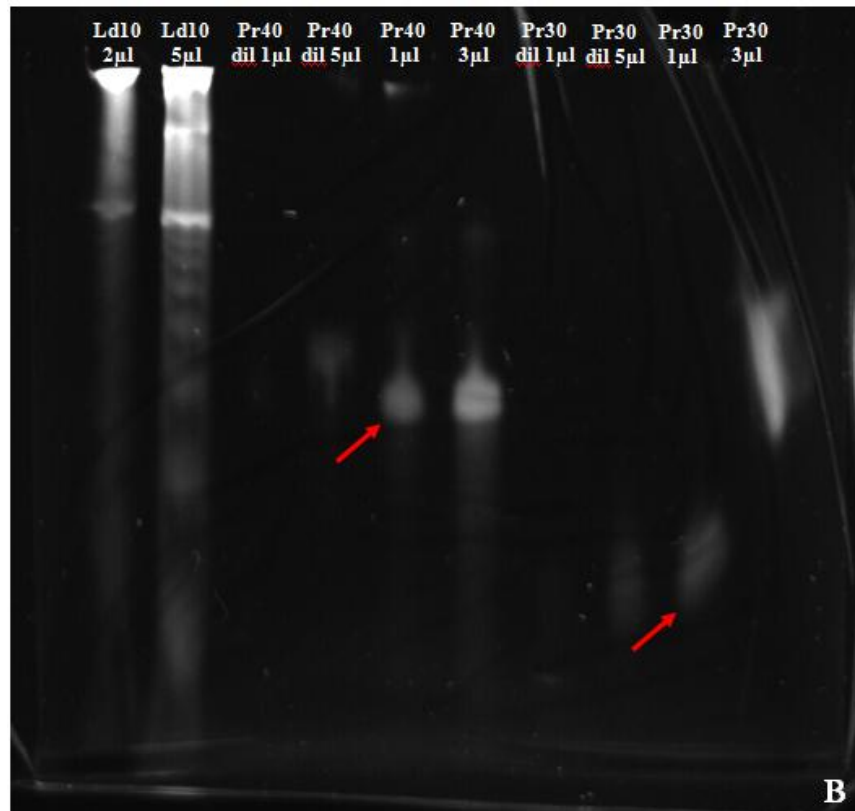
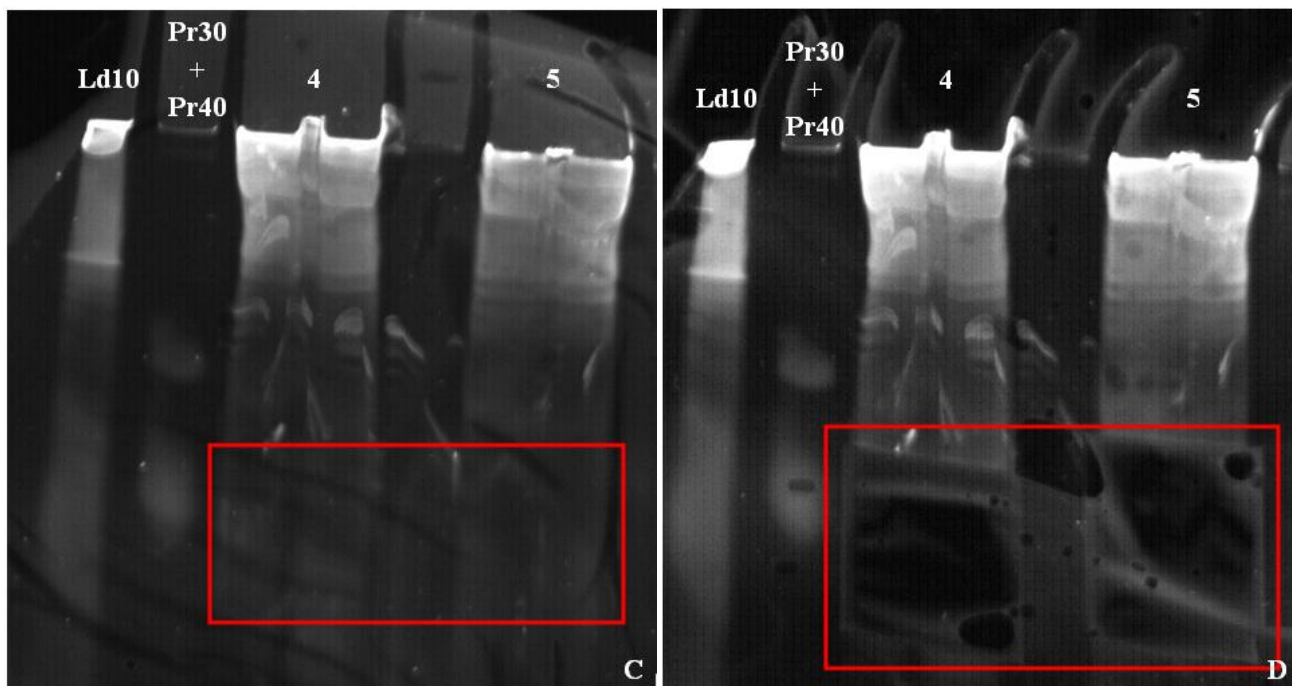


