



21-6-2020

Papel del ribosoma bacteriano en la respuesta al estrés. Análisis proteómico de los efectos de la mutación 926 del ARNr 16S

Role of the bacterial ribosome in the stress response. Proteomic analysis of the effects of the 926 mutation in 16S rRNA



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Contenido

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
RESUMO	3
INTRODUCCIÓN	6
CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	6
Ciclo del crecimiento microbiano.....	6
Escherichia coli como organismo modelo.....	7
PROTEÓMICA.....	9
Análisis proteómico.....	9
Aproximaciones en proteómica	10
RIBOSOMA.....	12
RIBOSOMA BACTERIANO.....	12
ESTRÉS BACTERIANO	14
MUTACIONES RESISTENTES AL ANTIBIÓTICO KASUGAMICINA.....	15
TRANS-TRADUCCIÓN	19
INCORPORACIÓN DE SELENIO A LAS PROTEÍNAS.....	21
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Procedimiento experimental.....	22
Cultivos bacterianos	23
Digestión trípica para espectrometría de masas	23
Ensayo cualitativo.....	24
Ensayos cuantitativos “label free”	25
Análisis bioinformático.....	28
Estudios estructurales	30
RESULTADOS	31
Diseño del proyecto	31
Organización de las carpetas de datos.....	32
Análisis bioinformático con <i>FunRich</i>	32
Análisis bioinformático con <i>String</i>	34
Análisis bioinformático con Panther	35
Análisis estructurales.....	36
DISCUSIÓN.....	38

CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	39
APÉNDICES.....	45
Apéndice 1: Organización de carpetas.....	45
Apéndice 2: Abreviaturas dominios proteicos de FunRich	47
Apéndice 3: Tabla de resultados de Panther	47

Firmado por PORRES PEREZ, GONZALO
(AUTENTICACIÓN) el día 21/06/2020 con un
certificado emitido por AC DNIE 002

VILA SANJURJO
ANTONIO -
32773313S

Digitally signed by VILA SANJURJO
ANTONIO - 32773313S
DN: c=ES,
serialNumber=IDCES-32773313S,
givenName=ANTONIO, sn=VILA
SANJURJO, cn=VILA SANJURJO
ANTONIO 32773313S
Date: 2020.06.22 11:10:01 +02'00'

ABREVIATURAS

2DE: Electroforesis en dos dimensiones
926: Mutante
Å: Ångstrom
A794: Mutación en la posición 794 del ARNr 16s
A1518U: Mutación en la posición 1518 del ARNr 16S
A1519: Mutación en la posición 1519 del ARNr 16s
aa: aminoácido
aa-ARNt: Aminoacil-ARN transferente
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNpol: ARN polimerasa bacteriana
ARNr: ARN ribosómico
ARNt: ARN transferente o de transferencia
ARNtm: ARN transferente-mensajero
ASL: Tallo del bucle anticodón
ATP: Adenosín trifosfato
AUG: Codón de iniciación de la traducción en bacterias
C1100: Mutación en la posición 1100 del ARNr 16S
CE: Energía de colisión
cps: ciclos por segundo
Cryo-EM: Crio-microscopía electrónica
CUR: Cortina de gas
DASL: Tallo-bucle de dimetil A
DDA: Adquisición dependiente de datos
DIA: Adquisición independiente de datos
DTT: Ditiotreitól
E.coli: Escherichia coli
EF-Tu: Factor de elongación Tu
FDR: Tasa de falso positivo
G1516: Mutación en la posición 1516 del ARNr 16S
G926: Mutación en la posición 926 del ARNr 16S
GE81112: Antibiótico
GS1: Gas fuente de iones 1
GTP: Guanosín trifosfato
HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

IC₅₀: La mitad de la concentración máxima inhibitoria

IF: Factores de iniciación

IF1: Factor de iniciación 1

IF2: Factor de iniciación 2

IF3: Factor de iniciación 3

ISVF: Voltaje flotante del ionspray

Ksg: Kasugamicina

LC: Cromatografía líquida

MA6A1518-9: Mutación MA6A1518-9

Micro-HPLC: Micro-cromatografía líquida de alto rendimiento

MS-MS o MS²: Nanoflujo de HPLC de fase reversa acoplada directamente al espectrómetro de masas

m/z: Cociente masa/ carga

PCA: Análisis del componente principal

ppGpp: Alarmona

ppm: partículas por millón

PTM: Isoformas y variantes de modificaciones postraduccionales

PY: Proteína de estrés ambiental que inhibe la iniciación de la traducción durante un golpe de frío.

ΔrelA: Cepa que carece del gen *relA*

ΔrpoZ: Cepa que carece del gen *rpoZ*

RsfA: Proteína, también conocida como YbeB

SD: Shine Dalgarno

Sec: Selenocisteína

Sec-ARNt^{Sec}: Selenocisteín ARN transferente

SECIS: Secuencia de selenocisteína

SelB: Factor de elongación

SmpB: Small protein B, proteína pequeña B.

Spyro-Ruby: Tinción fluorescente para geles

SWATH-MS: Adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masa teóricos

UAA: Codón de parada de la traducción

UAG: Codón de parada de la traducción

UGA: Codón de parada de la traducción

WT: Tipo silvestre

RESUMEN

Se cree que el ribosoma podría desempeñar un papel esencial en la adaptación al estrés ambiental como un punto de control que detecta los cambios de temperatura y de nutrientes. Es por esta razón, que en investigaciones previas de este grupo se estudió el efecto de la mutación G926 a bajas temperaturas. Estas personas extrajeron como conclusiones de sus análisis que hay varios factores que participan en la fase estacionaria, y que desempeñan la adaptación a bajas temperaturas, que funcionan de manera deficiente en estos mutantes. Además, observaron la pérdida de resistencia a la Kasugamicina cuando los mutantes crecían en frío.

Este trabajo tiene como objetivo la identificación de genes potencialmente implicados en el fenotipo cruzado de resistencia de las células con mutaciones en la posición 926 del ARNr 16S de *Escherichia coli*. Para lograr nuestra meta, realizamos diferentes análisis mediante el empleo de programas bioinformáticos (*FunRich*, *Panther* y *String*). Como resultado de estos estudios detectamos tres proteínas, codificadas por los genes *rpoZ*, *smpB* y *selB*, que creemos que podrían estar involucrados en el fenotipo cruzado de pérdida de resistencia por parte de los mutantes 926.

ABSTRACT

It is thought that the ribosome has an essential role in the adaptation to the environmental stress as a control point which detect the changes of temperature and nutrients. It is for this reason that in previous investigations of this group was studied the effect of the mutation G926 at low temperatures. These people extracted as conclusions of their analysis that there are some factors that participate in the stationary phase, and which help to the adaptation at low temperatures, which act poorly in these mutants. Also, they noticed the loss of resistance to Kasugamycin when the mutants grew in cold.

This work has the aim of identifying the potentially implicated genes in the cross-resistance phenotype of the cells with mutations in the position 926 of the *Escherichia coli*'s RNA 16S. To achieve our goal, we make different analysis with some bioinformatic programs (*FunRich*, *Panther* and *String*). As a result of these studies, we detected three proteins, coded by the genes *rpoZ*, *smpB* and *selB*, which we think are involved in the cross phenotype of loss of the resistance by the mutants 926.

RESUMO

Crese que o ribosoma xoga un papel esencial na adaptación ao estrés ambiental como un punto de control que detecta cambios na temperatura e os nutrientes. É por esta razón que se estudou o efecto da mutación do G926 a baixas temperaturas en investigacións anteriores deste grupo. Estas persoas concluíron a partir das súas análises que hai varios factores implicados na fase estacionaria e que se adaptan ás baixas temperaturas, que funcionan mal nestes mutantes. Ademais, observaron a perda de resistencia á Kasugamicina cando os mutantes medraron ao frío.

Este traballo pretende identificar xenes potencialmente implicados no fenotipo cruzado de resistencia das células con mutacións na posición 926 do ARNr de *Escherichia coli* 16S. Para acadar o noso obxectivo, realizamos diferentes análises empregando programas de

bioinformática (*FunRich*, *Panther e String*). Como resultado destes estudos detectamos tres proteínas, codificadas polos xenes *rpoZ*, *smpB* e *selB*, que cremos que poderían estar implicados no fenotipo cruzado da perda de resistencia polos 926 mutantes.

Palabras clave: Ribosoma bacteriano, *Escherichia coli*, Kasugamicina, proteómica, bioinformática.

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS GENERALES

La bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) pertenece al grupo de las enterobacterias y es Gram negativa. Debido a la importancia que presentan desde el punto de vista médico las enterobacterias, se han estudiado y caracterizado un amplio número de cepas y se han definido numerosos géneros (Brock et al., 2009).

Uno de estos géneros es *Escherichia*, en el que encontramos habitantes casi universales de humanos y otros animales de sangre caliente. *Escherichia* destaca principalmente por dos razones: por su papel en el intestino, al sintetizar vitaminas, entre las que destaca la vitamina K y como anaerobio facultativo, consumiendo oxígeno y volviendo anaerobio el intestino grueso. Además, las cepas salvajes de *Escherichia* se caracterizan por no requerir normalmente factores de crecimiento y por tener la capacidad de crecer empleando una gran variedad de fuentes de carbono y energía (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) (Brock et al., 2009).

Ciclo del crecimiento microbiano

En un sistema cerrado o con medio no renovado, también denominado cultivo monofásico o en batch, el crecimiento exponencial de una población no puede continuar de manera indefinida y se obtiene una curva de crecimiento. Esta curva de crecimiento describe un ciclo completo de crecimiento y puede dividirse en diferentes fases (Figura 1) llamadas fase lag, fase exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Brock et al., 2009).

Fase lag o de latencia

Esta fase se caracteriza por la síntesis de enzimas y otros compuestos para permitir el crecimiento, así como de la reparación de daños en las células. Es decir, es un periodo de adaptación (Brock et al., 2009)

Fase exponencial

En esta etapa aumenta el número de células. Las células que se encuentran en esta fase presentan el estado fisiológico más sano, y, por lo tanto, son las más adecuadas para realizar estudios de tipo enzimático y estructural. El tiempo de duración de esta fase dependerá de los recursos disponibles en el medio, la temperatura y las características genéticas del individuo, entre otros factores (Brock et al., 2009)

Fase estacionaria

En este periodo no hay aumento ni descenso en el número de células. Esto es debido al agotamiento de nutrientes esenciales en el medio de cultivo, y/o a la acumulación de productos de desecho que inhiben hasta el punto de detener el crecimiento exponencial (Brock et al., 2009).

Fase de muerte

Se caracteriza por la muerte de las células, que en ocasiones puede aparecer acompañada de lisis celular. Normalmente, la velocidad de la muerte celular suele ser más lenta que la de crecimiento exponencial (Brock et al., 2009).

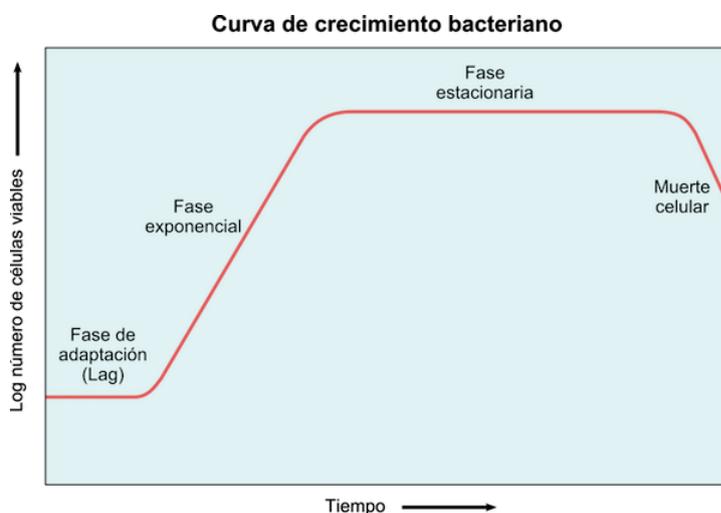


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano. Obtenida de:

https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/12/Curva_crecimiento_bacteriano.png

Escherichia coli como organismo modelo

Las bacterias son los modelos ideales para estudiar los aspectos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica. De entre estas bacterias, la especie mejor estudiada es *E. coli*, que ha sido utilizada para investigar los mecanismos básicos de la genética molecular. Además, la mayoría de los conceptos que conocemos sobre la biología molecular (replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), código genético, expresión génica y síntesis de proteínas, entre otros), son debidos a los estudios sobre este organismo (Cooper et al., 2010; Alberts et al., 2010).

Entre las características más útiles para los biólogos moleculares destacan las siguientes (Cooper et al., 2010; Alberts et al., 2010; Pierce, 2006):

-Simplicidad y facilidad para propagarse y ser estudiada en el laboratorio: Las bacterias individuales se reproducen en forma asexual y dan origen a un grupo de millones de células genéticamente idénticas, denominada colonia. Esta formación de colonias facilitará el aislamiento de cepas bacterianas genéticamente puras y permitirá la selección de variantes genéticas de una cepa de *E. coli* -por ejemplo, mutantes que son resistentes a un antibiótico, como la penicilina. La selección de mutaciones se ve favorecida por el genoma haploide de *E. coli*, porque no hay genes dominantes en el mismo locus para suprimir y enmascarar las mutaciones recesivas. Además, presenta requisitos nutricionales sencillos (glucosa, sales y compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos), pero también es capaz de crecer más lento en un medio con sales, fuente de nitrógeno (amoníaco) y una fuente de carbono y energía (glucosa).

