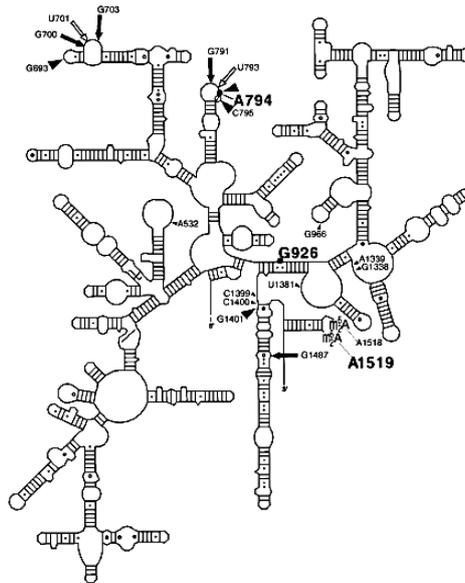


IMPLICACIÓN DEL RIBOSOMA BACTERIANO EN RESPUESTA AL ESTRÉS

IMPLICACIÓN DO RIBOSOMA
BACTERIANO EN RESPOSTA AO
ESTRÉS

INVOLVEMENT OF THE BACTERIAL
RIBOSOME IN RESPONSE TO
STRESS





IMPLICACIÓN DEL RIBOSOMA BACTERIANO EN RESPUESTA AL ESTRÉS

IMPLICACIÓN DO RIBOSOMA BACTERIANO EN RESPOSTA AO ESTRÉS

INVOLVEMENT OF THE BACTERIAL RIBOSOME IN RESPONSE TO STRESS

**Facultad de Ciencias
Servicios de Apoyo a la Investigación**

El Dr. Antón Vila Sanjurjo y la Dra. María del Carmen Veiga Barbazán, en calidad de tutores del trabajo “Implicación del ribosoma bacteriano en respuesta al estrés”, autorizan a Sofía González Suurbach su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 8 de julio de 2016.

VºBº Tutor externo

Fdo.:

Antón Vila Sanjurjo

María del Carmen Veiga Barbazán

Índice

1. RESUMEN	1
2. OBJETIVOS	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. LA SÍNTESIS PROTEICA.....	3
3.1.1. El ribosoma.....	3
3.1.2. Tipos de RNAs.....	3
3.1.3. La traducción	4
3.2. RESISTENCIA A LA KASUGAMICINA	4
3.3. LA PROTEÍNA PY	6
3.3.1. Papel del ribosoma en el estrés celular:	7
3.4. <i>RIBOSOME PROFILING</i>	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1. <i>RIBOSOME PROFILING</i>	11
4.2. ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN PLACA.....	11
4.2.1. Preparación de medios de cultivo y cultivos celulares	11
4.2.2. Siembra de los cultivos.....	13
4.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL	15
5. RESULTADOS	16
5.1. ENSAYOS DE CHOQUE TÉRMICO EN PLACA	16
5.1.1. Efecto del frío en el fenotipo de resistencia	17
5.1.2. Efecto de la delección del gen <i>yfiA</i> en el fenotipo de resistencia.....	19
5.2. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE CULTIVOS SOMETIDOS A CHOQUE TÉRMICO PARA ANÁLISIS POR MEDIO DE <i>RIBOSOME PROFILING</i>	24
6. DISCUSIÓN.....	29
6.1. ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA DE <i>RIBOSOME PROFILING</i> PARA EL ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS MUTACIONES EN LA POSICIÓN 926 DEL rRNA 16S.	29
6.2. ENSAYOS DE PY EN EL FENOTIPO DE LOS MUTANTES EN LA POSICIÓN 926 DEL rRNA 16S.	29
7. CONCLUSIONES	32
8. REFERENCIAS.....	33

1. RESUMEN

Varias mutaciones individuales en el rRNA 16S producen resistencia al antibiótico kasugamicina (Ksg). Recientes estudios en nuestro laboratorio han revelado que un efecto de algunas de estas mutaciones es la alteración de la respuesta al estrés. El presente trabajo trata de aplicar dos técnicas diferentes al estudio de la implicación del ribosoma bacteriano en la respuesta al estrés celular: (i) el *Ribosome profiling* (RP), técnica que permite conocer a nivel del genoma completo qué proteínas se están sintetizando en un momento determinado en un grupo de células y (ii) los ensayos de crecimiento en placa.

El estudio se basa en que cuando las células son cultivadas a bajas temperaturas, tras el paso por la fase estacionaria, se vuelven sensibles a la Ksg (Mato Boado, 2013). Por tanto, estas células resultan un buen modelo para el estudio de la implicación del ribosoma bacteriano en la respuesta al estrés. Estudios preliminares efectuados por el grupo de investigación en el que se realizó este trabajo implicaban a la proteína de estrés PY en el fenotipo causado por algunas de las mutaciones Ksg (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004). Para poder estudiar este efecto en mayor detalle, se han unido dichas mutaciones ribosomales con una delección de la proteína PY (Carballido López, 2014). El estudio del crecimiento de las cepas mutantes bajo condiciones de estrés corrobora la implicación de la proteína en el fenotipo observado.

2. OBJETIVOS

Entre los objetivos de este trabajo destacan, por una parte, establecer las condiciones de cultivo bajo estrés para los estudios de *Ribosome profiling* y, por otra, investigar la influencia de la proteína PY sobre el fenotipo bajo estudio. El objetivo a largo plazo de esta investigación pasa por entender la implicación del ribosoma bacteriano en la respuesta al estrés celular.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA SÍNTESIS PROTEICA

3.1.1. El ribosoma

Los ribosomas son orgánulos compuestos por RNA ($\approx 65\%$, en bacterias) y proteínas ($\approx 35\%$) cuya principal función es la traducción de la información genética. Están compuestos por una subunidad mayor y una subunidad menor que, en procariotas, poseen un coeficiente de sedimentación (CS) de 50S y 30S, respectivamente (Jiménez García & Merchant Larios, 2003). A su vez, la subunidad mayor está compuesta por 31 proteínas y rRNA 5S y 23S, mientras que la subunidad menor está formada por 21 proteínas y rRNA 16S (Benito & Espino, 2012). Estas dos subunidades, 30S y 50S, se combinan para formar un ribosoma (monosoma) con un CS de 70S. Durante la traducción, los ribosomas se unen formando complejos denominados polisomas o polirribosomas.

Muchos antibióticos actúan a nivel del ribosoma debido a que las proteínas son indispensables para el metabolismo. De esta manera, si se consigue actuar sobre el proceso de traducción de las bacterias, se puede inhibir la síntesis proteica, provocando su muerte y, por tanto, consiguiendo la desaparición o reducción de enfermedades producidas por las mismas. Por este motivo, el ribosoma se considera uno de los principales objetivos de la acción de los antibióticos. Debido a ello, y al posible papel principal que se cree que el ribosoma tiene en la adaptación al estrés ambiental (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004), su estudio es de gran interés.

3.1.2. Tipos de RNAs

Existen 3 tipos de RNAs implicados en la síntesis proteica (Lodish *et al.*, 2000; Jiménez García & Merchant Larios, 2003; Benito & Espino, 2012):

- 1) RNA ribosómico (rRNA): RNA que, junto con proteínas, conforma el ribosoma.
- 2) RNA mensajero (mRNA): RNA que lleva la información genética del DNA y se acopla al ribosoma actuando como patrón para la síntesis de proteínas.
- 3) RNA transferente (tRNA): RNA que se une a un aminoácido determinado y lo transporta hasta el ribosoma para su incorporación a la cadena polipeptídica que está siendo sintetizada.

3.1.3. La traducción

En bacterias, la subunidad grande del ribosoma puede alojar un péptido de ≈ 30 aminoácidos de extensión (Ban *et al.*, 2000). En la subunidad pequeña del ribosoma se traduce el código genético y en la subunidad grande se produce el ensamblaje secuencial de los aminoácidos. Los ribosomas poseen 3 sitios de unión a aminoácidos entre ambas subunidades, donde se pueden unir 3 moléculas de tRNA:

- 1) Sitio P (peptidil): se encuentra en la subunidad pequeña y reconoce el codón de iniciación.
- 2) Sitio A (aminoacil): donde el tRNA coloca los aminoácidos.
- 3) Sitio E: sitio de salida del tRNA, ya carente del aminoácido.

La traducción comienza cuando, en el sitio P de la subunidad pequeña, se reconoce el codón de iniciación AUG en el tRNA, que codifica para una metionina. En ese momento, se une la subunidad grande formando el complejo de iniciación 70S. Durante la elongación de la cadena peptídica, un segundo tRNA cargado se une al sitio A y una vez reconocido, pasa al sitio P, donde se produce la polimerización de los dos aminoácidos mediante un enlace peptídico. Posteriormente, se produce la translocación del tRNA del sitio P al sitio E y el tRNA del sitio A al sitio P, junto con el mRNA. De esta manera, el sitio A queda nuevamente libre para que el siguiente codón reconozca a su correspondiente tRNA. La elongación de la cadena peptídica se detiene cuando se alcanza un codón de terminación y se produce la liberación de la misma (Colón Ramos & Vila Sanjurjo, 2009).

3.2. RESISTENCIA A LA KASUGAMICINA

Los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas se unen a sitios específicos en el ribosoma y evitan el crecimiento celular mediante la interferencia en uno o más pasos de la traducción. Una forma de identificar sitios funcionales importantes en el ribosoma es el aislamiento de mutaciones en los componentes ribosomales que confieren resistencia a antibióticos. La Ksg es un aminoglucósido (**Fig. 1**) producido por la bacteria *Streptomyces kasugaensis* que inhibe el inicio de la traducción bloqueando la unión del tRNA a la subunidad 30S. Esto es debido a que la Ksg ocupa el canal del mRNA entre el sitio P y el sitio de salida del tRNA (sitio E) del ribosoma (concretamente entre los residuos A794 y G926 del rRNA 16S, nucleótidos universalmente conservados cuya mutación confiere altos niveles de resistencia a la Ksg) (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999; Schuwirth *et al.*, 2006). La Ksg actúa como un inhibidor selectivo

de un subconjunto de mRNAs interfiriendo con el camino del mRNA inmediatamente aguas arriba del codón de inicio (Schuwirth *et al.*, 2006).

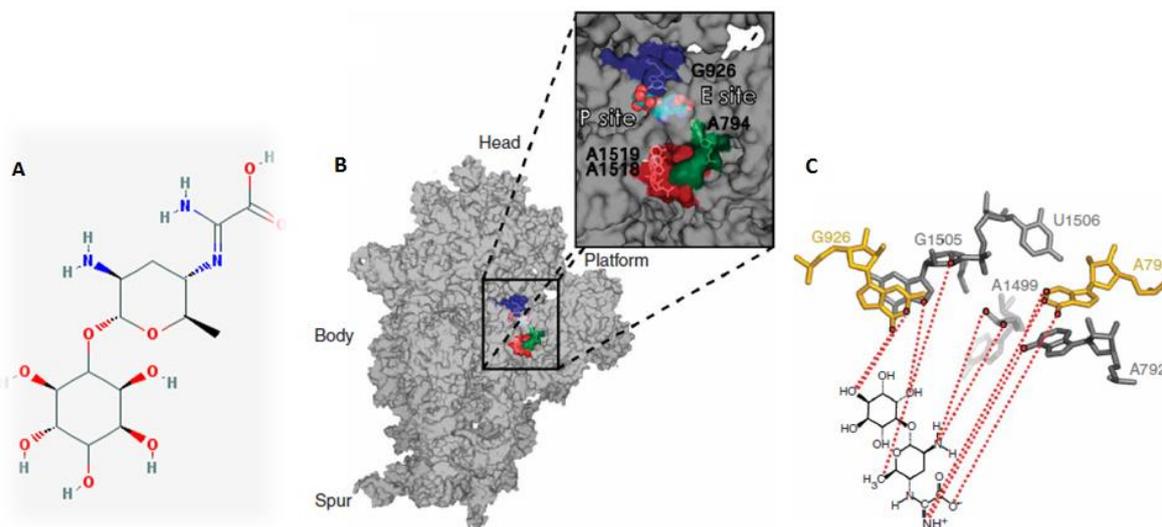


Fig. 1. (A) Estructura del aminoglucósido kasugamicina. Tomada de *National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database*. (B) Sitio de unión de la Ksg (azul) en la subunidad 30S (gris). (C) Lugares de contacto entre la Ksg y diferentes residuos. Según Schuwirth *et al.*, 2006.