Figura B. Pruebas primers y marcador. De izquierda a derecha: 2 μL marcador; 5 μL marcador; 1 μL primer 40 nucleótidos diluido; 5 μL primer 40 nucleótidos diluido; 1 μL primer 40 nucleótidos; 3 μL primer 40 nucleótidos; 1 μL primer 30 nucleótidos diluido; 5 μL primer 30 nucleótidos diluido; 1 μL primer 30 nucleótidos; 3 μL primer 30 nucleótidos.

9. Obtención de los fragmentos de ARN de interés

Un ejemplo de los geles con la totalidad de la muestra aparece representado en la **Figura C**. En ella se pueden observar dos de las muestras, el leader y los primers de 30 y 40 nucleótidos. Como lo que nos interesa es recoger las bandas que se encuentren entre los 30 y 20 nucleótidos, utilizando los primers seleccionados, recortamos la parte del gel en donde se deberían situar esos fragmentos de ARN con ese número de nucleótidos, tal y como se muestra en la **Figura D**.



Figuras C y D. Geles en los que aparecen la muestra 4 y 5 (correspondientes a las muestras de JM101 crecida en medio con antibiótico y JM101 KsgA19 crecida en medio con antibiótico, respectivamente) antes de que se cortaran las bandas (C) y después de cortar las bandas de interés (D).

10. Purificación y extracción de ARN

Tras recortar las bandas de interés, se realizó la purificación y extracción de ARN. Para ello se siguió el protocolo que aparece a continuación:

1. Disponer las bandas del gel cortadas en tubos eppendorf libres de RNAsas
2. Agujerear tubos eppendorf de 0.5 mL en los que se añadirán las bandas, meterlos dentro de tubos de 1.5 mL y añadir 2 μ L de Superase-In, para a continuación centrifugarlos a 14000 rpm a 4°C durante 5 minutos
3. Una vez centrifugados se añaden 300 μ L de H₂O con DEPC y se le da un vórtex de unos 20 segundos para que se mezcle con la muestra. Se le da una pequeña centrifugación de 5 segundos y un vórtex de 5 segundos
4. A continuación las muestras se calientan durante 10 minutos a 70°C
5. Tras esos 10 minutos se vuelve a mezclar el contenido del tubo eppendorf con un vórtex de aproximadamente 30 segundos y se le da un pulso en la centrífuga
6. Se vuelven a añadir 2 μ L de Superase-In, se mezcla con un vórtex de 5 segundos y se da un pulso de 3 segundos

7. Después se pasa la muestra (con una punta cortada para que la muestra sea fácil de coger) a un tubo de filtración (Spin X[®] Centrifuge tube filter) y se centrifuga durante 3 minutos a 14000 rpm y a 4°C
8. A continuación se saca el filtro y se añaden 3 µL de GlicoBlue y 1 mL de Isoamilalcohol, pudiendo almacenar las muestras a -80°C

Una vez que se realizó la purificación del ARN, se resuspendió el ARN. Para esto se siguieron los pasos que aparecen a continuación:

1. Se dejan descongelar las muestras en un congelador de -20 para que el ARN precipite durante aproximadamente 30 minutos
2. Pasada la media hora, las muestras se centrifugan a 14000 rpm y 4°C durante 30 minutos
3. A continuación nos quedamos con el pellet eliminando el sobrenadante y se añade 1 mL de etanol 70% frío a cada uno de los tubos, tras lo cual se vuelve a centrifugar a 14000 rpm y 4°C, esta vez durante 2 minutos
4. Una vez centrifugadas las muestras, se elimina todo el sobrenadante, intentado dejar las muestras lo más secas posibles y a continuación se deja secar al aire hasta que veamos que las muestras están secas (no conviene dejarlas secar durante mucho tiempo, porque podría hacer difícil resuspender la muestra)
5. Por último se prepara una mezcla de Tris pH 7 10 mM con 2 µL de Superase-In y se añaden 25 µL de esta mezcla a cada una de las muestras

Tras seguir estos pasos obtenemos el ARN de interés que habíamos seleccionado en el gel de acrilamida. Para observar cuál era la cantidad final obtenida de ARN se realizó un análisis en el NanoDrop, los datos aparecen recogidos en la **Tabla 3**. Además también se corrieron las ocho muestras en un gel de acrilamida (**Figura E**) con el objetivo de observar si todas las muestras presentan las mismas bandas en el gel, lo que nos indicaría que conseguimos obtener el ARN del tamaño que nos interesaba.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos durante la realización del proyecto aparecen recogidos en lo que sigue.

En primer lugar, los datos de la cuantificación de cantidad de ARN que nos encontramos en las muestras (utilizando el NanoDrop), tras realizar los pasos de digestión, purificación de los ribosomas y extracción de ARN, aparecen en la tabla que se expone a continuación.

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	Constant
JM_187 (diluc. 1/2)	1679.8	41.996	19.448	2.2	40
JM_27	2981.4	74.536	35.392	2.1	40
JM_X_187	1780.1	44.502	20.996	2.1	40
JM_X_17 (diluc. 1/2)	1746.9	43.671	20.611	2.1	40
Ksg_227	2927.4	73.184	34.686	2.1	40
Ksg_27	2640	66	31.031	2.1	40
Ksg_X_17	2991.2	74.779	36.165	2.1	40
Ksg_X_27	2359.4	58.984	27.941	2.1	40

Tabla 2. Absorbancia y cantidad de ARN después del proceso de extracción. JM_187 y JM_27 corresponden a la cepa JM101; JM_X_187 y JM_X_27 corresponden a la cepa JM101 con antibiótico; Ksg_227 y Ksg_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19; Ksg_X_17 y Ksg_X_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19 con antibiótico. Se hizo una dilución de las muestras JM_187 y JM_X_17 porque superaban el límite de detección del NanoDrop.

En la **Tabla 2** podemos observar que en las muestras hay una gran cantidad de ARN, lo que nos da una idea de que el protocolo seguido hasta este paso ha dado unos buenos resultados.

A continuación se corrieron las muestras en un gel de acrilamida (**Figura A**), tal y como detallé en el apartado materiales y métodos.