-Adaptación a condiciones químicas variables.

-Evolución rápida por mutación y selección: Uno de los valores de la rápida reproducción, es la enorme cantidad de células que pueden crecer con rapidez, de modo que, incluso mutaciones muy raras, podrán aparecer en un corto periodo de tiempo. Por consiguiente, se han aislado y caracterizado numerosas mutaciones de *E. coli* que afectan a todas sus características macroscópicas, microscópicas y metabólicas, desde el aspecto de la colonia hasta la resistencia a los fármacos.

-Tamaño pequeño del genoma: La cepa estándar de laboratorio de *E. coli* K-12, tiene un genoma de unos 4,6 millones de pares de bases de nucleótidos, en una sola molécula de ADN circular, que codifica unos 4300 tipos de proteínas diferentes. Para acomodar esta cantidad grande de ADN dentro de una sola célula el cromosoma de *E. coli* está muy enrollado y condensado. La información dentro del cromosoma de *E. coli* también está compactada, con ADN no codificante entre los genes y dentro de ellos y con pocas secuencias para las cuales haya más de una copia. Los genes pueden desempeñar papeles importantes que incluyen la adaptación a entornos no habituales, la coordinación de las vías metabólicas, la organización del cromosoma y la comunicación con otras células bacterianas.

Como ocurre con otras bacterias, cepas de *E. coli* clasificadas como miembros de una misma especie pueden diferenciarse genéticamente mucho más de lo que se diferencian entre sí diferentes variedades de organismos que se reproducen sexualmente, como una planta o un animal. Una cepa de *E. coli* puede tener muchos centenares de genes ausentes en otra cepa, de

forma que ambas pueden tener en común sólo el 25% de su genoma, como se observa al comparar las cepas K12 y O157:H7 (Land et al., 2015).

PROTEÓMICA

El análisis a gran escala de las proteínas dentro de una célula, tejido u organismo se denomina proteómica. Es un campo de rápida evolución que pretende identificar y caracterizar las proteínas y sus proteoformas (isoformas y variantes de modificaciones postraduccionales, PTM), así como cuantificar todas las proteínas expresadas en una célula concreta (el proteoma), además de establecer la localización de estas proteínas en diferentes orgánulos subcelulares y dilucidar las redes de interacciones entre proteínas que gobiernan las actividades celulares (Cooper et al., 2010; Landels et al., 2015).

Las proteínas no suelen actuar solas en el interior de la célula, sino que funcionan interaccionando con otras proteínas que pertenecen a complejos y redes proteicos. Por lo tanto, identificar estas interacciones permite descubrir la función de las proteínas, así como comprender las redes de interacciones proteicas implicadas en el comportamiento de las células. Es por ello por lo que dos de los principales objetivos de la proteómica son los estudios de localización subcelular global y el análisis de los complejos proteicos y sus interacciones (Cooper et al., 2010).

Análisis proteómico

Los métodos de alto rendimiento a menudo usados en aproximaciones biotecnológicas, utilizan la técnica de shotgun (perdigonada) (Figura 2), en la que el proteoma es digerido en péptidos que tienen una longitud de entre 5 y 14 aminoácidos. Todas las proteínas o grandes polipéptidos pueden ser también analizados con abundancias variables. La mezcla requiere fraccionamiento, usando normalmente cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o soluciones enfocadas isoelectricamente, lo cual divide la muestra individual en fracciones menos complejas. Haciendo esto se coleccionan juntos péptidos con características similares -tales como hidrofobicidad, estado de la carga o punto isoelectrico- y mejora significativamente la calidad final de los datos. Las muestras están entonces sujetas al nanoflujo de HPLC de fase reversa, acoplada directamente al espectrómetro de masas. Este proceso es referido como MS-MS o MS² (Landels et al., 2015).

El espectrómetro de masas (MS) escanea inicialmente las masas e intensidades de todos los péptidos eluidos de HPLC, en una escala de segundos a milisegundos, esto es un escaneo de inspección del espectrómetro de masas. Los péptidos eluidos son entonces seleccionados para

la fragmentación desde el escaneo de inspección tanto en un método de adquisición dependiente de datos (DDA) como independiente de datos (DIA). DDA se dirige a un pico específico desde el escaneo de inspección para posteriores análisis, mientras que todos los iones de los fragmentos DIA del escaneo de inspección son escaneados simultáneamente. Los datos son entonces analizados computacionalmente para identificar y caracterizar el proteoma (Landels et al., 2015).

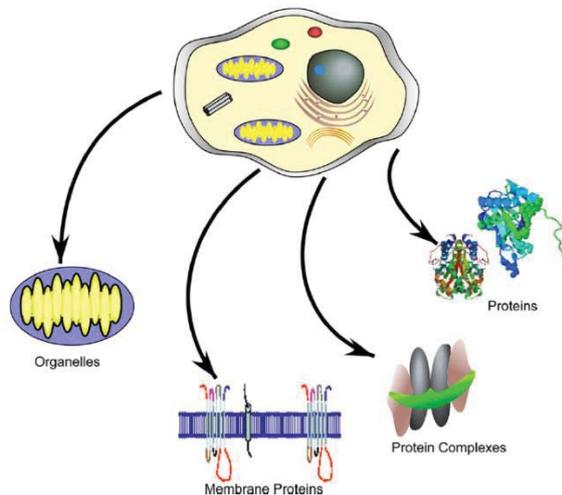


Figura 2. La proteómica shotgun puede ser usada para identificar los componentes de las células, orgánulos, complejos de proteínas y proteínas. También simplifica el análisis de las proteínas de membrana desde que las proteínas pueden ser digeridas directamente en una bicapa lipídica en vez de tratar de enriquecer las proteínas. Las proteínas de membrana son hidrofóbicas y difíciles de manipular en tampones acuosos (Yates, 2013).

Aproximaciones en proteómica

Las aproximaciones en proteómica pueden ser subdivididas entre modos de descubrimiento y de centrarse en el blanco (dirigida), para la caracterización del proteoma y el análisis de subconjuntos de proteínas, respectivamente. La proteómica clásica emplea electroforesis en dos dimensiones (2DE) para el análisis del perfil de expresión, donde la identificación de proteínas requiere la espectrometría de masas como segunda etapa (Figura 3) (Landels et al., 2015).

Los métodos de cuantificación libres de geles logran la identificación de proteínas y la cuantificación relativa usando espectrometría de masas (MS) con ventajas significativas sobre 2DE (Figura 4). Dentro de la proteómica se encuentran los métodos de etiquetado de proteínas y péptidos, métodos metabólicos (por ejemplo, SILAC) o etiquetas químicas (iTRAQ). La selección de la técnica es dependiente del contexto biológico, número de muestras que van a ser procesadas y comparadas (Landels et al., 2015).

Las aproximaciones proteómicas dirigidas al blanco están orientadas a la detección y a la cuantificación precisa de subgrupos específicos de las proteínas de interés. Esto complementa los modos de descubrimiento proteómico y las aplicaciones incluyen la verificación de las proteínas de los candidatos y la monitorización de los procesos. La cuantificación está basada en la detección y la medida de los péptidos proteotípicos que representan la proteína, según la

secuencia de aminoácidos única (Landels et al., 2015). Los estudios recientes también han medido el movimiento de las proteínas por la determinación de los ratios de la síntesis y degradación de proteínas (Cooper et al., 2010).

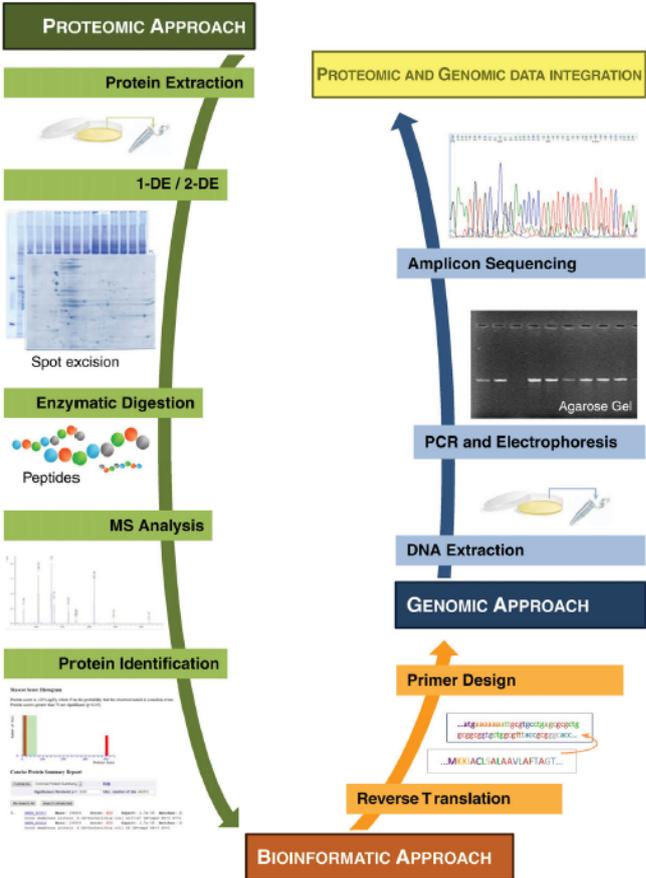


Figura 3. Típico flujo de trabajo en proteómica representando la aproximación clásica basada en geles para la identificación de proteínas (Radhouani et al., 2012).

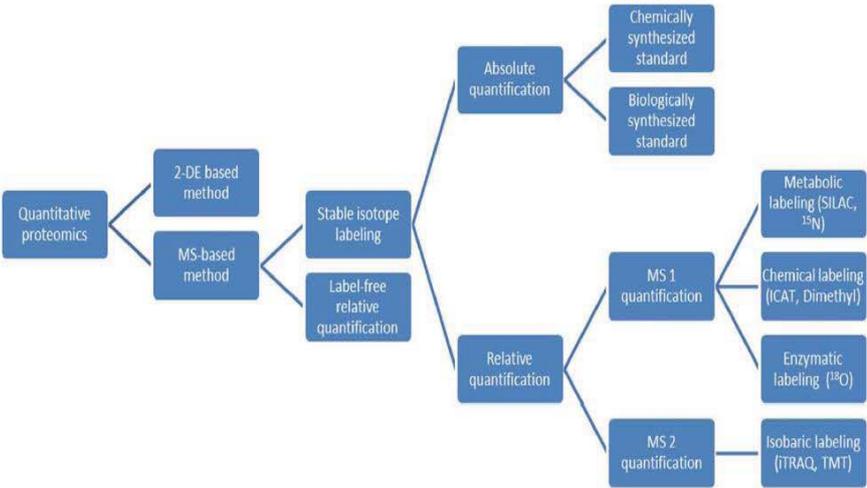


Figura 4. Principales estrategias para la proteómica cuantitativa (Zhang et al., 2013)

RIBOSOMA

RIBOSOMA BACTERIANO

Los ribosomas son el lugar donde se sintetizan las proteínas a partir de un ARN mensajero (ARNm) en todos los organismos. Se caracterizaron como partículas subcelulares mediante ultracentrifugación de células lisadas y normalmente se designan de acuerdo con su coeficiente de sedimentación: 70S para los ribosomas procariotas y 80S para los ribosomas de células eucariotas, los cuales son de mayor tamaño (Figura 5). Los ribosomas contienen alrededor del 80% del ácido ribonucleico (ARN) total de las células (Pierce, 2005). Son orgánulos complejos y en bacterias cada uno de ellos está formado por más de 50 proteínas distintas y moléculas de ARN. Un ribosoma bacteriano funcional consta de dos subunidades, una subunidad ribosómica grande (50S) y una subunidad ribosómica pequeña (30S), dando lugar a un coeficiente combinado de 70S. Las dos subunidades ribosómicas de forma irregular encajan y forman una hendidura, a través de la cual pasa el ARNm a medida que se mueve el ribosoma durante la traducción. En la subunidad grande bacteriana se encuentran los ARN ribosómicos (ARNr) 23S y 5S y 31 proteínas, mientras que la subunidad pequeña incluye el ARNr 16S y 21 proteínas. El hecho de que una célula contenga muchos ribosomas refleja la importancia de la síntesis de proteínas en el metabolismo celular. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 20000 ribosomas, ocupando cerca del 25% del peso seco de la célula, y las células de mamíferos en continua división contienen aproximadamente 10 millones de ribosomas (Cooper et al., 2010; Pierce, 2005; Nelson & Cox, 2009).

El proceso de la biosíntesis de las proteínas (traducción) consta de cinco etapas (Klug et al., 2006; Nelson & Cox, 2009; Feduchi et al., 2010):

-Fase 1: Activación de los aminoácidos. Para que se pueda sintetizar un polipéptido son necesarios tanto la activación del grupo de cada aminoácido, que permite la creación del enlace peptídico, así como determinar la relación entre cada aminoácido de la cadena con el ARNm. Estos dos objetivos se consiguen mediante la unión del aminoácido al ARN transferente (ARNt). Esta reacción se produce en el citosol, emplea las enzimas aminoacil ARNt sintetetas, que son dependientes de Mg^{2+} , y da como resultado la unión de cada aminoácido a su ARNt específico por enlace covalente y el consumo de adenosín trifosfato (ATP).