Los sitios de resistencia a la Ksg A794, G926 y A1519 están universalmente conservados en el gen del RNA 16S (**Fig. 2**) y casi todas las mutaciones en estos tres sitios confieren resistencia a la Ksg con efectos de moderados a muy leves en el crecimiento celular (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999). Además de estos tres sitios en el RNA 16S, las mutaciones en el gen *ksgA* que codifica la metiltransferasa KsgA dan lugar a la resistencia a la Ksg (Helser *et al.*, 1971; Helser *et al.*, 1972). La metiltransferasa KsgA cataliza la dimetilación post-transcripcional de dos adenosinas adyacentes (1518A y 1519A) cerca del extremo 3' del rRNA 16S lo que da lugar a la resistencia a la Ksg (Van Bul & Van Knipendberg, 1985). La diana definitiva de la KsgA metilasa es, por tanto, la molécula del rRNA 16S. Cabe destacar que las mutaciones en las posiciones 794 y 926 confieren mayores niveles de resistencia a Ksg que las mutaciones en *ksgA* y en la posición A1519 (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999).

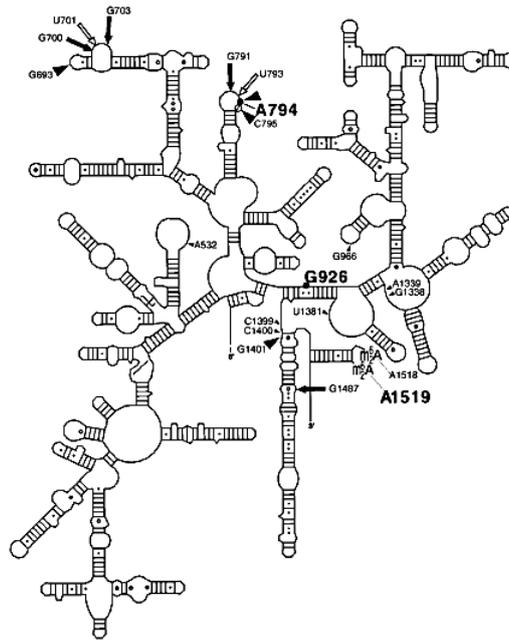


Fig. 2. Estructura secundaria del rRNA 16S de *E. coli*. Los residuos relacionados con la resistencia a la Ksg se muestran en negrita (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999).

3.3. LA PROTEÍNA PY

Durante el estrés ambiental, los organismos limitan la síntesis de proteínas almacenando los ribosomas inactivos que son rápidamente reactivados cuando las condiciones del medio mejoran. La proteína Y, PY o YfiA es una proteína de estrés ambiental de *E. coli* que inhibe la iniciación de la traducción durante el golpe de frío, pero no a temperaturas normales, debido a su unión a los ribosomas 70S (monosomas) (**Fig. 3**), bloqueando así el sitio peptidil-tRNA (sitio P) y aminoacil-tRNA (sitio A) y compitiendo con factores de iniciación de la traducción conservados que, en bacterias, son necesarios para la disociación de la subunidad ribosomal (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004). Es decir, PY podría funcionar como un inhibidor de la traducción durante el estrés mediante la disrupción del ciclo de asociación-disociación de las subunidades 30S y 50S, a través de la estabilización de los ribosomas 70S. PY se une a la subunidad 30S aislada, ocupando completamente los sitios P y E, y a los ribosomas 70S, pero no a la subunidad 50S (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004; Agafonov *et al.*, 1999). A pesar de que los datos bioquímicos y estructurales sugieren un papel importante durante la traducción para PY, de tal modo que PY ha sido propuesta como responsable de la represión de la síntesis de proteínas durante la adaptación al frío (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004), los datos obtenidos *in vivo* lo contradicen. La delección de *yfiA*, el gen que codifica la

proteína PY (Bubunenko *et al.*, 2007), demuestra que esta proteína es prescindible para la adaptación a bajas temperaturas y no es responsable del cese de síntesis de proteínas al inicio del estrés, si bien se ha demostrado que es capaz de inhibir parcialmente la traducción (Di Pietro *et al.*, 2013). Ensayos *in vitro* revelan que el grado de inhibición de PY cambia con diferentes mRNAs y que esta inhibición está relacionada con la capacidad de PY de unirse a la subunidad 30S, estimulando la formación de monómeros 70S; estos mismos ensayos evidencian que PY compete con otros ligandos ribosomales por la unión a la subunidad 30S (Di Pietro *et al.*, 2013). PY se asocia con los ribosomas también durante la fase estacionaria a 37 °C (Maki *et al.*, 2000; Agafonov *et al.*, 2001).

Por otra parte, la unión de PY reduce la modificación química de los residuos C1400 y G926 del sitio P e incrementa la reactividad del residuo A1493 del sitio A (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004). A pesar de estos datos, hasta ahora no se ha podido determinar si existe un contacto directo entre PY y G926, o si la protección de G926 podría ocurrir indirectamente (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004).

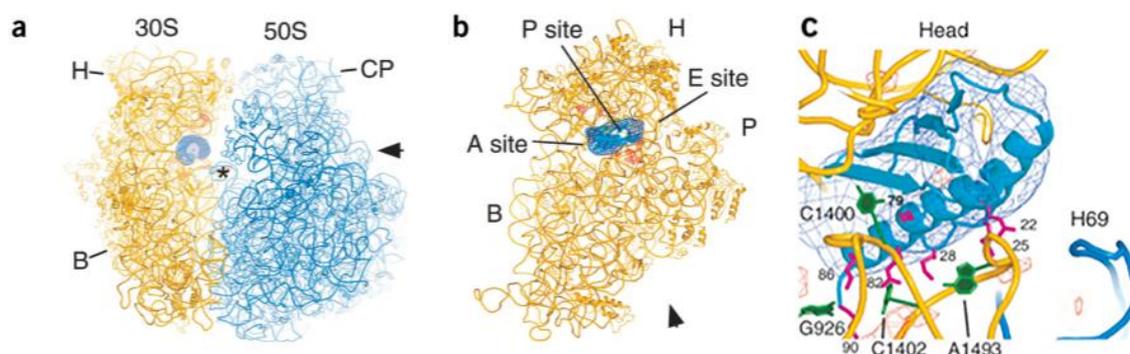


Fig. 3. Modelo estructural que muestra la localización de PY en el ribosoma. Se puede observar la subunidad grande (50S) en azul y la subunidad pequeña (30S) en amarillo. Según Vila Sanjurjo *et al.*, 2004.

3.3.1. Papel del ribosoma en el estrés celular:

El inicio de la traducción constituye el paso limitante de la síntesis proteica y es una diana central de la regulación de la expresión génica. La modulación del inicio de la traducción en bacterias se atribuye, entre otras, a la secuencia de Shine-Dalgarno. (Schuwirth *et al.*, 2006).

Las bacterias inactivan sus ribosomas como dímeros 100S o monómeros 70S para ralentizar la síntesis proteica durante períodos de estrés; de esta manera, las células entran en

fase estacionaria, cesan el crecimiento y se vuelven resistentes al estrés. En *E. coli*, la formación de dímeros 100S está mediada por el factor de modulación ribosomal (RMF) y el factor promotor de la hibernación (HPF) o, alternativamente, la proteína PY inactiva los ribosomas como monómeros 70S. El sitio de unión de RMF se superpone con el sitio de unión de la secuencia de Shine-Dalgarno del mRNA, evitando la interacción entre el mRNA y el rRNA 16S. Los sitios de unión casi idénticos de HPF y PY (comparten un 40% de similitud de secuencia) (**Fig. 4**) se superponen con los del mRNA, tRNA y factores de iniciación, impidiendo la iniciación de la traducción. La unión de RMF y HPF, pero no de PY, al ribosoma induce un cambio conformacional del dominio 30S que promueve dímeros 100S (Polikanov *et al.*, 2012).

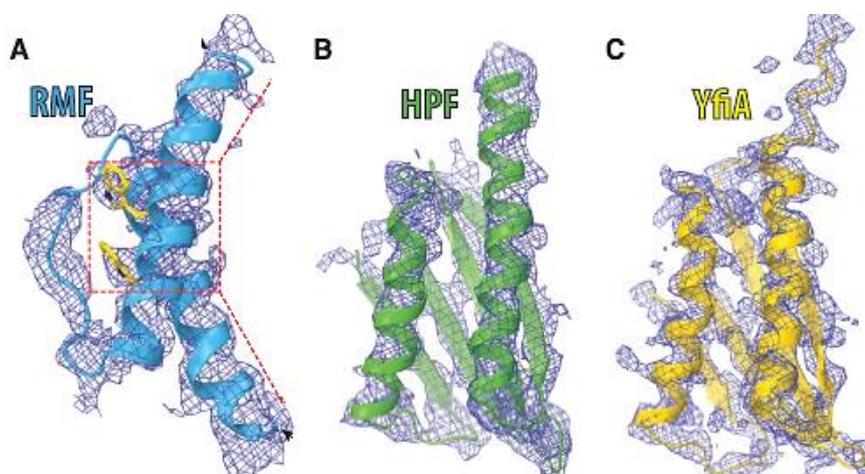


Fig. 4. Estructura de las proteínas (A) RMF, (B) HPF y (C) YfiA/PY. Adaptado de Polikanov *et al.*, 2012.

3.4. RIBOSOME PROFILING

Recientemente, se han comenzado a utilizar técnicas de análisis global del genoma para el estudio de las funciones celulares (Ingolia, 2010). El *Ribosome profiling* (RP) es una técnica muy novedosa basada en la secuenciación profunda de los fragmentos de mRNA protegidos por el ribosoma, que permite la investigación global del genoma (**Fig. 5**). Esta técnica permite monitorizar la traducción a nivel de genoma entero; concretamente, permite la determinación absoluta de la abundancia de proteínas recién sintetizadas (Ingolia *et al.*, 2009). El RP informa de la posición exacta de los ribosomas en los mRNAs en proceso de traducción. Las posiciones de los ribosomas se determinan a través de la “huella” causada por digestión con nucleasas (*footprinting*) y tras la cuantificación de dichas huellas por secuenciación profunda o secuenciación de nueva generación (Ingolia, 2010; Illumina, 2010-2012). Durante la digestión con

nucleasas, el ribosoma protege fragmentos (“huellas”) de ≈ 30 nt que indican la posición exacta de los ribosomas durante la traducción (Ingolia, 2010). Posteriormente, las “huellas” se convierten en una biblioteca de cDNAs adecuada para la secuenciación profunda. El RP requiere de 4 etapas:

1. Generación de cultivos celulares en condiciones de expresión génica adecuadas.
2. Tratamiento de los polisomas con nucleasa para eliminar las regiones del mRNA no protegidas por los ribosomas.
3. Conversión de los fragmentos de RNA en cDNAs.
4. Análisis de los fragmentos mediante secuenciación profunda.