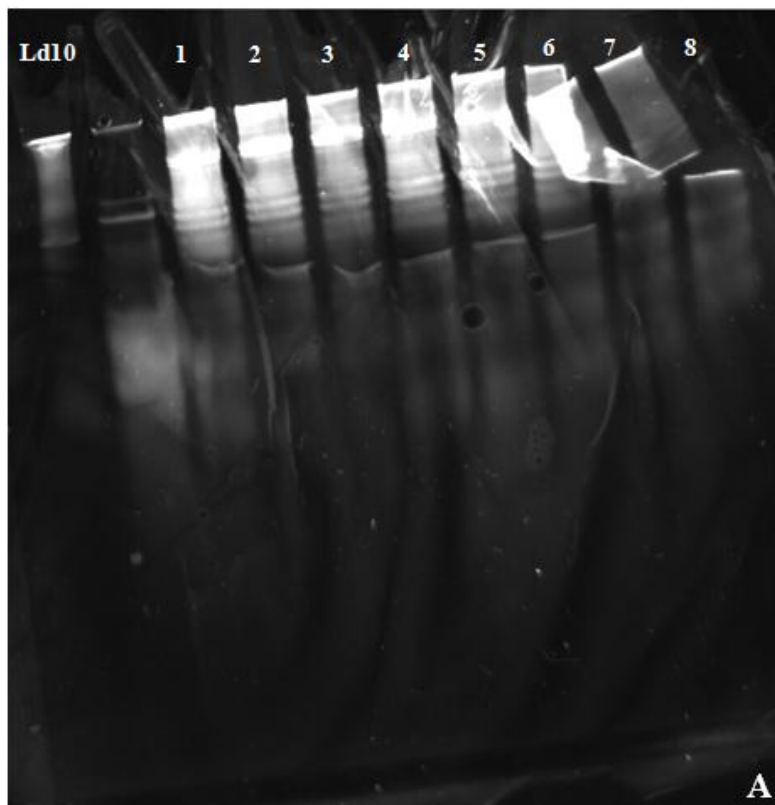


Figura A. Marcador (Ld10) y las 8 muestras. Los números corresponden en orden, de izquierda a derecha, a las siguientes muestras: JM_187 (JM101 sin antibiótico); JM_X_187 (JM101 con antibiótico); Ksg_227 (JM101 KsgA19 sin antibiótico); JM_X_17 (JM101 con antibiótico); Ksg_X_17 (JM101 KsgA19 con antibiótico); Ksg_X_27 (JM101 KsgA19 con antibiótico); Ksg_27 (JM101 KsgA19 sin antibiótico); JM_27 (JM101 sin antibiótico).

Lo que se puede observar en este gel es que las ocho muestras presentan las mismas bandas, lo cual es un buen resultado, puesto que nos indica que todas las muestras presentan fragmentos de ARN del mismo tamaño, que es uno de los objetivos de este proyecto, ya que el que presenten las mismas bandas muestra que el protocolo ha salido según lo previsto.

Tras observar estos datos, tanto los del NanoDrop como los de la imagen del gel de acrilamida, continuamos con los pasos que aparecen en los puntos 9 y 10 (Obtención de los fragmentos de interés y Purificación y extracción de ARN, respectivamente) del apartado de material y métodos.

Después de realizar estos pasos 9 y 10, como último paso de este proyecto se volvió a cuantificar el ARN (**Tabla 3**) y se corrieron las 8 muestras en otro gel de acrilamida (**Figura E**).

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	Constant
JM_187	27.4	0.686	0.497	1.4	40
JM_27	35.6	0.891	0.538	1.7	40
JM_X_187	27.9	0.696	0.459	1.5	40
JM_X_17	49.4	1.235	0.739	1.7	40
Ksg_227	32.4	0.810	0.547	1.5	40
Ksg_27	12.4	0.310	0.162	1.9	40
Ksg_X_17	23.3	0.582	0.350	1.7	40
Ksg_X_27	6.2	0.156	0.079	2.0	40

Tabla 3. Absorbancia y cantidad de ARN después de purificar el ARN de un tamaño de entre aproximadamente 20 y 30 nucleótidos. JM_187 y JM_27 corresponden a la cepa JM101; JM_X_187 y JM_X_27 corresponden a la cepa JM101 con antibiótico; Ksg_227 y Ksg_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19; Ksg_X_17 y Ksg_X_27 se corresponden con la cepa JM101 KsgA19 con antibiótico.

Observando los datos recogidos en la **Tabla 3**, se puede deducir que en todas las muestras hay una buena concentración de ARN, a excepción de la muestra Ksg_X_27.

Para poder determinar si el ARN de todas las muestras tiene el mismo tamaño, se corrieron en un gel de acrilamida 5 μ L de cada muestra, como ya he comentado anteriormente. El resultado se puede observar en la **Figura E**, que aparece representada a continuación y a partir de la cual se podrán sacar diversas conclusiones y se determinará si el protocolo seguido y modificado hasta ahora ha proporcionado los resultados que se esperaban.