-Fase 2: Iniciación de la traducción. En la bacteria *E.coli* participan los siguientes componentes: Subunidad ribosómica pequeña, una molécula de ARNm, un ARNt iniciador específico cargado, guanósín trifosfato (GTP), Mg^{++} y diversos factores de iniciación (IF) de carácter

proteico. El sentido de estos factores (IF1, IF2 e IF3), es el de unirse a la subunidad pequeña del ribosoma, con el fin de aumentar la afinidad de unión de los demás componentes necesarios para esta etapa de la traducción. Al mismo tiempo que esto sucede, el ARNm se une a su vez a la subunidad pequeña. En bacterias, el codón de iniciación del ARNm (AUG) corresponde al aminoácido formilmetionina.

En la unión del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma, media una secuencia de una longitud de hasta 6 ribonucleótidos de longitud, que se localiza en una posición anterior al codón de iniciación de la traducción. Esta secuencia (conocida como de Shine-Dalgarno, SD) interacciona con su secuencia complementaria (anti SD), que se encuentra en una región del ARN 16S de la subunidad pequeña del ribosoma.

A continuación, otra proteína de iniciación permite la unión del ARNt-formilmetionina al codón AUG del ARNm, que se encuentra en el sitio P (Peptidil) de la subunidad ribosómica pequeña, y se libera IF3. Este paso posibilita la lectura posterior de los grupos de tres ribonucleótidos. Por último, a este conjunto de elementos, conocido como complejo de iniciación, se une la subunidad ribosómica grande. En este proceso se produce gasto de GTP y la liberación de IF1 e IF2.

-Fase 3: Elongación o alargamiento de la cadena peptídica. Cuando las dos subunidades del ribosoma junto con el ARNm se encuentran acoplados, tiene lugar la aparición del sitio P (peptidil) y el sitio A (aminoacil), dos lugares en la subunidad grande del ribosoma, que permiten la unión de moléculas de ARNt cargadas. El ARNt de iniciación se unirá a una molécula de ARNt con su correspondiente aminoácido (aa). A continuación, la enzima peptidil transferasa, se encargará de la formación de un enlace peptídico entre los aa del sitio P y del sitio A, así como de romper la unión covalente entre el ARNt del sitio P y su aa. Después, el ARNt del sitio se dirige al sitio E (exit, salida o escape) y sale del ribosoma, mientras que el agregado ARNm-ARNt-aa₂-aa₁ se dirige al sitio P. Este desplazamiento consume GTP y necesita de factores de elongación (EF) para que pueda llevarse a cabo. Ahora el sitio A se encuentra vacío y puede aceptar un nuevo ARNt cargado con su respectivo aa. A partir de aquí, tienen lugar sucesivos ciclos de elongación, que constan de la formación del enlace peptídico entre los aa del sitio P y el aa del sitio A, el desplazamiento tanto del ARNt no cargado en el sitio P al sitio E, como del ARNt cargado del sitio A al sitio P y la entrada de un nuevo ARNt cargado con un nuevo aa. Esta etapa termina cuando se ha formado una cadena polipeptídica de una longitud de unos 30 aa.

-Fase 4: Terminación. Con esta etapa se termina la síntesis de las proteínas. Hay 3 codones (UAG, UAA y UGA) conocidos como codones de stop o de parada, que desencadenan la finalización de la traducción, al no permitir la unión de nuevos ARNt al sitio A del ribosoma. La aparición de este tipo de codón provoca la actuación de los factores de liberación, que separan al ARNt de la cadena polipeptídica con gasto de GTP. A continuación, se liberan el ARNt no cargado y se separan las dos subunidades del ribosoma.

-Fase 5: Plegamiento y procesamiento postraducción. En esta última etapa, la cadena polipeptídica se pliega con el fin de obtener su conformación tridimensional correcta. Antes o después de tener lugar su plegamiento, este polipéptido puede sufrir modificaciones como la adición de grupos funcionales, eliminación de aminoácidos, etc. Estos cambios se conocen como modificaciones postraduccionales.

Comparación de los ribosomas de las células procarióticas y eucarióticas

Ribosoma procariota 70S	Ribosoma eucariota 80S
Subunidad mayor - 50S 35 proteínas RNA 5S y RNA 23S	Subunidad mayor - 60S 49 proteínas RNA 5S, RNA 5.8S y RNA 28S
Subunidad menor - 30S 21 proteínas RNA 16S	Subunidad menor - 40S 33 proteínas RNA 18S

Figura 5. Composición de los ribosomas de las bacterias y las células eucariotas. La letra S significa unidad Svedberg. Obtenido de: <https://docplayer.es/docs-images/76/73197835/images/4-1.jpg>.

ESTRÉS BACTERIANO

El estrés de las bacterias engloba el conjunto de modificaciones en la expresión de los genes y la actividad de las proteínas con el fin de sobrevivir a cambios bruscos y perjudiciales para la supervivencia del organismo. Es de suma importancia conocer los mecanismos implicados en la respuesta al estrés, para así poder actuar sobre ellos en sus hábitats naturales (Giuliodori et al., 2007).

Se sospecha que el ribosoma podría jugar un papel fundamental en la adaptación al estrés ambiental como un punto de control para sentir los cambios de temperatura y en los niveles de nutrientes (VanBogelen et al., 1990; Srivatsan et al., 2008). La función y composición de los elementos implicados en la traducción se ven alteradas por la temperatura, en especial, por las bajas temperaturas (Giuliodori et al., 2007; Yamanaka, 1999; Goldstein et al., 1990). A pesar de estas sospechas, sabemos muy poco de cómo el ribosoma participa en la respuesta celular al estrés bacteriano, especialmente en lo que se refiere a la adaptación a cambios de temperatura.

MUTACIONES RESISTENTES AL ANTIBIÓTICO KASUGAMICINA

La adquisición y desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos son debidas a la adaptación al medio y las diferentes modificaciones (mutaciones o genes de resistencia), que provocan su supervivencia en estas condiciones. Además, otro aspecto para tener en cuenta es que esta resistencia puede transmitirse tanto entre organismos del mismo género (transmisión vertical) como entre organismos pertenecientes a distintos géneros (transmisión horizontal) (File Jr, 2002).

Muchos antibióticos actúan a nivel del ribosoma debido a que la síntesis de proteínas es un proceso fundamental de la célula. De esta manera, si se consigue actuar sobre el proceso de traducción de las bacterias, se puede inhibir la síntesis proteica, impidiendo su crecimiento y, por tanto, consiguiendo la desaparición o reducción de las enfermedades producidas (González, 2016). Muchos antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas se unen a sitios específicos del ribosoma e impiden el crecimiento celular mediante la interferencia en una o más etapas de la traducción. Por consiguiente, estos compuestos sirven como sondas útiles para comprender la función ribosomal.

La iniciación de la traducción es la etapa ratio-limitante de la síntesis de proteínas y es una diana central para la regulación global de la expresión de genes. En bacterias, la modulación de la iniciación de la traducción ha sido atribuida a secuencias y estructuras secundarias dentro de ARNm. Estas incluyen la secuencia SD, la identidad del codón de iniciación, la presencia o ausencia de estructuras secundarias en la secuencia líder 5' y la presencia de secuencias ricas en A/U reconocidas por la proteína ribosomal S1 (Laursen et al., 2005; Kozak, 2005; Boni et al., 1991). Por todo esto, no sorprende que la iniciación de la traducción sea una diana importante para antibióticos. Un antibiótico inhibidor de la iniciación de la traducción es la Kasugamicina (Ksg). La Ksg es un antibiótico aminoglicósido obtenido de la cepa M-338 de *Streptomyces kasugiensis*, que ha mostrado ser activo contra una amplia variedad de microorganismos. Dado que tiene una baja toxicidad contra plantas, humanos, peces y animales, fue considerado adecuado para su uso en agricultura. Ksg (Figura 6) está disponible comercialmente como el fungicida kasumina y es usado todavía hoy en día para el control de hongos que atacan al arroz. Además, ha sido empleado clínicamente en el tratamiento de las infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* (Umezawa et al., 1965; Ishigami et al., 1967; Suhara, et al., 1966; Hamada et al., 1965; Takeuchi et al., 1965).

Una manera de identificar sitios funcionales importantes en el ribosoma es el aislamiento de mutaciones de resistencia a antibióticos en los componentes ribosomales. Los sitios de resistencia han sido mapeados tanto en proteínas ribosomales como en genes de ARN ribosomal (Cundliffe, 1981; Cundliffe, 1990). Así como con muchas clases de antibiótico, mutaciones de resistencia han sido encontradas para la Ksg. La resistencia a Ksg puede surgir de la mutación en el gen *ksgA*, el cual codifica una adenina dimetilasa que transfiere dos grupos metil de S-adenosil-L-metionina al N6 de A1518 y A1519 del ARNr 16S; en otras palabras, la baja metilación de estas bases produce una resistencia modesta a la Ksg (Helser et al., 1971; Helser et al., 1972).

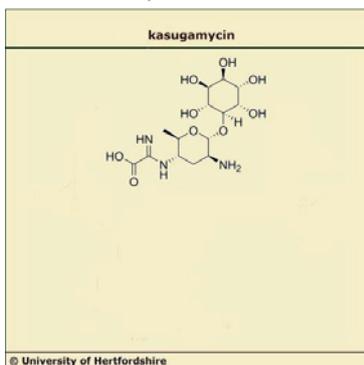


Figura 6. Estructura de la kasugamicina

(<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/structure/2195.jpg>).

El aislamiento de mutaciones de resistencia en el ARNr fue más complicado. El organismo modelo *E.coli* es el más adecuado para estudiar la traducción. El aislamiento de mutaciones resistentes a antibióticos en los genes de ARNr se ha visto reducida a los 7 operones que se encargan de codificar estos genes. Un gran avance ha sido la creación de una cepa de *E.coli*, que carece de estos 7 operones y en la cual todo el ARNr es codificado en un plásmido con un operón *rrn* (Cepa $\Delta 7$ *prn*) (Asai et al., 1999). De esta manera, se simplifica el estudio de la síntesis de proteínas. Además, la existencia de estos plásmidos permite el aislamiento de mutaciones resistentes de una forma más sencilla. Siguiendo esta línea, Vila Sanjurjo et al., (1999) seleccionaron mutaciones espontáneas de ARNr que son resistentes a Ksg. En estas pruebas, los investigadores obtuvieron tres mutaciones en las posiciones universalmente conservadas A794, G926 y A1519 del ARNr 16S (Vila-Sanjurjo et al., 1999) (Figura 7). Mientras A794, G926 daban lugar a resistencias muy elevadas, la resistencia conferida por A1519 era más baja y similar a la de la mutación en el gen *ksgA* (Helser et al., 1971; Helser et al., 1972).

Además, en pruebas de sondeo químico con ribosomas de tipo salvaje en presencia de la Ksg se observaron cambios en la reactividad de A794, C795 y G926 sugiriendo que estos residuos están involucrados en la unión del antibiótico (Woodcock et al., 1991). Estos residuos operan en la hendidura entre la cabeza y la plataforma de la subunidad 30S, cerca de la ruta de ARNm

en el sitio ribosomal E (Carter et al., 2000; Yusupova et al., 2001) (Figura 8D). El residuo 926G establece un puente de hidrógeno con el mRNA entre las posiciones -1 y +1, de los codones de los sitios E y P respectivamente (Carter et al., 2000) (Figura 8D). En reconstrucciones recientes efectuadas mediante crio-microscopía electrónica (cryo-EM), se ha observado que, durante la iniciación, tanto en eucariotas como en procariontes, existe un paso en el que la base en la posición -1 del ARNm se apila con G926 en el sitio E, mientras que la siguiente base +1 del codón AUG, se apila con A790 en el sitio P (Figura 9) (Hussain et al., 2016; Hussain et al., 2014).

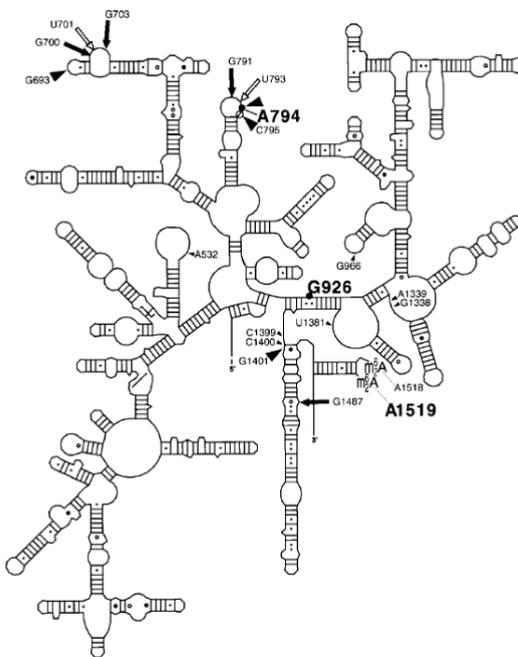


Figura 7. Estructura secundaria del ARNr 16S mostrando los sitios asociados con la acción de la Kasugamicina. Las mutaciones resistentes a Kasugamicina identificadas se muestran en negrita (Vila et al., 1999).