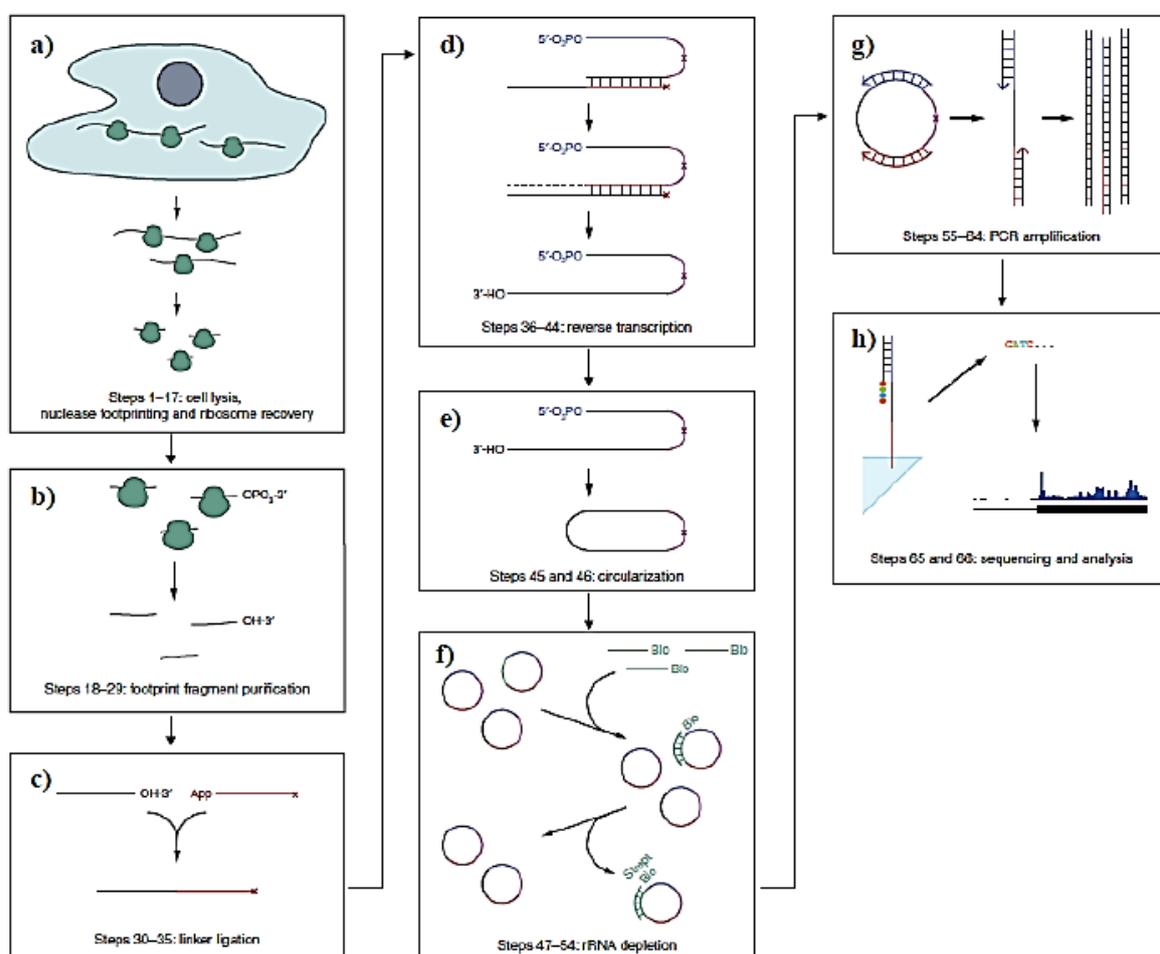


Fig. 5. Esquema del protocolo de *Ribosome profiling*. a) Lisis celular, b) purificación de los fragmentos de RNA, c) unión del *linker* al RNA, d) transcripción reversa, e) circularización, f) eliminación del rRNA, g) PCR, h) secuenciación y análisis de secuencias. Según Ingolia *et al.*, 2012).

En este trabajo nos centraremos en la primera etapa. En concreto, nos enfocamos en la preparación de cultivos adecuados para RP que reproduzcan las condiciones de estrés determinadas experimentalmente para los mutantes resistentes a la Ksg. Esto se debe a la

necesidad de un método de cultivo adecuado que permita trabajar con volúmenes grandes, para así aumentar la cantidad de células en un cultivo y ser capaces de mantener dicha cantidad.

La aplicación más extendida del RP podría ser la medida de la expresión génica a nivel de la síntesis real de proteínas. La densidad de las “huellas” ribosómicas puede ser utilizada en lugar de la medida de la abundancia de mRNA para cuantificar la expresión génica. Por último, el RP ofrece un enfoque al estudio de los procesos de traducción *in vivo*. El número de huellas de ribosoma en un gen indican cuantos ribosomas lo están traduciendo normalmente y el número de huellas centradas en un codón deberían reflejar con qué frecuencia un ribosoma se encuentra en ese punto en concreto (Ingolia *et al.*, 2012).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Las células elegidas para el estudio de *Ribosome Profiling* (Mato Boado, 2013) y los ensayos de crecimiento en placa presentan un fenotipo similar.

4.1. RIBOSOME PROFILING

Para el desarrollo del experimento de *Ribosome Profiling* se siguió el protocolo descrito en Oh *et al.* (2011), Ingolia *et al.* (2012) y Sánchez Pedreira (2015) con las correspondientes modificaciones necesarias para adaptarlo a nuestro experimento, las cuales se detallan en la sección de resultados.

Las centrifugaciones de los cultivos se hicieron del siguiente modo: los cultivos se reparten en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan durante 7 min a 4 °C y 4600 rpm en una centrífuga Eppendorf 5430R con rotor FA-35-6-30. Se desecha el sobrenadante y el *pellet* es resuspendido en 20mL de LB líquido, que se pasa a un tubo Falcon. Éste se centrifuga de nuevo durante 5 min a 4 °C, 8800 rpm y se deshecha de nuevo el sobrenadante. Finalmente el tubo Falcon con el *pellet* se introduce en nitrógeno líquido para su rápida congelación y seguida conservación a -80 °C. Los posteriores pasos del protocolo de *Ribosome profiling* que se realizaron (lisis, cuantificación del RNA, digestión, ultracentrifugación, extracción del RNA, precipitación, obtención de los fragmentos de interés, extracción del RNA del gel, resuspensión del RNA y fosforilación) se llevaron a cabo según los procedimientos detallados en Oh *et al.* (2011), Ingolia *et al.* (2012) y Sánchez Pedreira (2015).

4.2. ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN PLACA

4.2.1. Preparación de medios de cultivo y cultivos celulares

E. coli contiene 7 copias de los genes del rRNA y, para poder expresar algunos fenotipos de resistencia, es necesario que, al menos, la mitad de los ribosomas de la célula sean mutantes (Sigmund *et al.*, 1988). Durante la construcción de la cepa $\Delta 7$ se introdujeron varios marcadores con resistencias al cloranfenicol para interrumpir los operones *rrn* (Asai *et al.*). Se introdujo también un plásmido con los tRNAs asociados a los operones *rrn* perdidos. La cepa AVS69009 lleva el plásmido p70 que confiere resistencia a la tetraciclina (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999). Por último, la cepa TA527 pkk-1192U-926U porta un gen de resistencia a la kanamicina sustituyendo

el gen *yfiA*, obtenido a través de transducción fago P1 (Carballido López, 2014). Es decir, las cepas resistentes a kanamicina carecen de la proteína PY.

Los experimentos se realizaron con 2 réplicas (2 cepas diferentes de transducciones independientes) producto de diferentes fagos (Carballido López, 2014).

Para estos experimentos, se prepararon 3 tipos de placas (**Tabla 1**):

- a) Placas tipo A: LB agar (*LB Broth with agar 35 g/L, Lennox, Sigma-Aldrich*) con los antibióticos Cam (50 mg/mL en 100% etanol) y ampicilina (Amp) (200 mg/mL en H₂O) en una concentración de 1:1000.
- b) Placas tipo B: LB agar (*LB Broth with agar 35 g/L, Lennox, Sigma-Aldrich*) con los antibióticos Cam (50 mg/mL en 100% etanol), Amp (200 mg/mL en H₂O) y Ksg (200 mg/mL en H₂O) en una concentración de 1:1000 ($[Ksg]_{final} = 200 \mu\text{g/mL}$).
- c) Placas tipo C: LB agar (*LB Broth with agar 35 g/L, Lennox, Sigma-Aldrich*) con los antibióticos Cam (50 mg/mL en 100% etanol) y Amp (200 mg/mL en H₂O) en una concentración de 1:1000, y Ksg (200 mg/mL en H₂O) en una concentración de 1:400 ($[Ksg]_{final} = 500 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 1. Antibióticos presentes en cada tipo de placa y su proporción con respecto al medio de cultivo.

Placa	Amp (200 mg/ml)	Cam (50 mg/ml)	Ksg (200 mg/ml)
A	1:1000	1:1000	-
B	1:1000	1:1000	1:1000
C	1:1000	1:1000	1:400

Se sembraron en placas con LB agar (*LB Broth with agar 35 g/L, Lennox, Sigma-Aldrich*) diferentes cepas de *E. coli* (**Tabla 2**) conservadas a -80 °C en glicerol al 15%. Para ello, se preparan 500 mL de LB agar (*LB Broth with agar 35 g/L, Lennox, Sigma-Aldrich*) con agua destilada y se autoclavan. Una vez el medio esté atemperado, se añaden los antibióticos. Se homogeniza el medio y se vierte en placas. Las cepas utilizadas (**Tabla 2**) se siembran en placas de tipo A (**tabla 1**) en estría y se incuban a 37 °C, 24 h. Tras ese tiempo, se realizan los *overnights* (ON) en tubos de ensayo con 5 mL de LB líquido 25 g/L (*Miller's LB Broth Base, Invitrogen™*) y los antibióticos Cam (50 mg/mL en 100% etanol) y Amp (200 mg/mL en H₂O) en una concentración de 1:1000, inoculando una colonia de las placas sembradas en cada tubo. Se realizan 5 réplicas de cada cepa usada en cada experimento. Estos 5 ON se incuban 24 h a 37 °C en agitación, con lo cual las

células se hallarán en fase estacionaria en el momento de comenzar los ensayos. En algunos casos se prolongó la duración de la fase estacionaria, manteniendo los ON a 37 °C con agitación.

Tabla 2. Cepas de estudio en los ensayos de crecimiento en placa. Ksg: kasugamicina; Kan: kanamicina; Ttc: tetraciclina; Amp: ampicilina; Cam: cloranfenicol. Se puede observar que las muestras que no se encuentran mutadas en la posición 926 (WT) son las únicas que son sensibles a la Ksg.