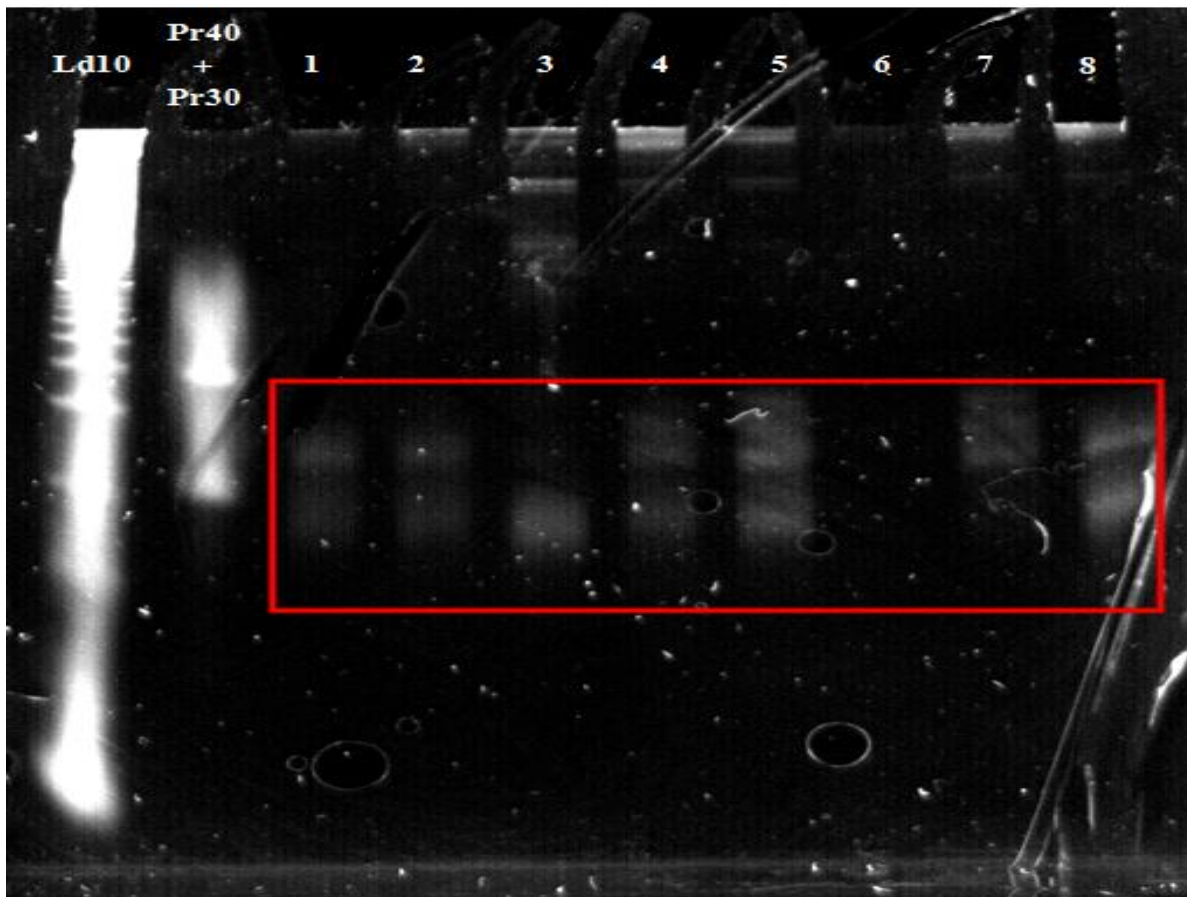


Figura E. Gel en el que se han corrido todas las muestras (1-8) para observar la eficacia del protocolo hasta este momento, y asegurarnos de que las bandas aparecen alrededor de los 30 nucleótidos. Los números corresponden en orden, de izquierda a derecha, a las siguientes muestras: JM_187 (JM101 sin antibiótico); JM_X_187 (JM101 con antibiótico); Ksg_227 (JM101 KsgA19 sin antibiótico); JM_X_17 (JM101 con antibiótico); Ksg_X_17 (JM101 KsgA19 con antibiótico); Ksg_X_27 (JM101 KsgA19 con antibiótico); Ksg_27 (JM101 KsgA19 sin antibiótico); JM_27 (JM101 sin antibiótico).