Los estudios cristalográficos realizados por Vila-Sanjurjo y colaboradores mostraron la localización de la Ksg y su lugar de unión en el ribosoma (Schuwirth et al., 2006) (Figura 8).

Un nuevo antibiótico llamado GE81112 ha sido caracterizado recientemente y en esos estudios, las mutaciones generadas por Vila-Sanjurjo et al. (Vila-Sanjurjo et al., 1999) fueron utilizadas de nuevo. La localización ribosomal de GE81112, determinada por un estudio cristalográfico (Fabbretti., 2016), sitúa a este antibiótico en una posición que no está muy alejada del sitio de unión de Ksg. Como se observa en la tabla 1, cuando tuvo lugar la traducción de ARNm *in vitro*, con extractos derivados de las células relacionadas con las mutaciones de dos bases (A794 y G926), que reducen sustancialmente el poder inhibitorio de Ksg, ellos detectaron también un incremento de IC₅₀ (la mitad de la concentración máxima inhibitoria) de GE81112, es decir, disminuye la inhibición que provoca este antibiótico en *Escherichia coli*, a pesar de que el efecto no es tan notorio como en el caso de la Ksg (Vila-Sanjurjo et al., 1999). Finalmente, en estos estudios *in vitro*, se encontró que la mutación A1518U confiere una elevada resistencia

sobre el efecto inhibitorio de la Ksg (Maio et al., 2016). Esto es interesante dado que mutaciones en esta posición no confirieron resistencia *in vivo* en estudios anteriores.

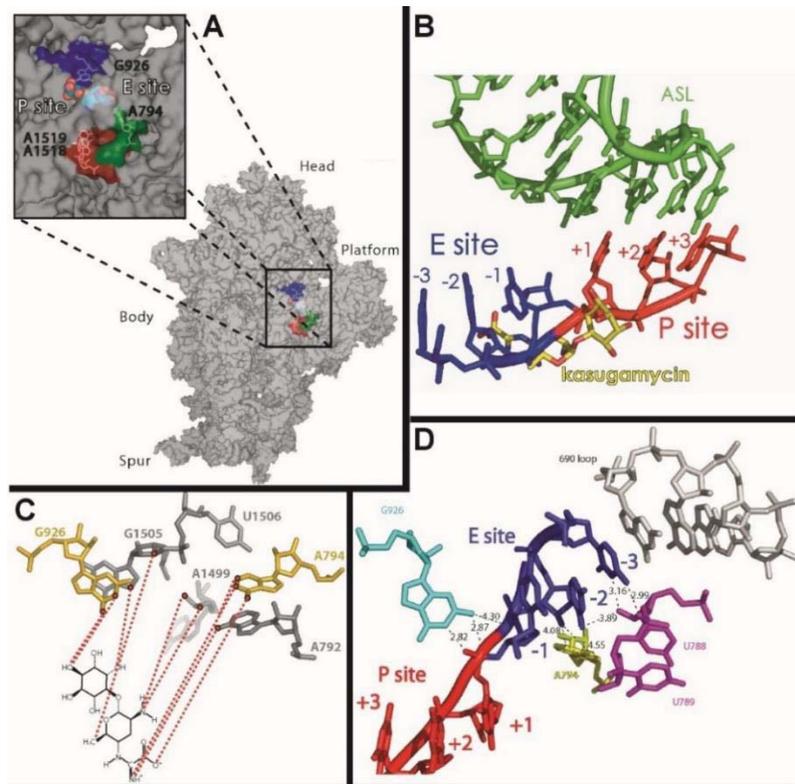


Figura 8. Localización del bolsillo de unión de la Ksg en el ribosoma. **A)** El bolsillo de unión de la Ksg en el contexto de la subunidad 30S remarcando Ksg (cián), el bucle 790 (verde), la región 926 (azul) y el tallo-bucle de dimetil A (DASL, rojo). Los residuos A794, G926, A1518 y A1519 se muestran en color negro. **B)** Localización de la Ksg respecto al sitio P del ARNm (rojo), sitio E del ARNm (azul), tallo del bucle anticodón (ASL, en inglés) (verde). Los residuos de ARNm están etiquetados con la posición relativa respecto a la primera base del codón del sitio P (+1). Las coordenadas de ASL y ARNm fueron extraídas de la estructura de la subunidad 30S de *Thermus thermophilus*. **C)**

Representación de los sitios de resistencia (color dorado) y sitios de contacto (color gris) respecto a la Ksg. **D)** Representación de los residuos A794 (amarillo) y G926 (cián) respecto a los sitios P (rojo) y E (azul) del ARNm. (Figura modificada a partir de Schuwirth et al., 2006).

E. coli AVS6900916S rRNA Mutations	IC ₅₀ of mRNA Translation	
	GE81112 (µg/mL)	Kasugamycin (µg/mL)
wt	2	12
A794G	18	780
A794U	15	384
G926A	32	390
G926C	28	192
G926U	35	750
A1518U	3	880

Tabla 1. Efecto de las sustituciones de bases de ARNr 16S en la sensibilidad del ribosoma a GE81112 y a la inhibición por Ksg (Maio et al., 2016).

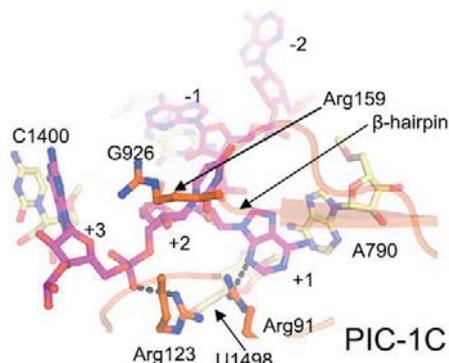


Figura 9. En PIC-1C, la base A+1 se apila con A790, mientras la base -1 se apila con G926. También se muestran C1400, U1498 y los residuos de IF3 cercanos al codón (Hussain et al., 2016).

Nuestro grupo ha observado recientemente que las células de *E.coli* que llevan mutaciones en G926 muestran un fenotipo complejo de sensibilidad al frío que nuestro grupo ha denominado fenotipo de pérdida de resistencia cruzada bajo estrés (Mato, 2013). Se ha mostrado que los cultivos de mutantes que crecen de manera exponencial (fase logarítmica de crecimiento) a 37°C después de someterlos a una disminución de temperatura reanudan el crecimiento a la nueva temperatura, mientras que la viabilidad celular a bajas temperaturas se pierde gradualmente si la disminución se produce después de mantener el cultivo de forma prolongada en fase estacionaria. Debido a estas observaciones se pretenden establecer los mutantes G926 como modelos válidos para el análisis de este fenómeno de resistencia cruzada (Carballido, 2014).

Los fenotipos de los mutantes G926 sugieren además que pueden existir uno o más factores que actúan durante la fase estacionaria y que están involucrados en la adaptación a bajas temperaturas, y que éstos no funcionan correctamente en los mutantes. Un candidato como factor de bajas temperaturas es la proteína de estrés ambiental PY, que se encuentra próxima al residuo G926 (Vila-Sanjurjo et al., 2004).

Los estudios llevados a cabo por previos alumnos del grupo (Carballido, 2014, González, 2016, Mato, 2013)) nos indican que además de presentar un fenotipo de sensibilidad al frío, las células con mutaciones en la posición 926 pierden la resistencia a la Ksg al crecer en frío. Estos resultados demuestran que a bajas temperaturas se da un fenotipo cruzado de pérdida de resistencia a la Ksg de los mutantes en la posición 926.

Un fenotipo parecido al de las mutaciones en 926 se ha descrito para células con deleciones de proteína RsfA (también conocida como YbeB) (Häuser et al., 2012). En este caso las células mutantes muestran problemas de viabilidad en fase estacionaria y de reanudación de crecimiento (Häuser et al., 2012). RsfA se une a la proteína L14 de la subunidad grande y bloquea la traducción al impedir la unión de ambas subunidades (Häuser et al., 2012; Khusainov et al., 2020). A pesar de estas similitudes, el fenotipo de las mutaciones en 926 es más complejo que el de las deleciones de RsfA, dado que las primeras presentan además una pérdida cruzada de resistencia que no se ha descrito para las segundas.

TRANS-TRADUCCIÓN

La traducción a menudo se detiene en varias situaciones en la célula, algunas veces programadas y otras veces inesperadas. Por lo tanto, la célula debe de tener un sistema para

sobrellevar estas emergencias (Himeno et al., 2014). La detención del ribosoma es un asunto serio para la supervivencia bacteriana. El sistema primario de rescate, que permite la liberación del ribosoma, es la trans-traducción (figura 10), mediada por el ARN transferente-mensajero (ARNtm) y una pequeña proteína de 160 aminoácidos de longitud en *E.coli*, la proteína SmpB (Small protein B). Este complejo usa los factores de traducción disponibles para restaurar la síntesis de proteínas, expresa el ARNm truncado del ribosoma detenido, y etiqueta las proteínas incompletas para su destrucción por las proteasas (Giudice et al., 2014).

El sistema de la trans-traducción es universal en las bacterias. Además, es esencial para algunas de ellas, ya que la reducción de este sistema les causa una amplia variedad de desórdenes. Desde el momento en que se observó que la ausencia de la trans-traducción desencadena la avirulencia de algunas bacterias infecciosas, los estudios se han dirigido a este sistema como una diana efectiva para los antibióticos (Himeno et al., 2014).

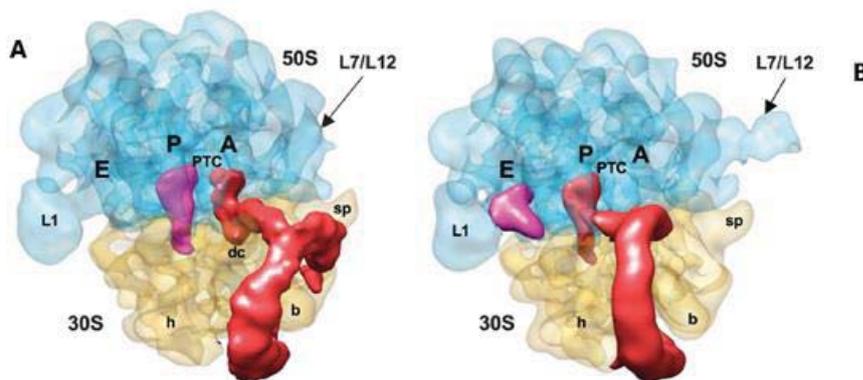


Figura 10. Sistema de la trans-traducción. Mapa de cryo-EM del complejo acomodado ARNtm-SmpB en un ribosoma detenido antes de la translocación (A), y después de la translocación (B). La densidad atribuible al ARNtm-SmpB está representada en rojo, la subunidad 50 S está en azul, la subunidad 30S está en amarillo, y el sitio P del ARNt en A y el sitio E del ARNt en B se muestran en morado. Las subunidades ribosomales semitransparentes en A y B, enfatizan la posición relativa de ARNtm-SmpB y ARNt en los tres sitios activos del ribosoma antes y después de la traslocación. Marcas de la subunidad 50S: L7/L12, stalk de proteínas L7/L12; L1, stalk de la proteína L1; y PTC, centro de trasferencia de peptidil. Marcas en la subunidad 30S: b, pico; sh, hombro; sp, espolón; dc, sitio decodificador; y h, cabeza.

Muchos de estos fenotipos defectuosos son causados por un defecto en la reacción de la trans-traducción, más que por la degradación de los productos de la trans-traducción. Esto sugiere que el reciclaje ribosomal es más importante para la célula que evitar la acumulación de proteínas no funcionales (Himeno et al., 2014).

Todos los genomas bacterianos contienen el gen *smpB* con una alta conservación de su secuencia primaria. Eliminar este gen da como resultado los mismos fenotipos a los observados en las células que carecen de ARNm.