Muestra	Cepa	Plásmido	Gen	Réplica	Resistencia				
					Ksg	Kan	Ttc	Amp	Cam
A1	TA527	pKK-1192U-926A	Yfia	-	+	-	+	+	+
A2	TA527	pKK-1192U-926C	Yfia	-	+	-	+	+	+
A3	TA527	pKK-1192U-926U	Yfia	-	+	-	+	+	+
A4	TA527	pKK-1192U	Yfia	-	-	-	+	+	+
A5	TA527	pKK-1192U-926A	Δ Yfia	1	+	+	+	+	+
A6	TA527	pKK-1192U-926A	Δ Yfia	2	+	+	+	+	+
A7	TA527	pKK-1192U-926C	Δ Yfia	1	+	+	+	+	+
A8	TA527	pKK-1192U-926C	Δ Yfia	2	+	+	+	+	+
A9	TA527	pKK-1192U-926U	Δ Yfia	1	+	+	+	+	+
A10	TA527	pKK-1192U-926U	Δ Yfia	2	+	+	+	+	+
B1	TA527	pKK-1192U	Δ Yfia	1	-	+	+	+	+
B2	TA527	pKK-1192U	Δ Yfia	2	-	+	+	+	+

4.2.2. Siembra de los cultivos

De las 5 réplicas, se seleccionan los 3 tubos que presenten un mejor crecimiento (mediante inspección visual de la turbidez) y, a partir de ellos se realiza el experimento (3 réplicas de cada cepa). Para ello, se realizan diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en LB líquido 25 g/L (*Miller's LB Broth Base, Invitrogen™*) en placas de 96 pocillos, previamente esterilizadas en cámara de luz ultravioleta durante 24 min. En cada columna irá una cepa, de manera que las diluciones se realizan por orden en las diferentes filas. Para cada experimento se usaron diferentes placas con medio LB, y en cada placa se disponen las 3 réplicas de una cepa con el gen *yfiA* y 3 réplicas de la cepa con la mutación Δ *YfiA* (cada cepa se realiza por triplicado en cada placa para asegurar la fiabilidad de los resultados). De tal manera que en cada experimento se obtienen 4 tandas de placas: (1) pKK-1192U (WT)/pKK-1192U- Δ *YfiA* (WT- Δ *YfiA*), (2) pKK-1192U-926A/pKK-1192U-926A- Δ *YfiA*, (3) pKK-1192U-926C/pKK-1192U-926C- Δ *YfiA* y (4) pKK-1192U-926U/pKK-1192U-926U- Δ *YfiA*.

Para la dilución 0 (10^0) se pipetea 100 μ L de cada uno de los 3 tubos de las cepas *yfiA* en 3 pocillos de la primera fila de la placa de 96 pocillos esterilizada, y 100 μ L de los 3 tubos de la misma cepa con la mutación $\Delta YfiA$ en los 3 pocillos contiguos. Con una pipeta multicanal se recogen 3 μ L de los 6 pocillos y se siembran en cada una de las 6 placas de la tanda. Para la dilución 10^{-1} , se recogen 20 μ L de la dilución 0, se pasan a la segunda fila y se añaden 180 μ L de LB líquido 25 g/L (*Miller's LB Broth Base, Invitrogen*TM). Se recogen 3 μ L de esta dilución y se siembran en las placas justo debajo de la anterior. Se realizan así todas las diluciones hasta la 10^{-7} . Una vez realizadas así las 4 tandas, se incuban las placas a 37 °C y 18 °C o a 37 °C y 30 °C, según el experimento.

Tabla 3. Relación de los 17 experimentos realizados con el tipo de placa y cepas utilizados y el tiempo de incubación de los ON con los que se llevaron a cabo.

Experimento	Placas	Incubación (°C)	Cepas	Overnights
1	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
2	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
3	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
4	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
5	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
6	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
7	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	48h
8	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
9	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	48h
10	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	24h
11	A-B-C	37/18	A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9, B1	48h
12	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	24h
13	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	48h
14	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	72h
15	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	24h
16	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	48h
17	A-C	37/30	A1, A2, A3, A4, A6, A8, A10 Y B2	72h

Se llevaron a cabo 17 experimentos en total. Los 11 primeros se realizaron con placas del tipo A, B y C (**Tabla 1; Tabla 3**) y se cultivaron tanto a 37 °C como a 18 °C. Los experimentos del 12 al 17 se llevaron a cabo con placas del tipo A y C (**Tabla 1; Tabla 3**) y, en este caso, se cultivaron a 37 °C y a 30 °C. Las placas a 37 °C se incuban durante 24h. Por su parte, las placas a 30 °C se incuban durante 48h, haciendo fotos a las 24 y 48h. Por último, las placas a 18 °C se mantienen durante 6 a 12 días, realizando fotos de las mismas a partir del día 4-5, para evitar que posibles contaminaciones a lo largo de los días oculten el crecimiento de las placas. Los experimentos del 1 al 7 y del 15 al 17 se realizaron con las cepas A1, A2, A3, A4, A5, A7, A9 Y B1 (**Tabla 2; Tabla 3**);

mientras que los experimentos del 8 al 14 se llevaron a cabo con las cepas A1, A2, A3, A4, y las réplicas A6, A8, A10 Y B2 (**Tabla 2; Tabla 3**).

4.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL

Se realizó un pequeño estudio estructural de las proteínas RMF, HPF y PY, en el que se midieron las distancias más cercanas de estas proteínas con las posiciones 926, 1400, 1492 y 1493 de la subunidad pequeña del ribosoma de *E. coli*, para tratar de observar interacciones entre ellas que afecten al fenotipo. Para ello se utilizó el programa *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004), un programa para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares. Las estructuras 4V8G, 4V8H Y 4V8I (estructuras de RMF, HPF y PY, respectivamente, ligadas al ribosoma 70S) (Polikanov *et al.*, 2012) y la estructura 4V4H que contiene el ribosoma 70S de *E. coli* en complejo con Ksg (Schuwirth *et al.*, 2006) fueron descargadas de la base de datos RCSB PDB (Berman *et al.*, 2000). Para las superposiciones estructurales se utilizó el módulo *Matchmaker* de *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

5. RESULTADOS

5.1. ENSAYOS DE CHOQUE TÉRMICO EN PLACA

El objetivo de estos experimentos es el de caracterizar en profundidad un fenotipo ya conocido en este laboratorio: las células con mutaciones en la posición 926, seleccionadas originalmente por su resistencia a la Ksg (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999), pierden dicha resistencia en frío (Mato Boado, 2013; Carballido López, 2014). La **Figura 6** muestra un experimento en el que las distintas cepas se ensayan en las condiciones experimentales descritas en Material y Métodos, donde se puede observar el fenotipo de resistencia a la Ksg ya publicado por este grupo de investigación (Vila Sanjurjo *et al.*, 1999).

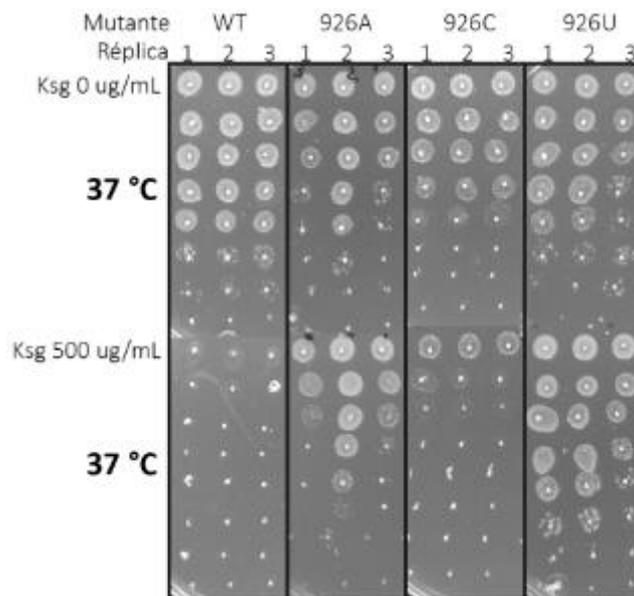


Fig. 6. Resultado de las distintas cepas incubadas a 37 °C. Los paneles superiores e inferiores muestran las células incubadas en ausencia y presencia de Ksg, respectivamente. Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo).

Las células WT son completamente sensibles a la Ksg, mientras que todas las mutaciones en la posición 926 confieren un fenotipo resistente (**Fig. 6**). Se puede observar que las células con la mutación G>U son más resistentes a la Ksg que las que llevan la mutación G>A, y éstas más resistentes que las G>C. Nótese que la poca resistencia aparente de las células con esta última

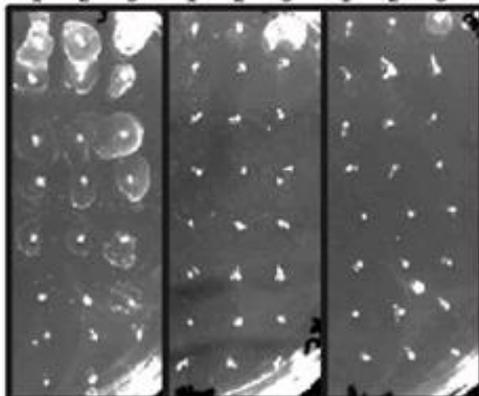
mutación se debe a un período insuficiente de crecimiento al momento de tomar la imagen (ver, por ejemplo, **Fig. 7B**). Este rango de resistencia parece derivar de las características de viabilidad general de cada una de las cepas mutantes, dado que hemos observado que se mantiene en todos los experimentos observados (Carballido López, 2014, y el presente trabajo). A continuación estudiaremos cómo el fenotipo de resistencia a la Ksg varía debido a factores como el frío y la presencia de la proteína de estrés PY.

5.1.1. Efecto del frío en el fenotipo de resistencia

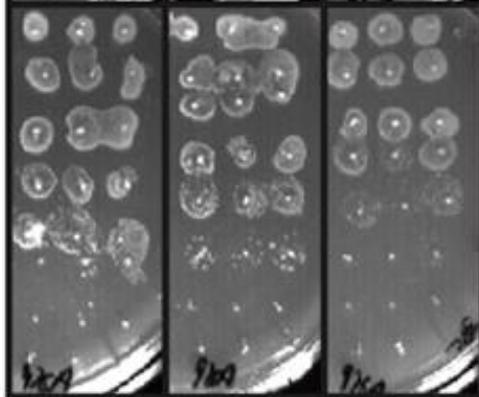
La temperatura normal de crecimiento de *E. coli* es de 37 °C. En el pasado, nuestros estudios de crecimiento tras un choque térmico habían estado limitados al uso de una temperatura de alrededor de 23 °C, con altas variaciones debido a la temperatura ambiente de la sala (Carballido López, 2014). Por ello, al disponer el laboratorio de una incubadora a 18 °C, decidimos someter a las células a un choque térmico a esta temperatura. Se puede observar como las células con las mutaciones 926A y 926C (**Fig. 7A**; **Fig. 7B**) pierden casi completamente la resistencia a la Ksg a 18 °C, especialmente en las placas con 500 µg/mL de Ksg (comparar los paneles con 0, 200 y 500 µg/mL de Ksg a 18 °C). Por otra parte, la mutación 926U (**Fig. 7C**) muestra el mismo efecto, si bien en estas células es algo menos drástico. Tal y como esperábamos, estos resultados demuestran que a 18 °C el fenotipo de pérdida de resistencia a la Ksg de los mutantes en la posición 926 es mucho más evidente que a temperaturas más altas. En el ejemplo de la **Figura 8**, realizada con células incubadas a 30 °C, se puede ver la diferencia entre los resultados a ambas temperaturas claramente (véase también: Carballido López, 2014). A 30 °C, se observa que las células con las mutaciones 926A y 926C (**Fig. 8A**; **Fig. 8B**) crecen menos con Ksg que las células incubadas a 37 °C, pero mucho más que a 18 °C (**Fig. 7A**; **Fig. 7B**). En cuanto a las células con la mutación 926U (**Fig. 8C**), éstas apenas se ven afectadas por la presencia de Ksg, si bien el crecimiento es algo menos a 30 °C que a 37 °C.