A partir de este gel (**figura E**) se pueden deducir varias cosas:

1. La muestra número 6, que corresponde a Ksg_X_27, no contiene nada de ARN, por lo que esta muestra debería de repetirse en un futuro
2. La muestra número 3, correspondiente a Ksg_227, tiene un pico en el tamaño de ARN de tamaño más bajo, y una banda muy tenue en el de tamaño más alto, por lo que probablemente también habría que repetir todo el proceso con esta muestra
3. El resto de muestras presentan dos bandas bien diferenciadas (que se encuentran dentro del recuadro rojo en la **Figura E**), lo que nos informa que la selección del ARN de interés puede haber sido exitosa, puesto que estas dos bandas se encuentran alrededor de los 30 nucleótidos, que es el tamaño aproximado del ARN

mensajero que está protegido por el ribosoma durante la traducción (Ingolia et al., 2009).

CONCLUSIÓN

Hasta el último paso de este trabajo, la puesta a punto del protocolo para llevar a cabo la técnica de *Ribosome profiling* parece haber tenido éxito, por lo que dos de los objetivos del trabajo se han cumplido, pudiendo, en un futuro, aplicarlo y continuar con el objetivo de determinar si hay diferencias entre la expresión de las proteínas de las cepas seleccionadas y entre la no exposición o sí exposición de éstas a un antibiótico, como el que se utiliza en este trabajo, la Kasugamicina.

Como continuación de este trabajo se realizarán los siguientes pasos del protocolo, como sería la obtención de las secuencias del ARN que se han aislado, pasando ese ARN mensajero a cDNA y a continuación secuenciarlo, para obtener la secuencia del ARN mensajero que estaba protegido por los ribosomas, que a fin de cuentas, es el objetivo de la técnica de *Ribosome profiling*, para así determinar cuál sería la secuencia de aminoácidos que se estaba expresando, y por lo tanto, la proteína o proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Demirci H., Iv F.M., Belardinelli R., Kelley A.C., Ramakrishnan V., Gregory S.T., Dahlberg A.E. & Jogl G. (2010) Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function *RNA* **16**, 2319-2324

Gene-Wei Li, Oh E. & Weissman J.S. (2012) The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature* **484**, 538-541

Guttman M., Russell P., Ingolia N.T., Weissman J.S. & Lander E.S. (2013) Ribosome Profiling Provides Evidence that Large Noncoding RNAs Do Not Encode Proteins. *Cell* **154**, 240-251

Helser T.L., Davies J.E., Dahlberg J.E. (1971) Change in methylation of 16S ribosomal RNA associated with mutation to kasugamycin resistance in *Escherichia coli* *Nature New Biology* **233**, 12-14

Helser T.L., Davies J.E. & Dahlberg J.E. (1972) Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli* *Nature New Biology* **235**, 6-9

Illumina (2010-2012) Ribosome Profiling Enables Comprehensive Translation Analysis. Application Note: Sequencing

Ingolia, N.T. (2010) Genome-wide translational profiling by ribosome footprinting. *Methods Enzymology* **470**, 119-142

Ingolia N.T., Brar G.A., Rouskin S., MacGeachy A.M. & Weissman J.S. (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature* **7**, 1534-1550

Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R.S. & Weissman J.S. (2009) Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science* **324**, 218-223

Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R.S. & Weissman J.S. (2009) Supporting material for: Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science*

Jones P.G., Cashel M., Glasaer G. & Neidhardt F.C. (1992) Function of a Relaxed-Like State following Temperature Downshifts in *Escherichia coli* *Journal of Bacteriology* **174**, 3903 - 3914

Kapeli K. & Yeo G. W. (2012) Genome-wide approaches to dissect the roles of RNA binding proteins in translational control: implications for neurological diseases. *Frontiers in neuroscience* **144**, 1-15

Oh E. et al (2011) Selective Ribosome Profiling Reveals the Cotranslational Chaperone Action of Trigger Factor In Vivo. *Cell* **147**, 1296-1308

Schuwirth B.S., Day J. M., Hau C.W., Janssen G.R., Dahlberg A.E., Cate J.H.D. & Vila-Sanjurjo A. (2006) Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. *Nature Structural Molecular Biology* **13**, 879-886

VanBogelen R.A. & Neidhardt F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5589 - 5593

Vila-Sanjurjo A., Squires C.L. & Dahlberg A.E. (1999) Isolation of Kasugamycin Resistant Mutants in the 16 S Ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **293**, 1-8