INCORPORACIÓN DE SELENIO A LAS PROTEÍNAS

El selenio, un elemento traza esencial, se encuentra en las proteínas antioxidantes en la forma del vigesimoprimer aminoácido, selenocisteína (Sec). Los residuos Sec se localizan habitualmente en los sistemas activos enzimáticos y son esenciales para su actividad. Este es el caso de la formato deshidrogenasa de *E.coli* y la glicina reductasa de *C.sticklandii* (González et al., 2014). La incorporación de este aminoácido genéticamente inusual, codificado por proteínas, requiere el factor de elongación SelB. Este factor es homólogo al factor de elongación Tu (EF-Tu), que cataliza la unión de aminoacil-ARNt (aa-ARNt) al sitio ribosomal A, en la forma de un complejo ternario EF-Tu-GTP-aa-ARNt. Para la incorporación de la selenocisteína dentro de los polipéptidos, un codón de parada UGA es recodificado como un codón Sec en la presencia de la inserción de una secuencia de selenocisteína (SECIS) aguas abajo. El SelB procariota se caracteriza por su inusual propiedad de unirse directamente a ARNt y la secuencia de ARNm SECIS. El reconocimiento de la horquilla de ARNm SECIS sirve como una señal para la incorporación de selenocisteína ARNt (Sec-ARNt^{Sec}), como respuesta a un codón UGA (Soler et al., 2007). Estudios genéticos, cinéticos y bioquímicos de SelB de *E. coli* sugirieron que los cambios en la conformación de SelB, tales como la comunicación entre ARNm y los sitios de unión de ARNt, son esenciales para la incorporación de selenocisteína (Soler et al., 2007).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFM es identificar genes potencialmente implicados en el fenotipo cruzado de pérdida de resistencia de las células con mutaciones en la posición 926 del ARNr 16S. Los objetivos secundarios del proyecto son:

- Emplear herramientas bioinformáticas (*FunRich*, *Panther* y *String*) para analizar datos proteómicos cualitativos originados a partir de cultivos de cepas silvestres y mutantes en la posición 926.
- Establecer una metodología (sistema jerárquico de carpetas) que permita la organización y ordenación de los resultados obtenidos de este análisis y de los realizados posteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento experimental

Este trabajo es una colaboración entre el Dr. Antón Vila Sanjurjo y la Dra. Susana B. Bravo López (Unidad de Proteómica de los Laboratorios del Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Santiago de Compostela). El procedimiento experimental consistió en:

- Preparación de cultivos en el laboratorio (UDC).
- Pre-procesamiento de las muestras mediante digestión trípica para su posterior análisis mediante espectrometría de masas (CHUS).
- Análisis de las muestras en el espectrómetro de masas (CHUS).
- Pre-procesamiento de los espectros de masas para su análisis bioinformático (CHUS).
- Análisis bioinformático con los programas *Funrich*, *String* y *Panther* (UDC).

Este procedimiento se resume en la Figura 11.

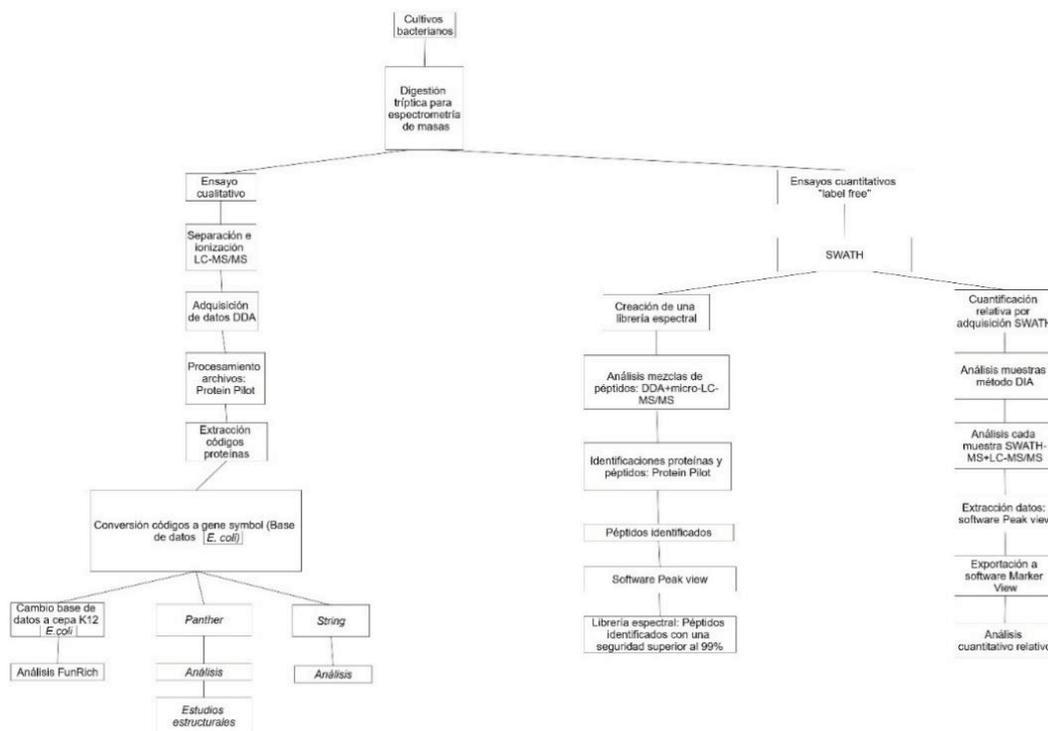


Figura 11. Diagrama resumen del procedimiento experimental. En el gráfico se representan la preparación de las muestras, el análisis de estas muestras en el espectrómetro de masas, la extracción de los códigos de las proteínas a partir de los análisis con el espectrómetro de masas, la conversión de los códigos de las proteínas a gene symbol utilizando el programa bioinformático FunRich, los análisis con los programas FunRich, Panther y String, y los análisis estructurales

A continuación, se describirán los métodos utilizados.

Cultivos bacterianos

La preparación de los cultivos bacterianos fue realizada por el Dr. Vila Sanjurjo (UDC) del siguiente modo:

-Las cepas de *E. coli* AVS69009 pKK 3535 1192U (tipo silvestre, WT) y AVS69009 pKK 3535 1192-926A (mutante, 926), se cultivaron durante 24 horas (overnight) en un medio LB agar con kanamicina (50µg/mL) y cloranfenicol (25µg/mL).

-500 ml de los cultivos que contienen Kanamicina (50µg/ ml) y cloranfenicol (25 µg/ml), fueron inoculados desde las placas overnight con un factor de dilución 1/100. Se hicieron 3 replicados.

-Una vez se desarrolló suficiente turbidez (sobre 7 horas más tarde), 100 ml fueron transferidos dentro de flasks en los que se añadió la Ksg (stock a una concentración de 200 mg/ml), dando como resultado una concentración final de 100 µg/ml.

-A las 8 horas, 100 ml de los cultivos Ksg+ y Ksg- fueron transferidos a nuevos flasks (-Ksg+ log y +Ksg +log) y el crecimiento fue parado en el hielo. Las células fueron centrifugadas a 5000 revoluciones por minuto (rpm) y los pellets fueron congelados.

-Un día después, 100 ml de los cultivos -Ksg fueron transferidos a nuevos flasks (fase estacionaria, día 2) y el crecimiento fue parado en hielo. Las células fueron centrifugadas a 5000 rpm y los pellets fueron congelados.

Digestión trípica para espectrometría de masas

La Dra. Bravo comenzó con la digestión en gel mediante el empleo de 100 µg de la proteína en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel se dejó correr hasta que el frente entró en 3 mm del gel separador (Bonzon-Kulichenko et al., 2011; Pérez-Hernandez et al., 2013). A continuación, la banda proteica se observó por tinción fluorescente Spyro-Ruby, se cortó y se digirió trípica por el método de Shevchenko et al., (1996) con ligeros cambios, que se detallan a continuación.

El lavado de la banda fue realizado con bicarbonato amónico 50 mM en 50% de metanol, seguido de su deshidratación en acetonitrilo, para que la banda tuviese la suficiente calidad, como para poder realizar posteriormente una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). A continuación, el gel se redujo en ditiotreitól (DTT) 10 mM y bicarbonato amónico

50 mM a 56°C durante 30 minutos y alquilado con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 20 minutos en temperatura ambiente y oscuridad. Después, las piezas de gel fueron lavadas con bicarbonato amónico 50 mM en metanol y deshidratadas con acetonitrilo.

Antes de empezar con la digestión triptica se rehidrataron las piezas de gel a 37°C durante 1 minuto. La digestión tuvo lugar mediante la adición de tripsina porcina modificada (Promega) [20 ng/μl] en bicarbonato amónico 20 mM durante 16 horas a 37°C.

Los péptidos resultantes de la digestión se recogieron en tres incubaciones de 20 minutos en 40 μl de 60% acetonitrilo+ 0,5 % ácido fórmico. Por último, estos péptidos se agruparon y fueron secados al vacío con SpeedVac, con el fin de almacenarlos a -20°C para su posterior uso.

El análisis de las muestras en el espectrómetro de masas y su posterior pre-procesamiento de los espectros de masas, mediante el empleo de software específico, para su posterior análisis bioinformático, fue realizado por la Dra. Bravo, que procedió de la siguiente forma:

Ensayo cualitativo

Se llevó a cabo la separación de los péptidos y su posterior ionización mediante MS-MS. Esta técnica constó de una fase de separación de los péptidos mediante micro-cromatografía líquida de alto rendimiento (micro-HPLC) (5μl/min) con columna en fase reversa, seguida de la ionización de los péptidos separados por polaridad en el espectrómetro de masas, sin el empleo de matriz. En este caso, se utilizó la micro-cromatografía líquida (Eksigen Technologies nano LC 400 SCIEX), acoplada a espectrómetro de masas de alta velocidad Triple-TOF 600 (SCIEX), y fuente de ionización modo micro.

En esta técnica se llevó a cabo la resuspensión de los péptidos digeridos en 20μl de fase móvil A (2% Acetonitrilo (ACN), 0,1% ácido fórmico) mediante 10 minutos de sonicación. A continuación, se inyectaron 4 μl de cada muestra (5 μl/min) en un loop para resuspender la mezcla de péptidos en la fase móvil B (95% H₂O, 0,1% ácido fórmico). Después, se eliminaron los contaminantes de los péptidos, que pueden dañar la columna, mediante una precolumna de fase reversa basada en sílica (YMC TRIART C18 5X0,5 mm, 3 mm de tamaño de partícula y 120 ángstrom (Å) de tamaño de poro, YMC Technologies). Esta precolumna se encuentra conectada online a una columna de captura (YMC-TRIART C18, 150X 0,30 mm, tamaño partícula 3 mm, tamaño poro 120Å, YMC Technologies), en la que los péptidos se separaron por polaridad (5 μl/min) y con gradiente de elución de 2% hasta 90% de fase móvil B.

La adquisición de datos tuvo lugar en un sistema Triple-TOF 6600 (SCIEX) usando un flujo de trabajo DDA mediante el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX). Las condiciones de las fuentes e interfaces que se emplearon fueron las siguientes: voltaje flotante del ionspray (ISVF) de 5500V, cortina de gas (CUR) de 25, energía de colisión (CE) de 10 y gas de fuente de iones 1 (GS1) de 25. Se seleccionaron los iones que presentaban un cociente masa/carga (m/z) mayor que 350 y menor que 1400 con estados de carga de +2-5, una tolerancia de masa de 250 partículas por millón (ppm) y un umbral de abundancia de más de 200 ciclos por segundo (cps). Los iones diana del análisis anterior se eliminan cada 15 segundos. La calibración del equipo es automática cada 4 horas empleando una mezcla de péptidos trípticos (pepcal Mix).

Una vez adquiridos los MS/MS tuvo lugar el procesamiento de los archivos con el software Protein Pilot TM 5.0.1 (SCIEX) utilizando el algoritmo ParagonTM para la búsqueda en la base de datos y ProgroupTM para agrupar los datos. Para las búsquedas se utilizó una base de datos de Uniprot específica de ratón (Prot reléase 2016-2, Swiss-Prot). La tasa de falso positivo (FDR) se obtuvo con un ajuste lineal, que determina como correctamente identificadas las proteínas con un valor de FDR inferior al 1% (Shilov et al., 2007; Tang et al., 2008).

Ensayos cuantitativos “label free”

Adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masa teóricos (SWATH)

Creación de la librería espectral

Para construir las librerías espectrales de MS/MS, las mezclas de péptidos (pools de muestras) se analizaron empleando un método de adquisición DDA, utilizando MS-MS. Para conseguir una correcta representación de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras, se agruparon las muestras de cada grupo (pools), utilizando mezclas iguales de las muestras originales. A continuación, se separaron 4 μ l de cada pool en un sistema micro-LC (Ekspert nLC425, Eksigen), empleando una columna (YCM-Triart C18 150 μ m x 0,3 mm, 12 nm, s-3 μ m, YMC CO Japan) con un flujo de 5 μ l/min. Se utilizaron como solventes A (agua) y B (acetonitrilo), ambos conteniendo ácido fórmico 0,1% con calidad suficiente para LC-MS. El gradiente empleado para la separación consistió en 5-95% de solvente B durante 30 minutos, seguido de 90% de solvente B 5 minutos y 5 minutos de solvente B 5% para equilibrar la columna, es decir, 40 minutos en total. Los péptidos según se iban eluyendo fueron inyectados de manera directa en un espectrómetro de masas Triple-TOF 6600 cuadrupolo-TOF híbrido (SCIEX), funcionando con un sistema de adquisición DDA en modo de iones positivos. Se emplea como interfaz, entre el microLC y el MS, una microfuelle (SCIEX) con un voltaje de 2600V para ionizar los péptidos. El modo de adquisición consistió en un escáner de inspección

MS de 250 ms con 400-1250 m/z, seguido por un escáner de adquisición MS/MS de 25 ms con 100-1500 m/z, consiguiendo un tiempo total de 2,8 segundos. Los precursores fragmentados se adicionaron a una lista dinámica de exclusión durante 15 s, con el fin de eliminar del análisis todos los iones con carga +1.