Mutant 926A
 ksg(in µg/ml) 0 0 0 200 200 200 500 500 500
 Replicate 1 2 3 1 2 3 1 2 3

18°C

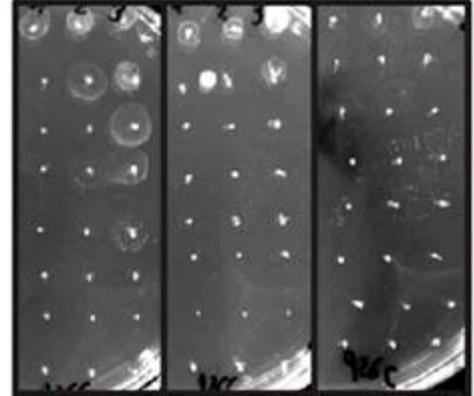


37°C

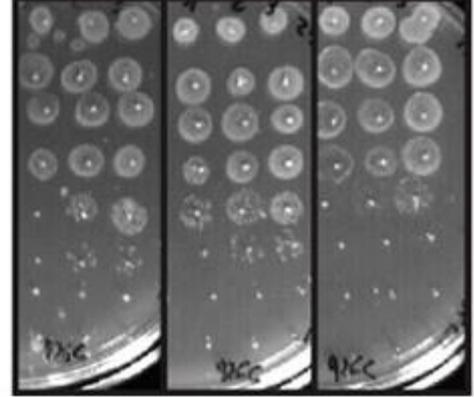


Mutant 926C
 ksg(in µg/ml) 0 0 0 200 200 200 500 500 500
 Replicate 1 2 3 1 2 3 1 2 3

18°C

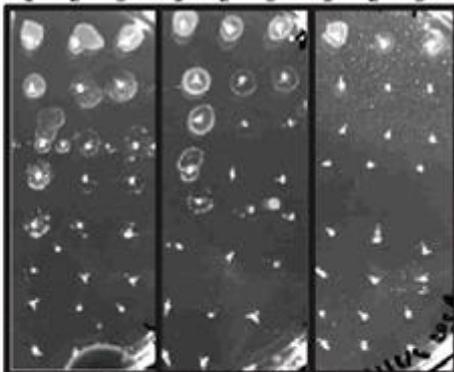


37°C



Mutant 926U
 ksg(in µg/ml) 0 0 0 200 200 200 500 500 500
 Replicate 1 2 3 1 2 3 1 2 3

18°C



37°C

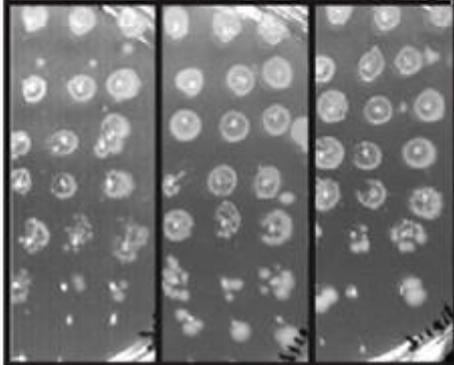


Fig. 7. Comparación del crecimiento de los mutantes 926A (A), 926C (B) y 926U (C) a 18 °C (paneles superiores) y 37 °C (paneles inferiores). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 18 °C se incubaron 7 (A y B) y 11 días (C) y las placas a 37 °C, durante 1 día.

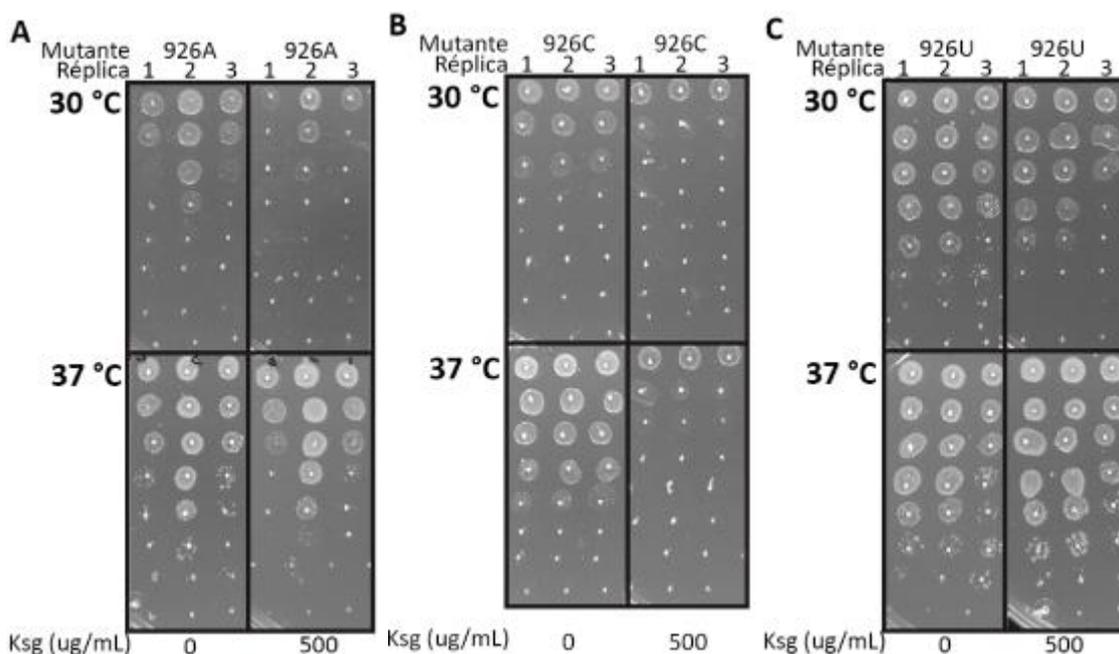


Fig. 8. Comparación del crecimiento de los mutantes 926A (A), 926C (B) y 926U (C) a 30 °C (paneles superiores) y 37 °C (paneles inferiores). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 30 °C se incubaron durante 2 días y las placas a 37 °C, durante 1 día.

5.1.2. Efecto de la delección del gen *yfiA* en el fenotipo de resistencia

Estudios estructurales y bioquímicos previos realizados por Vila Sanjurjo *et al.* (2004) habían señalado la corta distancia que separa la posición 926 de la proteína de estrés PY. La reciente estructura a alta resolución del ribosoma bacteriano en complejo con PY permite evaluar con más precisión esta distancia (Polikanov *et al.*, 2012). Dada la existencia de estructuras adicionales a alta resolución de complejos del ribosoma bacteriano con las proteínas de estrés RMF y HPF, cuya función parece estar relacionada a la de PY, hemos medido también las distancias entre estas proteínas y PY (Polikanov *et al.*, 2012). Las distancias obtenidas entre los residuos más cercanos de las proteínas RMF, HPF y PY y las posiciones nucleotídicas utilizadas en

las mediciones de Vila Sanjurjo *et al.* (2004), es decir 926, 1400, 1492 y 1493 del rRNA 16S, se muestran en la **Tabla 4**. Mientras que RMF se encuentra muy lejos de todas las posiciones, las proteínas HPF y PY, cuyo modo de unión al ribosoma es muy similar (Polikanov *et al.*, 2012), se hallan situadas mucho más cerca de dichas posiciones, siendo PY (**Fig. 9**) la más cercana a todas.

Tabla 4. Distancias más cercanas (en Ångströms) de las proteínas RMF, HPF y PY con respecto a las posiciones nucleotídicas 926, 1400, 1492 y 1493 de la subunidad pequeña del ribosoma de *E. coli*.

Posición nucleotídica	RMF (Å)	HPF (Å)	PY (Å)
926	17,732	4,294	3,523
1400	26,888	3,628	2,778
1492	38,889	4,91	3,949
1493	38,81	6,432	3,961

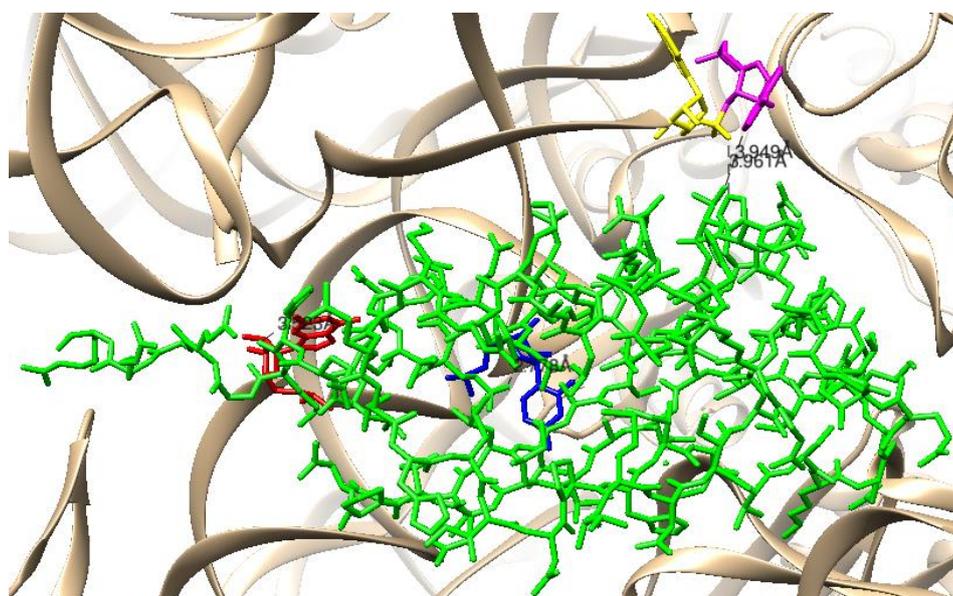


Fig. 9. Imagen de la proteína PY (en verde) en el ribosoma. Se pueden observar las posiciones nucleotídicas 926 (rojo), 1400 (azul), 1492 (morado) y 1493 (amarillo).

Dada la cercanía de PY a la posición 926, decidimos observar el efecto de la carencia de dicha proteína en el fenotipo de los mutantes. Estas pruebas habían sido intentadas por nuestro grupo en el pasado utilizando una temperatura de 23 °C (Carballido López, 2014). Dado que los resultados no fueron concluyentes, decidimos realizar las pruebas de nuevo, pero esta vez a 30 °C, temperatura que nos parecía más controlable. Nótese que las largas incubaciones a 18 °C, junto con las altas tasas de contaminación a esta temperatura, así como la gran cantidad de placas

necesarias para estos experimentos, nos aconsejaron probar temperaturas más altas. Los resultados fueron altamente satisfactorios. En primer lugar se observó que la ausencia de la proteína PY no afecta al crecimiento de las células WT, tal y como se ha publicado; por otra parte, son completamente sensibles a la Ksg, independientemente de la presencia de la proteína PY (**Fig. 10**) (Bubunenko *et al.*, 2007).

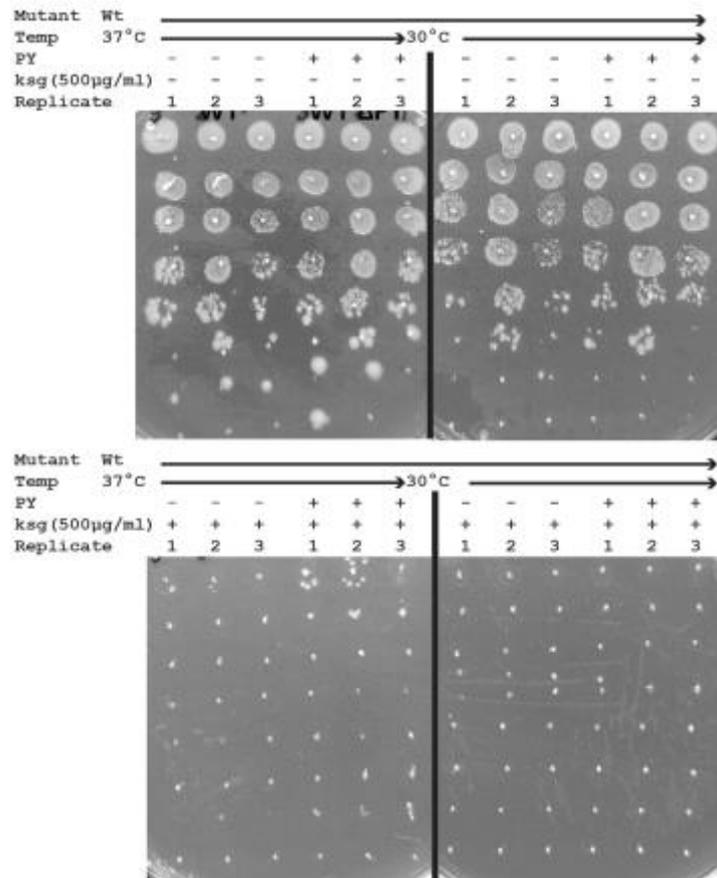


Fig. 10. Comparación del crecimiento del WT con y sin la proteína PY a 37 °C y 30 °C, en presencia de Ksg (500 µg/mL). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 30 °C se incubaron durante 2 días y las placas a 37 °C, durante 1 día.

Los experimentos muestran también que los mutantes en la posición 926 carentes de la proteína PY presentan problemas de viabilidad a bajas temperaturas y a las dos

temperaturas en presencia de Ksg (**Fig. 11; Fig. 12 Fig. 13**). El efecto es reproducible y sigue la tendencia observada anteriormente para los tres mutantes 926U < 926A < 926C. Esta es la primera vez que se observa un efecto relacionado con la proteína PY *in vivo*.

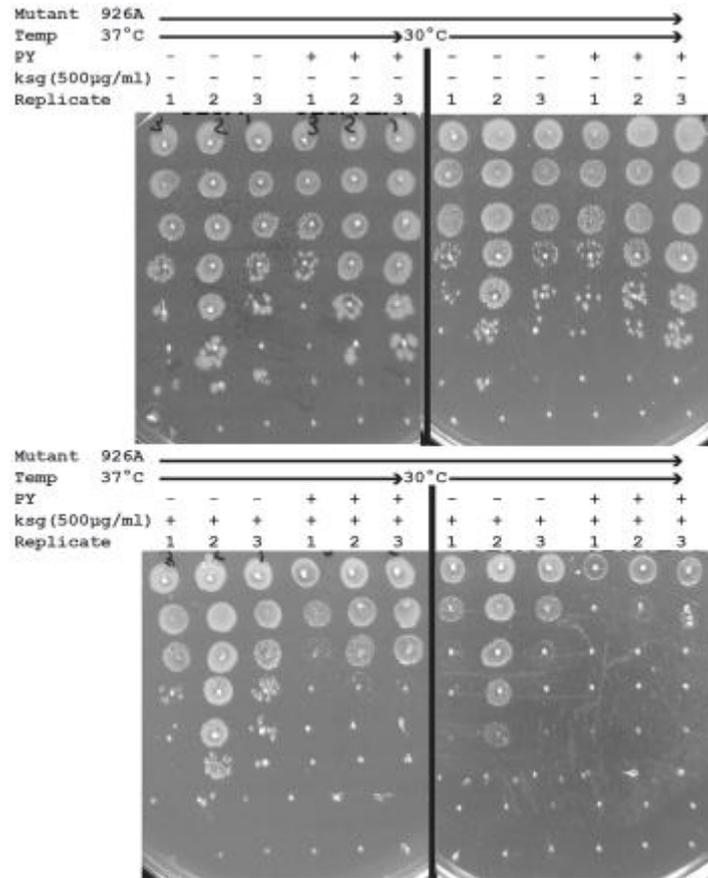


Fig. 11. Comparación del crecimiento del mutante 926A con y sin la proteína PY a 37 °C y 30 °C, en presencia de Ksg (500 µg/mL). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 30 °C se incubaron durante 2 días y las placas a 37 °C, durante 1 día.

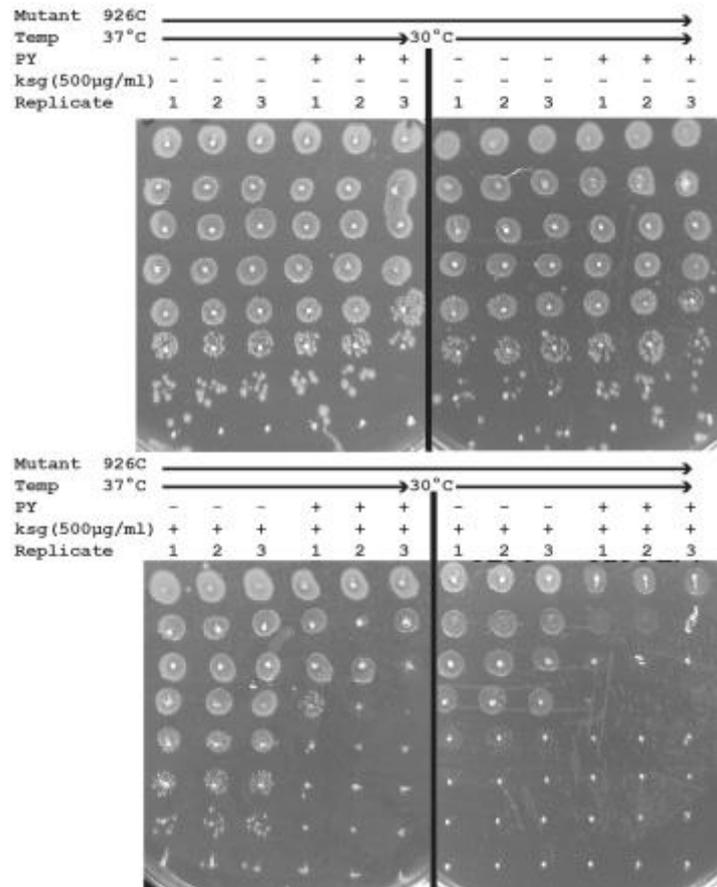


Fig. 12. Comparación del crecimiento del mutante 926C con y sin la proteína PY a 37 °C y 30 °C, en presencia de Ksg (500 µg/mL). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 30 °C se incubaron durante 2 días y las placas a 37 °C, durante 1 día.

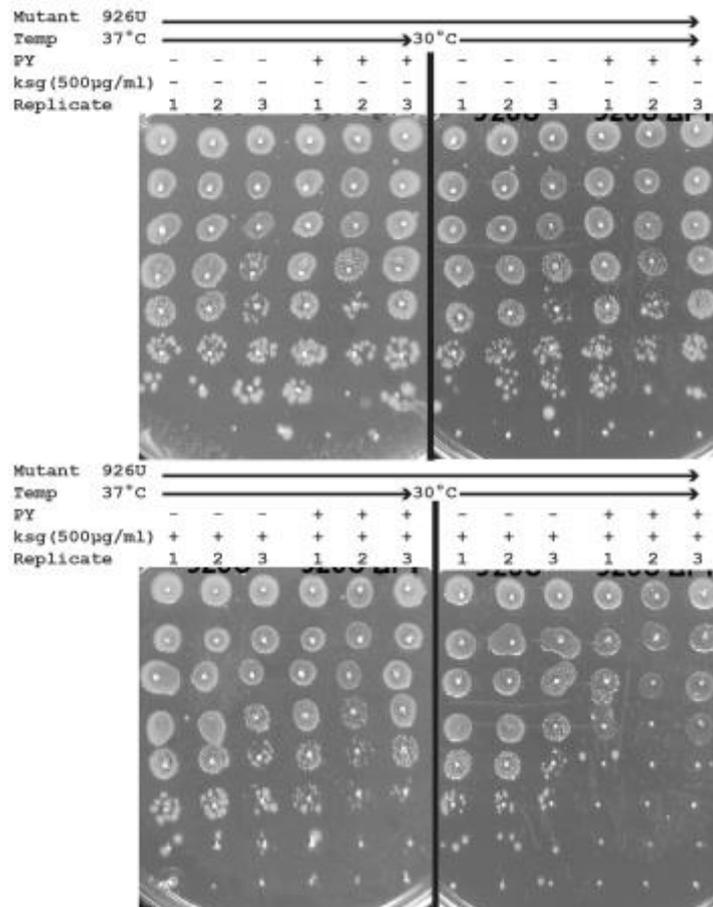


Fig. 13. Comparación del crecimiento del mutante 926U con y sin la proteína PY a 37 °C y 30 °C, en presencia de Ksg (500 µg/mL). Los mutantes y los números de las distintas réplicas biológicas se muestran encima de los paneles. La temperatura y la adición de Ksg se indican a la izquierda de los paneles. Aparte, las placas contenían los antibióticos Amp y Cam. Las diferentes diluciones se ordenan de menor (arriba) a mayor (abajo). Las placas a 30 °C se incubaron durante 2 días y las placas a 37 °C, durante 1 día.

5.2. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE CULTIVOS SOMETIDOS A CHOQUE TÉRMICO PARA ANÁLISIS POR MEDIO DE *RIBOSOME PROFILING*

La aplicación de técnicas capaces de medir la respuesta génica global de la célula, como RP, al estudio del fenotipo de nuestros mutantes es una aspiración de nuestro laboratorio. En particular, aspiramos a poder medir los cambios de expresión génica que ocurren en los minutos inmediatos al choque térmico. Sin embargo, la aplicación de RP a nuestro sistema experimental requiere la solución de ciertos problemas logísticos. Por ejemplo, el aislamiento de cantidades

suficientes de células implica el uso de cultivos líquidos en vez de placas. Para poder recrear el proceso de choque térmico que da lugar al fenotipo y trabajar con cantidades de células similares a las descritas en los protocolos de RP bacteriano (Oh *et al.*, 2011), se hacía necesario aumentar los volúmenes de nuestros cultivos muy por encima de los establecido en dichos protocolos. El objetivo de estos experimentos es evaluar si estas modificaciones son factibles a la hora de obtener material con calidad suficiente para RP. La **Figura 14** muestra esquemáticamente el flujo de los cultivos durante cada uno de los experimentos. Para poder manejar los volúmenes de cultivo necesarios, así como el número de matraces, son necesarias dos personas.

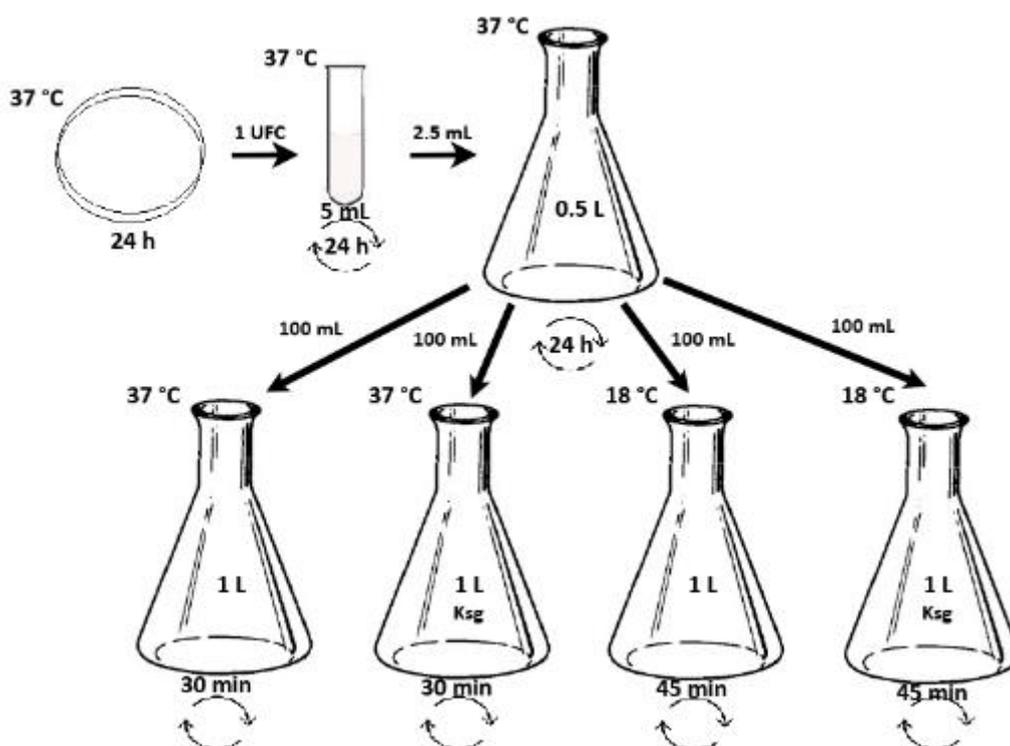


Fig. 14. Flujo de cultivos para cada uno de los experimentos de *Ribosome profiling*.