Para la identificación de péptidos y proteínas se utilizó el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) con la base de datos Uniprot de *Escherichia coli*, detallando iodacetamida como alquilación de las cisteínas, y FDR ajustado al 1% para proteínas y péptidos. A continuación, se utilizó la opción MS/MSALL (versión 2.0, SCIEX), que permite el empleo de los espectros MS/MS de los péptidos identificados, con el fin de extraer los picos SWATH. Los péptidos que tienen un valor de seguridad por encima del 99% (como los obtenidos de la búsqueda de la base de datos Protein Pilot), se incluyeron en la librería espectral.

Cuantificación relativa por adquisición SWATH

La adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masa teóricos (SWATH-MS, del inglés Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra), fue llevada a cabo en un sistema LC-MS/MS Triple TOF 6600 (AB SCIEX).

Se analizaron 18 muestras (realizando duplicados técnicos de cada una de las muestras), empleando un método de adquisición independiente de datos (DIA). Cada muestra (4 μ l) se analizó con un sistema LC-MS con un gradiente LC, como el empleado para la construcción de la librería espectral, pero utilizando un método de adquisición SWATH-MS. El método se basa en la repetición de un ciclo, que se sustenta en la adquisición de 65 escáneres o ventanas TOF-MS/MS (limitando 400-1500 m/z, modo de alta sensibilidad, y con 50 ms de tiempo de adquisición) superpuestas de aislamiento de precursor secuencial de ancho variable (1 m/z de superposición), abarcando el rango de masas de 400 a 1250 m/z, con un escáner TOF MS previo (400-1250 m/z, 50 ms de tiempo de adquisición) para cada ciclo. Para cada conjunto de muestras, el ancho de las 65 ventanas de variables se perfeccionó con la densidad iónica encontrada en el DDA previo (archivos empleados en la librería), utilizando la hoja de cálculo SWATH variable window calculator (SCIEX).

Para la extracción de los perfiles cromatográficos de iones mediante el método SWATH, se empleó el software Peak View (Versión 2.2), utilizando el SWATH Acquisition Micro App (versión 2.0). Esta aplicación procesó los datos utilizando la librería espectral previa (creada a partir de los datos DDA). La selección de las proteínas se llevó a cabo escogiendo aquellas con más de diez péptidos y siete transiciones (fragmentos), teniendo en cuenta la intensidad de

señal, y se excluyeron todos los péptidos compartidos o modificados. Para la extracción de los cromatogramas se utilizaron ventanas de 5 min y 30 ppm de ancho y se intentó la cuantificación de todas las proteínas de la librería identificadas con $FDR < 1\%$. Los tiempos de retención de los péptidos escogidos para cada proteína, se ajustaron mediante una recta de calibrado de los tiempos de retención de todas las muestras a lo largo del tiempo completo de la cromatografía. Para cada transición seleccionada, se generó el cromatograma iónico y el área de los picos de los péptidos se consiguió con la suma de las áreas de los picos de fragmentos iónicos correspondientes. El Peak View consideró el FDR y una puntuación (score) para cada péptido asignado, teniendo en cuenta los componentes del espectro y cromatograma, y, para la cuantificación proteica, sólo se utilizaron los péptidos con $FDR < 5\%$. El cálculo de la cuantificación se obtuvo mediante la suma de las áreas de los picos de los péptidos correspondientes para cada proteína.

Los picos de área integrados (archivos .mrkvw procesados en el Peak View) se exportaron al software Marker View (AB Sciex) para el análisis cuantitativo relativo. Esta exportación dio como resultados tres archivos (información cuantitativa de los iones individuales, suma de las intensidades de los distintos iones para un péptido particular, y la suma de intensidades de los distintos péptidos para una proteína concreta). Este software utiliza algoritmos que localizan los picos espectrales y cromatográficos a partir de los datos crudos SWATH. Además, la alineación de los datos corrige las variaciones en los tiempos de retención y masa, y, de esta forma, permite la comparación de compuestos idénticos en diferentes muestras. Para reducir el efecto de pérdida de muestra en el proceso de su preparación, se empleó una normalización global, teniendo en cuenta la suma total de todas las áreas de los picos extraídos de todos los péptidos y las transiciones a través de los replicados de cada muestra. Se realizó un análisis estadístico multivariante no supervisado utilizando el análisis del componente principal (PCA), para comparar los datos entre las muestras, empleando el método pareto. El área de pico de MS promedio para cada proteína, se obtuvo de las repeticiones de SWATH-MS para cada muestra y el análisis por prueba t de Student con el software Marker View, para comparar entre las muestras según las sumas de área promediadas de todas las transiciones derivadas para cada proteína. La prueba t, que dará un valor p como resultado, indicará cómo cada variable distingue a los dos grupos. Por último, para cada librería se seleccionó su conjunto de proteínas expresadas diferencialmente ($p < 0,05$) con un aumento o disminución de 1,5 veces.

Análisis bioinformático

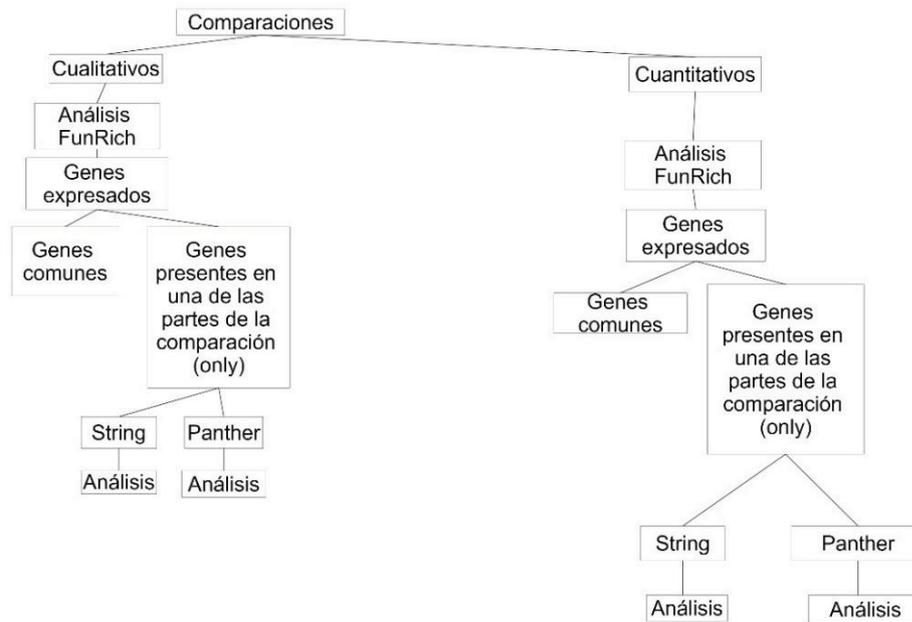


Figura 12. Resumen de los métodos bioinformáticos utilizados en este trabajo. En la imagen se recoge el procedimiento seguido con los programas bioinformáticos (FunRich, String y Panther) para llevar a cabo los análisis.

Preparación de las bases de datos (databases) y conjunto de datos (datasets) de FunRich

Lo primero que hice fue descargar las bases de datos revisadas de la especie *Escherichia coli* y de la cepa K12 de *Escherichia coli* de la página UniProt (<https://www.uniprot.org/>), y las incluí en el programa FunRich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015). A continuación, y con el programa Excel, extraje los códigos de las proteínas (UniProt accession) identificadas con la espectrometría de masas con un 99% de seguridad. Además, eliminé las proteínas identificadas como “REVERSED”, ya que podrían ocasionar problemas en los posteriores análisis con los programas bioinformáticos (FunRich, String y Panther). Después, añadí los conjuntos de datos a FunRich empleando como base de datos la de la especie *Escherichia coli* de UniProt. Como partía de 3 replicados biológicos para 926 día 1 logarítmico y otros 3 replicados biológicos para WT día 1 logarítmico generé 6 conjuntos de datos (datasets), uno por cada replicado.

Obtención de los símbolos de los genes (gene symbol) y de los genes comunes y genes only en FunRich

En el momento en el que ya tuve mis datasets, llevé a cabo la conversión de los códigos de las proteínas a los símbolos de los genes. Para conseguirlo, utilicé la opción de conversión (ID Conversion) de FunRich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015), mediante la cual transformé los UniProt accession a Gene symbol. Cuando terminé la conversión, guardé en la carpeta “Todos los gene symbol” los archivos Excel con la información de la equivalencia entre cada UniProt accession con cada Gene symbol. Además, creé seis nuevos conjuntos de datos con la información de los símbolos de los genes. A continuación, cambié la base de datos de la especie entera de *Escherichia coli* por la de la cepa K12 de *Escherichia coli*.

Al realizar la conversión de la base de datos hay algunos genes que no se identificaron y que se guardaron en archivos Excel dentro de la carpeta “Genes no identificados con cepa K12”.

Nota importante: Los análisis con FunRich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015) se hacen con la cepa de K12 de *Escherichia coli* como base de datos. Por lo tanto, hay algunos genes que no se identifican (genes identificados con la cepa K12 de *Escherichia coli*= Todos los gene symbol – genes no identificados con la cepa K12 de *Escherichia coli*), y en consecuencia, no aparecerán en los análisis. En FunRich se trabaja con esta cepa, en lugar de con toda la especie, para evitar la redundancia en los datos de proteómica.

Más tarde, tuvo lugar la obtención de los genes comunes y los genes “only”, que se consiguió siguiendo el siguiente procedimiento:

Se realizaron 2 diagramas de Venn, comparando por un lado los 3 replicados biológicos de 926 día 1 logarítmico y por otro lado los 3 replicados biológicos de WT día 1 logarítmico. De estos diagramas se obtuvieron los genes comunes a los 3 replicados biológicos de 926 día 1 logarítmico y a los 3 replicados biológicos de WT día 1 logarítmico, respectivamente, y se crearon 2 nuevos datasets con ellos. Estos 2 conjuntos de datos se compararon en un nuevo diagrama de Venn, del que se obtuvieron 2 datasets de genes “only” (926 y WT, respectivamente) y 1 dataset de genes comunes.

Análisis con FunRich, String y Panther

En FunRich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015) se compararon los genes comunes a los 3 replicados biológicos de 926 día 1 logarítmico, con los 3 replicados biológicos de WT día 1 logarítmico, con el fin de observar las posibles contribuciones de componentes celulares, funciones moleculares, procesos biológicos y dominios proteicos al fenotipo.

Tanto en String (Szklarczyk et al., 2019; von Mering et al., 2005) como en Panther (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018) se utilizaron los datasets de genes only (926 y WT) obtenidos a partir del diagrama de Venn en el que se comparaban los genes comunes de 926 con los genes comunes de WT.

En String (Szklarczyk et al., 2019; von Mering et al., 2005) introduce por separado los genes only para 926 y WT, y realicé una búsqueda para el organismo *Escherichia coli*. Esta búsqueda me dividió los resultados en 7 cepas de *Escherichia coli*. Después, analicé cada cepa por separado y obtuve la información de los genes mapeados para cada una. A continuación, obtuve la red de los genes de cada cepa, observé las interacciones que tienen lugar entre ellos con una

seguridad muy alta (90% y superior), e identifiqué los diferentes enriquecimientos funcionales y los genes que estaban implicados en cada uno de ellos. Por último, descargué toda la información que me dio la red y la guardé en la carpeta de su cepa correspondiente.

En Panther (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018) llevé a cabo tres análisis diferentes (Clasificación funcional vista en una lista de genes, clasificación funcional vista en gráficos y la prueba (test) de sobrerrepresentación estadística) utilizando los genes only para 926 y WT teniendo como organismo de búsqueda *Escherichia coli*.

Con la clasificación funcional vista en una lista de genes se obtuvo información individual de los genes entre la que se incluye el nombre de los genes, la familia/subfamilia y su clase proteica.

En la clasificación funcional vista en gráficos se analizaron las funciones moleculares, procesos biológicos, componentes celulares, clases de proteínas y rutas metabólicas y se representaron los resultados en forma de gráfico de barras.

En el test de sobrerrepresentación se compararon los genes “only” para 926 y WT con una lista de referencia (todos los genes de *Escherichia coli* en las bases de datos), empleando un test de Fisher y la corrección de Bonferroni para múltiples muestras. Los análisis que se llevaron a cabo en esta comparación fueron las funciones moleculares, procesos biológicos, componentes celulares y rutas metabólicas, y extraje la información de infrarrepresentación y sobrerrepresentación de mis genes “only” respecto a la lista de referencia en archivos de texto e imágenes.