Los cultivos se realizaron a partir de colonias aisladas de las cepas JM101 (WT) y JM101 KsgA19 de *E. coli* (**Tabla 5**). Debido a que se trata de un procedimiento altamente laborioso y extenso, cada experimento se realizó con una de las cepas cada vez, realizando, finalmente, un total de 6 experimentos: 3 con JM101 y 3 con JM101KsgA19 (**Tabla 5**). Para ello, se sembraron en estría en placas de LB con agar (*Luria Broth Base* agar 35 g/L, *Miller's LB Broth Base*, *Invitrogen*TM) colonias de estas cepas (**Fig. 14**). Tras 24h de incubación a 37 °C, en condiciones de esterilidad, se sembró una unidad formadora de colonias (UFC) de la cepa utilizada en cada experimento en dos tubos de ensayo con 5 mL de LB líquido 25 g/L (*Miller's LB Broth Base*, *Invitrogen*TM) (*overnights*),

realizándolo así por duplicado. Los dos tubos se mantuvieron a 37 °C con agitación durante 24h (Fig. 14).

Tabla 5. Relación de las muestras obtenidas en *Ribosome profiling*. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

Muestra	Experimento	Cepa	Tª (°C)	Ksg
1	1	JM101KsgA19	18	no
2	1	JM101KsgA19	37	no
3	1	JM101KsgA19	18	sí
4	1	JM101KsgA19	37	sí
5	2	JM101KsgA19	18	sí
6	2	JM101KsgA19	37	no
7	2	JM101KsgA19	37	sí
8	2	JM101KsgA19	18	no
9	3	JM101	37	sí
10	3	JM101	37	no
11	3	JM101	18	no
12	3	JM101	18	sí
13	4	JM101	18	no
14	4	JM101	37	sí
15	4	JM101	37	no
16	4	JM101	18	sí
17	5	JM101	18	sí
18	5	JM101	37	no
19	5	JM101	18	no
20	5	JM101	37	sí
21	6	JM101KsgA19	18	sí
22	6	JM101KsgA19	18	no
23	6	JM101KsgA19	37	sí
24	6	JM101KsgA19	37	no

Pasadas las 24h tras la siembra de los *overnights*, se selecciona de ellos el que presente un mayor crecimiento para seguir con el experimento. En este momento, las células han pasado varias horas en fase estacionaria.

El experimento se inicia al reanudar el crecimiento exponencial de las células. Se diluyen 2.5 mL del *overnight* seleccionado en un matraz con 0.5L de LB fresco, previamente atemperado a 37 °C para evitar el choque térmico. Tras su incubación a 37 °C en agitación durante 24h, para que las células se hallen de nuevo en fase estacionaria, 100 mL de cultivo se transfieren a cuatro matraces con 1 L de medio fresco, atemperados a las dos temperaturas a estudiar, 37 °C y 18 °C.

Los matraces serán incubados a estas mismas temperaturas en presencia ($[Ksg]_{\text{final}} = 200 \mu\text{g/mL}$) y ausencia de Ksg (**Fig. 14**) para observar los efectos producidos en los mutantes por el estrés de frío en combinación con el antibiótico.

Una vez inoculados, se incuban en agitación durante 30 min a 37 °C o durante 45 min a 18 °C, según corresponda, para que alcancen la fase de mayor crecimiento. Pasado este tiempo, se les añaden 2.92 mL de cloranfenicol (Cam) (34 mL de Cam/L de etanol) (*Chloramphenicol* $\geq 98\%$, *Sigma-Aldrich*) para inhibir la síntesis proteica e inmovilizar los ribosomas en el mRNA). Tras 2 min en agitación a 37 °C, el cultivo se vierte en un matraz de 3L (para facilitar el enfriamiento debido a su mayor superficie basal) en el que se introduce un termómetro para observar el descenso de temperatura. El enfriamiento se produce mediante agitación manual de la base del matraz sobre nitrógeno líquido hasta llegar a ≈ 4 °C. De esta manera, las células se mantienen con las proteínas ancladas a los ribosomas, evitando el desacoplamiento de los mismos. Por esta razón, y a partir de este paso, la temperatura se mantiene entre 0 °C y 4 °C mediante hielo durante todo el proceso. Tanto la baja temperatura como la adición de Cam nos permiten mantener las secuencias de mRNA en síntesis ancladas al ribosoma.

Una vez verificado que el método de cultivo utilizado permite el enfriamiento y el manejo de las muestras en las diferentes condiciones experimentales, decidimos comprobar la calidad de las muestras por medio de la extracción de las “huellas” ribosómicas y su análisis por electroforesis. Para ello se utilizaron tan solo 8 muestras de las 24 iniciales (**Tabla 6**).

Tabla 6. Relación de las 8 muestras procesadas a partir de la ultracentrifugación.

Nº	Muestra	Cepa	Tª (°C)	Ksg
1	1	JM101KsgA19	18	no
2	6	JM101KsgA19	37	no
3	9	JM101	37	sí
4	12	JM101	18	sí
5	15	JM101	37	no
6	19	JM101	18	no
7	21	JM101KsgA19	18	sí
8	23	JM101KsgA19	37	sí

El gel de verificación (**Fig. 15**) mostró resultados muy satisfactorios, indicando en todas las muestras procesadas la presencia del mRNA de ≈ 30 nt y poniendo de manifiesto que el método

elegido de centrifugación de los cultivos permite el procesamiento de grandes cantidades de células.

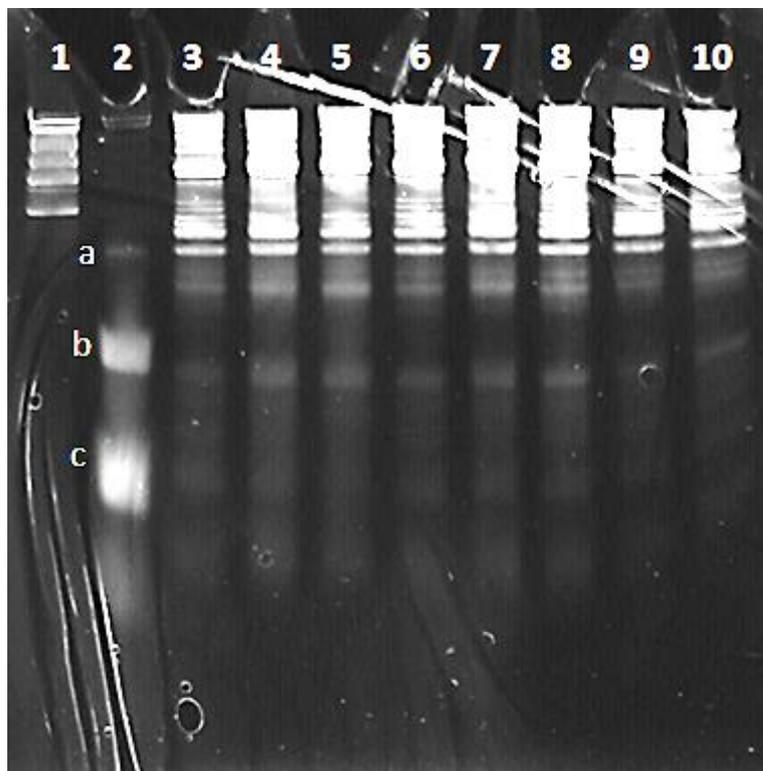


Fig. 15. Imagen de la electroforesis en gel de acrilamida y urea de verificación con las 8 muestras procesadas. (1) *Leader*, (2) marcadores de (a) 40 nt, (b) 30 nt y (c) 21 nt; (3) a (10) muestras de la 1 a la 8.

6. DISCUSIÓN

6.1. ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA DE *RIBOSOME PROFILING* PARA EL ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS MUTACIONES EN LA POSICIÓN 926 DEL rRNA 16S.

La preparación de muestras para RP es un proceso altamente complicado dado que requiere un número importante de pasos en los que se manejan y modifican moléculas de RNA. Un aspecto de gran importancia es el uso de una cantidad de material inicial que permita la recuperación de un número suficiente de “huellas” ribosómicas como para describir el translátoma bajo estudio con un grado satisfactorio de cobertura. Para asegurar este aspecto, tratamos de utilizar volúmenes de cultivo similares a los descritos por Oh *et al.* (2011). Nuestro objetivo en este trabajo era encontrar un método de cultivo que permitiera reproducir en medio líquido lo que ocurre en las placas incubadas a bajas temperaturas. Esto quiere decir que, tras la permanencia en fase estacionaria, las células han de diluirse en medio nuevo para permitir su crecimiento en condiciones de choque térmico. Dicha dilución supone que los volúmenes de cultivo que han de ser manejados al final de cada prueba superan con mucho los descritos por Oh *et al.* (2011). Dado que el uso de bajas temperaturas (entre 0 °C y 4 °C) es crítico durante el aislamiento de polisomas, se hizo también necesario poder enfriar la temperatura de los cultivos en el mínimo tiempo posible. Los tiempos de enfriamiento conseguidos oscilan entre los 4 min y 7 min, dependiendo de la temperatura del cultivo, lo que asegura que suficientes ribosomas se mantengan en el mRNA.

El gel de verificación (**Fig. 15**) mostró resultados muy satisfactorios, indicando en todas las muestras procesadas la presencia del mRNA de ≈30 nt, el tamaño esperado para las “huellas” ribosómicas, y poniendo de manifiesto que el método elegido de centrifugación de los cultivos permite el procesamiento de grandes volúmenes de cultivo.

6.2. ENSAYOS DE PY EN EL FENOTIPO DE LOS MUTANTES EN LA POSICIÓN 926 DEL rRNA 16S.

En el presente trabajo confirmamos que las células con mutaciones en la posición 926 pierden la resistencia a la Ksg a bajas temperaturas, pudiendo observarse tanto a 18 °C como a 30 °C. La razón de esta pérdida de resistencia al antibiótico es desconocida. Los experimentos aquí

descritos se diseñaron con el fin de proveer nuevos datos que nos permitan entender los fenómenos moleculares responsables de este fenotipo. En este sentido, la revelación de que la ausencia de PY aumenta la sensibilidad de los mutantes a la Ksg proporciona importantes pistas para entender dicho fenotipo. En primer lugar, estos resultados constituyen la primera prueba del papel de PY *in vivo*. Estos resultados nos ofrecen una prueba directa de las posibles ventajas evolutivas del mantenimiento del gen que codifica esta proteína en el genoma bacteriano, en vista de estudios demostrando la falta de efecto de la ausencia de PY en el crecimiento normal de *E. coli* (Bubunenko *et al.*, 2007; Di Pietro *et al.*, 2013).

En segundo lugar, nuestros datos muestran que PY se une a los ribosomas con mutaciones en la posición 926. La idea de que dicha unión pudiese no producirse fue motivada por la observación bioquímica de la interacción entre la proteína y el residuo 926 y el respaldo estructural a dicha observación (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004). La existencia de estructuras de alta resolución de complejos de PY-ribosoma (Polikanov *et al.*, 2012) nos ha permitido medir la corta distancia existente entre la proteína y la posición 926 en el complejo (**Tabla 4**). Los efectos de la carencia de PY sobre la resistencia de los mutantes a la Ksg ponen de manifiesto que los ribosomas son capaces de unirse a la proteína aún en presencia de mutaciones en 926 (**Fig. 11**; **Fig. 12**; **Fig 13**).

La **Figura 16** muestra que los lugares de unión de PY y la Ksg son solapantes, lo cual implica que no se pueden unir a la vez al ribosoma. Nuestros datos demuestran que, en ausencia de PY, las células mutantes se vuelven sensibles a la Ksg, indicando que la unión de la proteína al ribosoma es responsable, por lo menos en parte, del fenotipo resistente. Dado el solapamiento de los lugares de unión de ambos ligandos (**Fig. 16**), la interpretación más sencilla que emana de estos datos es que, en algún momento de la traducción, Ksg ha de salir del ribosoma para que pueda entrar PY. Dado que el efecto de PY no está asociado al choque térmico (comparar los paneles a 37 °C y 30 °C en ausencia de PY (**Fig. 11**; **Fig. 12**; **Fig. 13**)) deberíamos suponer que la producción de PY durante la fase estacionaria, y su unión al ribosoma durante esta fase podría producir un choque estérico entre ambos ligandos que daría lugar a la expulsión de la Ksg de su lugar de unión. Se ha demostrado *in vitro* que PY puede inhibir la creación de complejos de iniciación en ciertos mRNAs, y que su presencia favorece la reanudación de la traducción, al menos tras la fase de adaptación al choque térmico (Vila Sanjurjo *et al.*, 2004; Di Pietro *et al.*, 2013). Aquí demostramos que la acción de PY es esencial para el desbloqueo de una etapa de la traducción bajo estrés susceptible a la inhibición por la Ksg, incluso en los mutantes resistentes a

este antibiótico, que portan mutaciones en la posición 926. Previos estudios de nuestro grupo han mostrado que los ribosomas con mutaciones en 926 son capaces de unirse a la Ksg (Schuwirth *et al.*, 2006). Por lo tanto, los resultados aquí descritos demuestran que la resistencia a la Ksg en estos mutantes no es total y depende, al menos durante la reanudación de la traducción bajo estrés, de la presencia de la proteína PY. Se han descrito otros casos de sensibilidad a antibióticos en fase estacionaria. McKay & Portnov (2015) han observado que el factor HPF, estructuralmente similar a PY, facilita la tolerancia a los antibióticos aminoglucósidos durante la fase estacionaria. Dado que los sitios de unión de HPF y dichos antibióticos no se solapan, la repulsión estérica directa no se contemplaría en este caso. De hecho, los autores descartan claramente este escenario (McKay & Portnov, 2015).

De esta manera, si PY no puede estar junto a la Ksg, la unión de la proteína implicaría de algún modo la salida de la Ksg del ribosoma. Por el contrario, si no hay PY (como ocurre en los mutantes), la Ksg estaría unida al ribosoma afectando a las células, que se volverían sensibles al antibiótico (**Fig. 7; Fig. 8**).

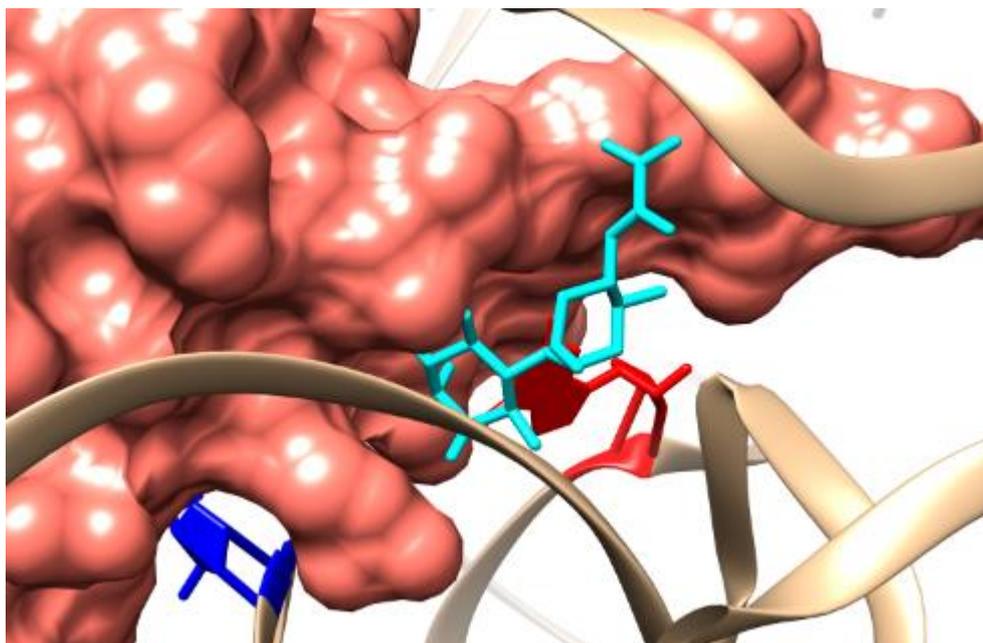


Fig. 16. Representación de la proteína PY (en rosa) junto con la estructura de la Ksg (turquesa) obtenida mediante la superposición de las estructuras 4V8I (Polikanov *et al.*, 2012) y 4V4H (Schuwirth *et al.*, 2006) en el programa *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004). Se pueden observar las posiciones 926 (rojo) y 1400 (azul).

7. CONCLUSIONES

El método de la centrifugación de grandes volúmenes de cultivo ha demostrado ser efectivo para llevar a cabo el protocolo de *Ribosome Profiling*.

PY se une a los ribosomas con mutaciones en la posición 926 y la ausencia de PY aumenta la sensibilidad de los mutantes a la Ksg. Por tanto, la unión de la proteína al ribosoma es la responsable de la resistencia a este antibiótico y es posible que PY se encargue de sacar transitoriamente a la Ksg del ribosoma.

El efecto de la mutación $\Delta YfiA$ no es dependiente de la temperatura, pero sí de la presencia de Ksg. No obstante, esta mutación exagera el fenotipo, haciendo que las células muestren poco crecimiento.

De las proteínas RMF, HPF y PY estudiadas, PY es la que se encuentra más cerca de las posiciones nucleotídicas 926 (sitio P), 1400 (sitio P), 1492 y 1493 (sitio A) del rRNA 16S de *E. coli* (**Tabla 4**), posiciones con las que podría interactuar PY durante su unión a los monosomas. Las distancias de PY con estas posiciones oscilan entre los 2 Å y 4 Å. Considerando que para la formación de un enlace de hidrógeno la distancia debe ser de unos 2-3 Å, parece un buen indicativo de la interacción de PY con los sitios peptidil-tRNA (sitio P) y aminoacil-tRNA (sitio A).

8. REFERENCIAS

- Agafonov, D. E., Kolb, V. A., Nazimov, I. V. & Spirin, A. S. (1999). A protein residing at the subunit interface of bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12345-12349.
- Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A. S. (2001). Ribosome associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Rep.* 2: 399-402.
- Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C. & Squires, C. L. (1999). An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci.* 96: 1971-1976.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 905-920.
- Benito, C. & Espino, F. J. (2012). *Genética. Conceptos esenciales*. Madrid: Médica Panamericana. 266-271.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). PDB. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242. Último acceso: 15 de enero de 2016. <http://www.rcsb.org>.
- Bubunencko, M., Baker, T. & Court, D. L. (2007). Essentiality of ribosomal and transcription antitermination proteins analyzed by systematic gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189: 2844-2853.
- Carballido López, A. Y. (2014). *Estudio de la resistencia a kasugamicina en cepas de Escherichia coli con mutaciones en el ARNr 16S y su relación con el fenómeno de resistencia cruzada*. Trabajo de Fin de Máster, Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade de A Coruña.
- Colón Ramos, D. A. & Vila Sanjurjo, A. (2009). El ribosoma y la traducción genética. *Investigación y Ciencia.* 399: 48-57.
- Di Pietro, F., Brandi, A., Dzeladini, N., Fabbretti, A., Carzaniga, T., Piersimoni, L., Pon, C. L. & Giuliodori, A. M. (2013). Role of the ribosome-associated protein PY in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Microbiologyopen.* 2: 293-307.

- Helser, T. L., Davies, J. E. & Dahlberg, J. E. (1971). Change in methylation of 16 S ribosomal RNA associated with mutation to kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nature New Biol.* 233: 12-14.
- Helser, T. L., Davies, J. E. & Dahlberg, J. E. (1972). Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nature New Biol.* 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 Enzymol.* 470: 119-142.
- Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, 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. & Weissman, J. S. (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science.* 324: 218-223.
- Jiménez García, L. F. & Merchant Larios, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
- Li, G. W., Oh, E. & Weissman, J. S. (2012). The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature.* 484: 538-541.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman.
- Mato Boado, J. (2013). *El papel del ribosoma en la resistencia cruzada inducida por el estrés*. Trabajo de Fin de Máster, Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade de A Coruña.
- McKay, S. L. & Portnov, D. A. (2015). Ribosome hibernation facilitates tolerance of stationary-phase bacteria to aminoglycosides. *Antimicrob Agent Chemother.* 59: 6992-6999.

- NanoDrop Technologies, Inc. (2007). *NanoDrop Technical Support Bulletin T009, 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington, Delaware USA.
- National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database; CID=88045. (n.f.).
Último acceso: 24 de mayo de 2016. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/88045>.
- Oh, E., Becker, A. H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., Gloge, F., Nichols, R. J., Typas, A., Gross, C. A., Kramer, G., Weissman, J. S. & Bukau, B. (2011). Selective Ribosome Profiling Reveals the Cotranslational Chaperone Action of Trigger Factor In Vivo. *Cell*. 147: 1296-1308.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis versión 1.10.2. *J Comput Chem*. 25: 1605-1612.
- Polikanov, Y. S., Blaha, G. M. & Steitz, T. A. (2012). How hibernation factors RMF, HPF and YfiA turn off protein synthesis. *Science*. 336: 915-918.
- Van Buul, C. P. J. J. & Van Knippenberg, P. H. (1985). Nucleotide sequence of the *ksgA* gene of *Escherichia coli*: comparison of methyltransferases effecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA. *Gene*. 38: 65-72.
- Vila Sanjurjo, A., Schuwirth, B. S., Hau, C. W. & Cate, J. H. D. (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nat Struct Mol Biol*. 11: 1054-1059.
- Vila Sanjurjo, A., Squires, C. L. & Dahlberg, A. E. (1999). Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 293: 1-6.
- Von Ahlfen, S. & Schlumpberger, M. (2010). *Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications*. QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, Issue 15/10.
- Sánchez Pedreira, P. (2015). *Puesta a punto del protocolo de Ribosome profiling para su aplicación en cepas bacterianas*. Trabajo de Fin de Máster, Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade de A Coruña.
- 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. *Nat Struct Mol Biol*. 13: 879-886.

Sigmund, C. D., Ettayebi, M., Borden, A. & Morgan, E. A. (1988). Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 164: 673-690.