Estudios estructurales

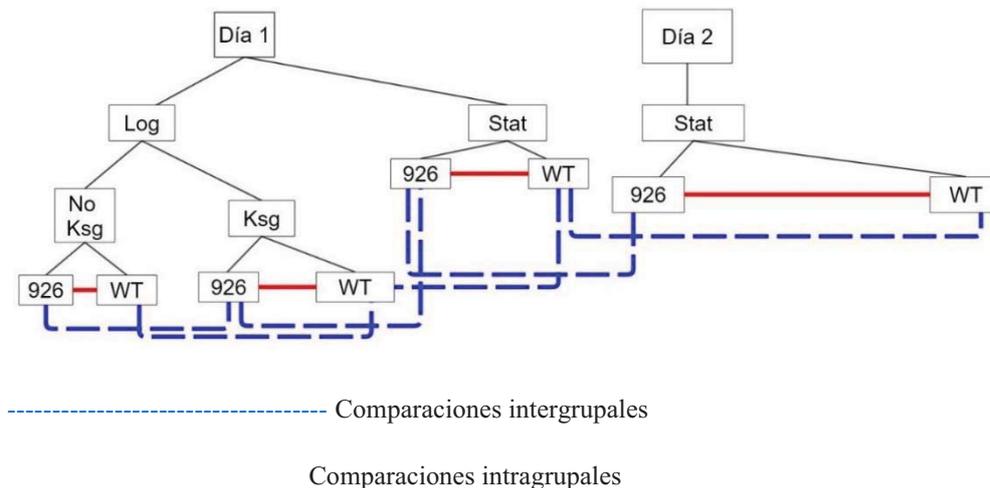
Realizado por el Dr. Vila-Sanjurjo. Las estructuras de cryo-EM de los complejos de trans-traducción (SmpB-ARNtm) acomodado y translocado de *Thermus thermophilus* (RCSB IDs: 3IYQ y 3IYR; resolución, 13Å) (Weis et al., 2010), así como sus respectivos mapas de densidad electrónica fueron sobre impuestos sobre la estructura de resolución casi atómica (2.9Å) del ribosoma 70S de *E. coli* en complejo con el factor de elongación EF-Tu (RCSB ID: 5AFI) (Fischer et al., 2015). Para ello se utilizó la función Matchmaker de Chimera UCSF (Pettersen et al., 2004), aprovechando el mimetismo molecular existente entre la molécula de ARNtm y la mitad superior de la molécula de ARNt. El ARNt del sitio P de la estructura 5AFI fue utilizado como cadena de referencia para superponer el complejo translocado de SmpB-ARNtm (3IYR).

RESULTADOS

Cuando comencé este TFM ya habían tenido lugar la preparación de los cultivos bacterianos en el laboratorio, el preprocesamiento y análisis de las muestras en el espectrómetro de masas, y el preprocesamiento de los espectros de masas para su análisis bioinformático. Por esta razón, en este apartado se recogen los resultados de los análisis con los programas bioinformáticos, así como su organización mediante un sistema de carpetas, ya que fueron las partes de este proyecto que yo llevé a cabo.

Diseño del proyecto

El trabajo aquí descrito es parte de un proyecto mayor destinado a la caracterización del fenotipo cruzado de pérdida de resistencia causado por mutaciones en la posición 926 del ARNr 16S de *E. coli*.



Log: Fase logarítmica del crecimiento

Stat: Fase estacionaria del crecimiento

Figura 13. Diseño del proyecto parte 1. En este diagrama se representan los días y las condiciones en los que fueron tomadas las células de la cepa silvestre (WT) y la cepa mutante (926). Además, se señalan las comparaciones intragrupalas (926 y WT tomadas en la misma condición) mediante la línea roja continua, y las comparaciones intergrupales (926 tomadas en dos condiciones diferentes y WT tomadas en dos condiciones diferentes) utilizando la línea azul discontinua. Con el uso del espectrómetro de masas obtenemos datos cualitativos y cuantitativos de nuestras células.

Tras realizar unas pruebas preliminares para familiarizarse con las herramientas de bioinformática, *Funrich* (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015), *String* (Szklarczyk et al., 2019; von Mering et al., 2005) y *Panther* (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018) y entender el tipo de

datos generados por dichas herramientas, procedimos a hacer un análisis exhaustivo de los datos cualitativos de la comparación WT día 1 logarítmico vs 926 día 1 logarítmico.

Organización de las carpetas de datos

Debido a la vasta cantidad de información obtenida a partir de los análisis con los programas bioinformáticos, se hizo imprescindible la organización de todos los datos en un sistema por niveles de carpetas (Figura 14). De esta manera se logró tener todos los resultados organizados y fácilmente localizables, tanto para su consulta como para su utilización en posteriores análisis más concretos. Otra de las ventajas que presenta esta clasificación, es que permite incluir resultados de nuevos análisis, no realizados hasta el momento, en el árbol de carpetas. Esto se resume en la Figura 14.

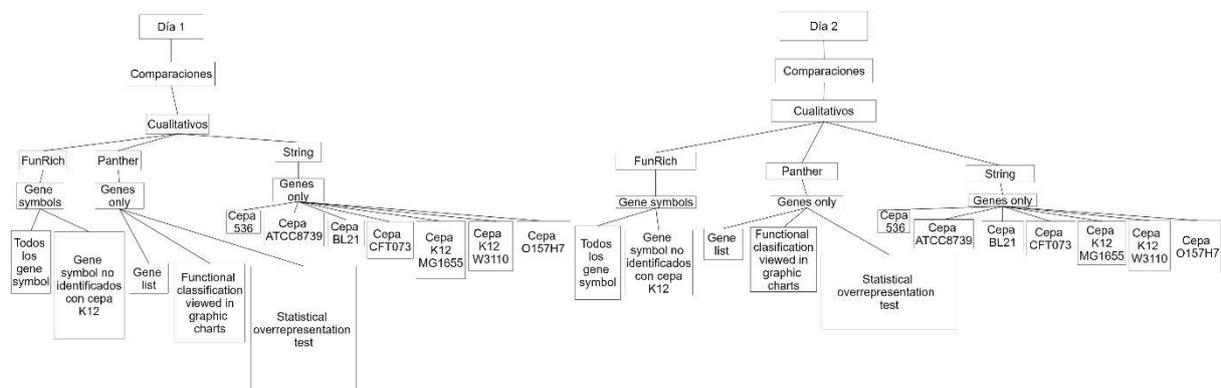


Figura 14. Sistema de carpetas. En la imagen se ilustra el ordenamiento de los datos mediante su clasificación en 7 niveles de carpetas.

Análisis bioinformático con *FunRich*

Los diagramas de Venn de la Figura 15 nos muestran que tanto los 3 replicados biológicos de 926 como los 3 replicados biológicos de WT son bastante homogéneos, ya que la mayoría de los genes son compartidos por los 3 replicados, 773 genes en 926 de un total de 1099 y 854 genes en WT de un total de 1123 genes (Figura 15). Llamaremos a estos subgrupos de genes, subgrupos comunes.

En el diagrama de Venn de la Figura 16, que contiene los genes comunes se observa que la mayoría de genes están compartidos (740 genes) y que unos pocos genes son exclusivos de 926 (33 genes) y otros pocos sólo se encuentran en WT (114 genes) (Figura 16). Llamaremos a estos últimos genes “only”.

Tras realizar las comparaciones en *Funrich* (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015) procedemos a comparar las posibles contribuciones de componentes celulares, funciones moleculares,

procesos biológicos y dominios proteicos al fenotipo bajo estudio. Como se puede ver en la Figura 17, no se detectan grandes diferencias.

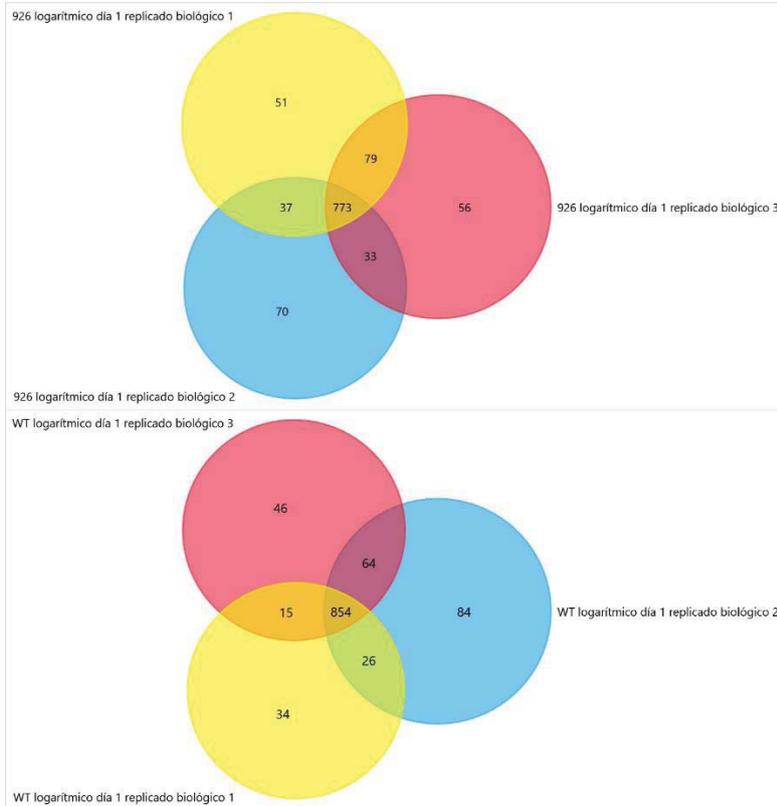


Figura 15. Diagramas de Venn de los 3 replicados biológicos de 926 día 1 log (arriba) y de los 3 replicados biológicos de WT día 1 log (abajo). Cada círculo representa los genes presentes en cada replicado biológico. Los genes comunes presentes en los 3 replicados biológicos se encuentran en la zona en la que se solapan los 3 círculos. En la imagen, se indican tanto el número de genes exclusivos de un replicado, en la zona en la que no se solapan con los otros replicados, como el de los genes comunes, en las zonas de solapamiento.

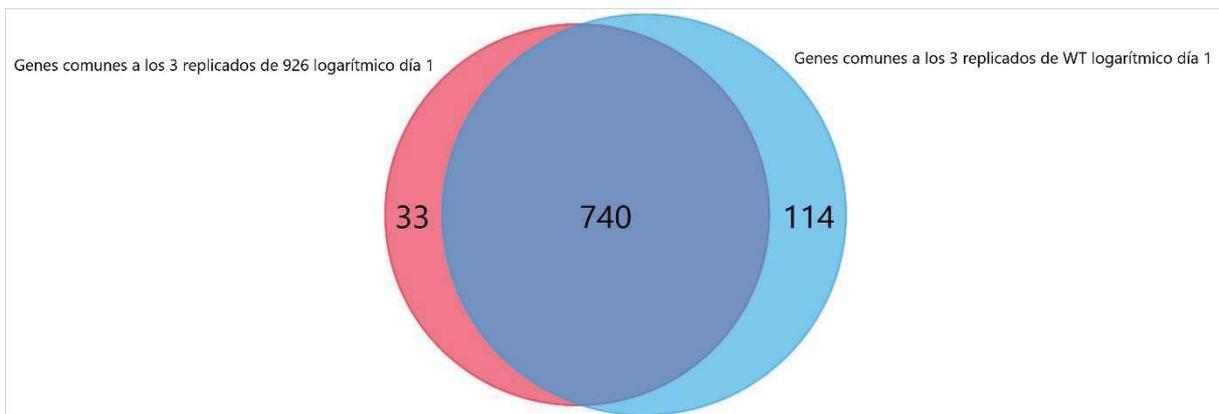


Figura 16. Diagrama de Venn generado con los genes comunes.

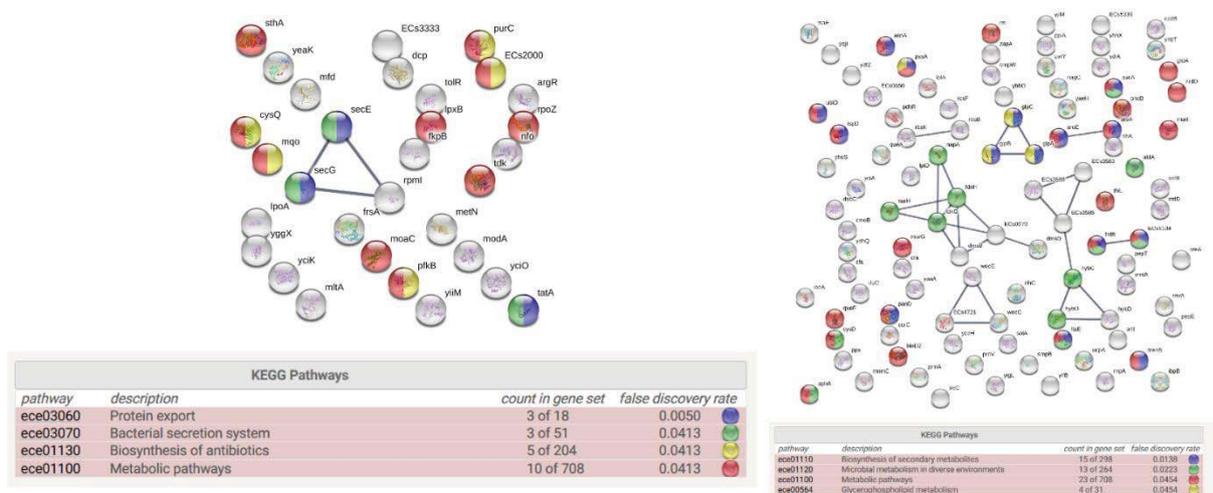


Figura 18. Análisis KEGG Pathways de los genes comunes a los 3 replicados biológicos 926 día 1 logarítmico only (izquierda) y los genes comunes a los 3 replicados biológicos WT día 1 logarítmico only (derecha) para la cepa O157H7 de *Escherichia coli*. Todos los genes que pertenecen al mismo subgrupo del KEGG Pathways se representan con el mismo color. Las líneas oscuras que unen los círculos representan las interacciones entre los genes de nuestra red con una seguridad del 90% o superior (0,900/1). En la tabla de KEGG Pathways se recogen para cada subgrupo la ruta metabólica, la descripción, el número de genes de la red respecto a los de toda la cepa y el porcentaje de error (false discovery rate).

Análisis bioinformático con Panther

El último análisis bioinformático lo llevé a cabo con el programa Panther (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018), que me permitió observar los genes “only” para 926 y WT clasificados funcionalmente. Además, pude obtener información más detallada de estos genes individualmente. En el programa *Panther* obtengo los siguientes resultados:

-En el análisis de los procesos biológicos de mis redes de genes de 926 y WT los procesos mayoritarios son los metabólicos y los celulares.

Los genes *yggX* e *ydbK* de la red de 926 y los genes *ynjE* e *yaaA* de la red WT están implicados en la respuesta a estímulos.

Los genes *ltaE* e *nagC* de la red WT están implicados en la regulación biológica.

-En el análisis de las clases de proteínas de mis redes de genes de 926 y WT las clases mayoritarias son las hidrolasas, las transferasas y las oxidorreductasas (Figura 19).

El gen *argR* de la red 926 y los genes *cra*, *nagC*, *uvrY* y *pdhR* de la red WT son factores que participan en la transcripción.

Los genes *nfo* y *mfd* de la red 926 y los genes *nrdD*, *yheS* y *selB* participan en la unión de ácidos nucleicos.

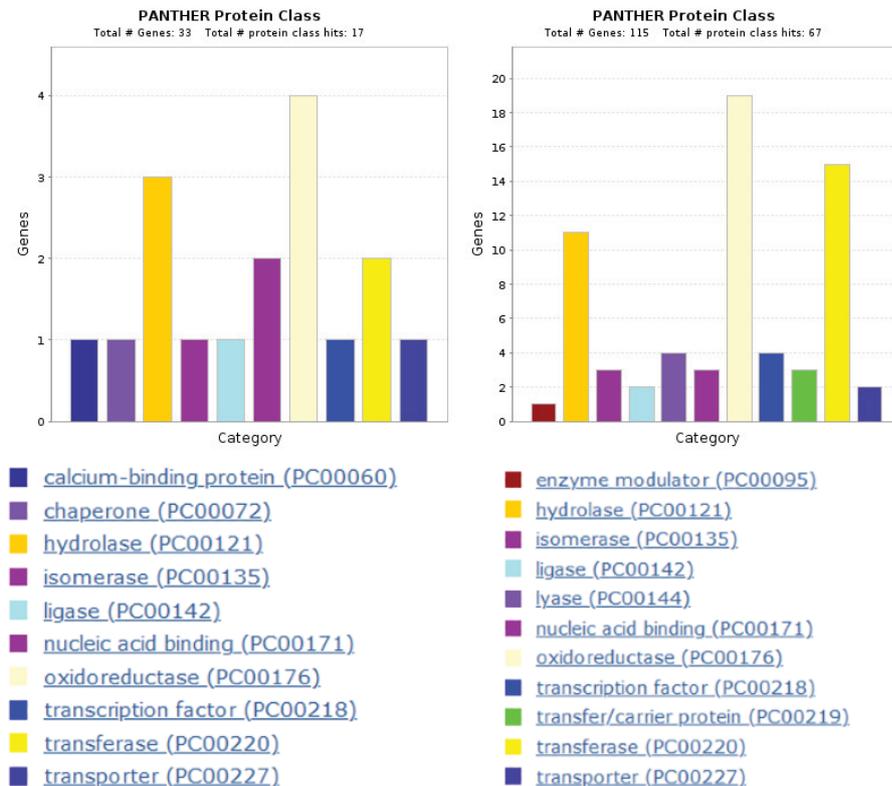


Figura 19. Análisis Protein class de los genes comunes a los 3 replicados biológicos de 926 día 1 logarítmico (izquierda) y los 3 replicados biológicos de WT día 1 logarítmico only (derecha) de *Escherichia coli*. En el gráfico se representan el número total de genes de la red y el número de genes incluidos en las clases de proteínas. Las clases de proteínas y el número de genes se indican con diferentes colores y un gráfico de barras. En la tabla de genes de factores de transcripción se recogen los genes implicados en esta clase, al igual que en la tabla de genes de unión de ácidos nucleicos, en la que se incluyen los genes implicados en esta clase.

***Nota:** Se introducen los 114 gene symbol de Funrich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015). en Panther (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018) y al hacer la clasificación funcional de la lista de genes se obtienen 115 resultados (hits). Esto sucede porque Panther mapea los 114 genes y al buscar en la biblioteca de Panther encuentra este número de resultados. En concreto, *napA* aparece con dos resultados: Periplasmic nitrate reductase y junto a *aphA* como Class B acid phosphatase y *lplA* se encuentra también en otros dos resultados: Lipoate-protein ligase A y Outer-membrane lipoprotein carrier protein.

Análisis estructurales

El análisis bioinformático nos permitió identificar tres proteínas, que podrían estar relacionadas con el fenotipo cruzado de pérdida de resistencia, las proteínas codificadas por los genes *rpoZ*, *smpB* y *selB*. Estas proteínas se extrajeron de los datasets only (926 y WT) obtenidos gracias al programa FunRich (Pathan et al., 2017; Pathan et al., 2015). Los 3 genes (*rpoZ*, *smpB* y *selB*)

se introdujeron en Panther (Mi et al., 2019; Mi et al., 2018) para obtener información más detalladas acerca de ellos. El análisis en este programa nos dio la siguiente información: el gen *rpoZ* es nombrado como “DNA-directed RNA polymerase subunit omega”; el gen *smpB* es nombrado como “SsrA- binding protein smpB”, es clasificado respecto a su clase proteica como un factor de traducción y la proteína que codifica participa en el proceso de la traducción; y el gen *selB* es nombrado como “ Selenocysteine specific elongation factor selB”, es clasificado respecto a su clase proteica como un factor iniciador de la traducción y la proteína que codifica participa en la traducción, tiene la función molecular de unión (binding), y en el análisis de componentes celulares se encontró en la célula y como parte de la célula.

El gen *rpoZ* está presente en el mutante 926 y ausente en WT, mientras que los genes *smpB* y *selB* se encuentran en WT y no en 926. El gen *rpoZ* codifica la subunidad omega de la ARN polimerasa bacteriana (ARNpol), que tiene un papel importante en la respuesta al estrés (ver discusión). El gen *selB* codifica el factor de elongación de la traducción SelB, que es homólogo al factor de elongación Tu (EF-Tu) (Soler et al., 2007).

Estudios genéticos, cinéticos y bioquímicos de SelB de *E. coli* sugirieron que los cambios en la conformación de SelB, tales como la comunicación entre ARNm y los sitios de unión de ARNt, son esenciales para la incorporación de selenocisteína (Soler et al., 2007). Se ha observado que mutaciones en los residuos del ARNr 16S C1100 y G1516 mostraron un incremento en la incorporación de selenocisteína (Thyer et al., 2013). Cuando visualizamos la posición de estos residuos en la estructura de la subunidad pequeña bacteriana, vemos que todos los residuos se hallan bastante alejados de la posición 926, excepto 1516, que se halla a algo más de 21Å (Figura 20A).

El gen *smpB* produce una proteína esencial para la trans-traducción. Dado que el ciclo de la trans-traducción consta de un paso en el que el complejo SmpB/ARNtm se transloca al sitio P del ribosoma (Weis et al., 2010), decidimos investigar la relación estructural entre la posición 926 y SmpB. La Figura 20B nos muestra cómo se establece la mímica molecular entre el ARNt del sitio P (representación de superficie, beige) y el complejo translocado ARNtm-SmpB (representación de bucle, cian y azul oscuro, respectivamente). Además, se observa que la distancia entre la posición 926 y SmpB es de 5,93Å, lo cual convierte a esta proteína en una buena candidata para explicar el fenotipo de las mutaciones ribosómicas en este residuo.

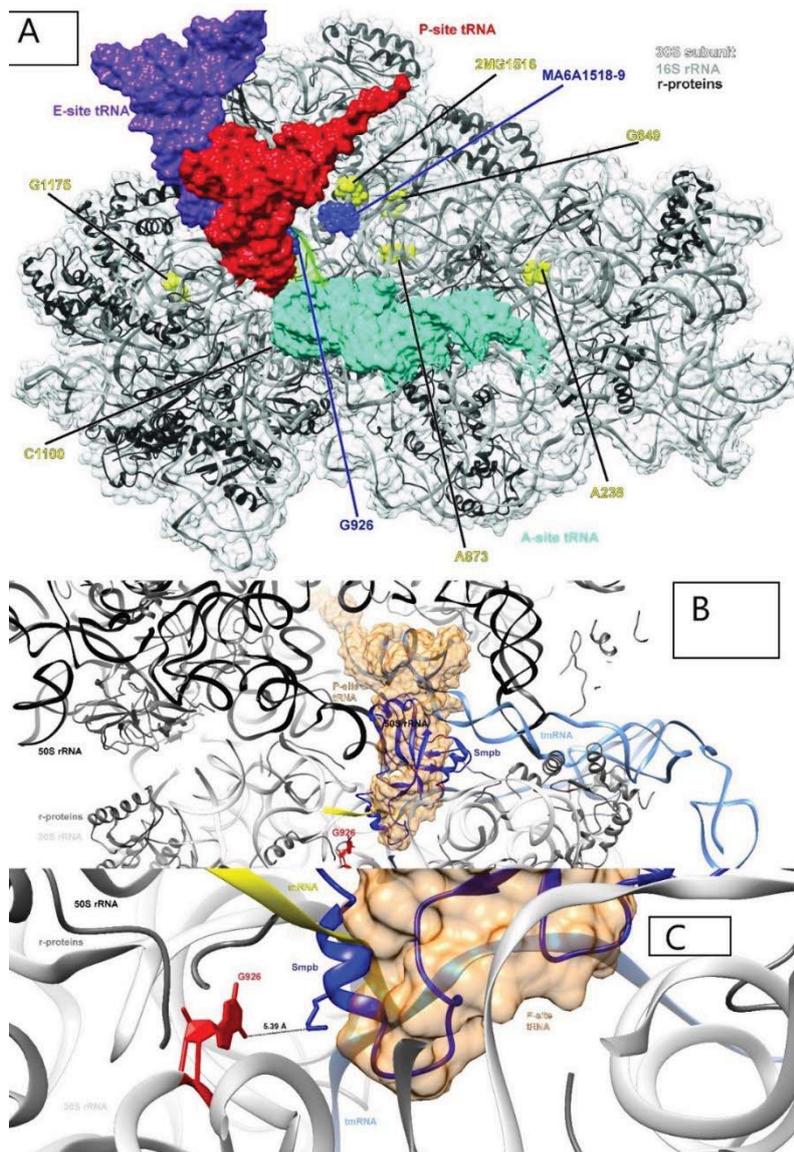


Figura 20A. Mutaciones de ARNr 16S relacionadas con la incorporación de selenocisteína. En la imagen se pueden observar los ARNt de los sitios E, P y A (colores morado, rojo y cian, respectivamente), la subunidad 30S del ribosoma (color blanco), el ARNr 16S (color gris), la posición G926 del ribosoma (color azul cobalto), la mutación MA6A1518-9 (color índigo) y otras mutaciones del ARNr (color amarillo).

B Representación de la localización del ARNtm y la proteína SmpB respecto al ARNt del sitio P en *E. coli*. El ARNtm se representa como modelo de bucles en cian, la proteína SmpB en azul oscuro y el ARNt del sitio P en color beige. Además, se muestran las subunidades 50S (negro) y 30S (gris claro) y G926 (rojo).

C. Localización de la proteína SmpB respecto a la posición G926 del ribosoma bacteriano. La distancia entre G926 y SmpB está indicada por medio de una línea discontinua.

DISCUSIÓN

El gen *relA* es el encargado de codificar la proteína RelA, que se activa en una situación estresante (como la falta de nutrientes) para llevar a cabo la síntesis de ppGpp, una alarmona. Este compuesto se une en la zona que comunica las subunidades β' y omega de la ARNpol. La ARN pol es la enzima llave en la transcripción, y su cuerpo está compuesto por subunidades alfa, beta, beta prima y omega (*rpoZ*) en la estequiometría de $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Todas las subunidades de la ARNpol son esenciales en las bacterias excepto por la subunidad más pequeña ω . La eliminación del gen *rpoZ* no es letal y no hay efecto significativo en el crecimiento bacteriano. Sin embargo, su ausencia presenta otros efectos como son: el retraso en la recuperación de los nutrientes en comparación con la cepa silvestre en una situación prolongada de falta de nutrientes; la deficiencia en la formación de biofilms en un medio mínimo; y la presentación de

un perfil lipídico alterado. Es por esta razón por la que los procesos de respuesta al estrés y de la transcripción en bacterias se encuentran relacionados, con un papel importante para el gen *rpoZ* y ppGpp (Bhardwaj et al., 2018; Gropp et al., 2001).

En dos cepas con una situación de falta de nutrientes, tanto la que presenta la ausencia del gen *rpoZ* ($\Delta rpoZ$) como la que carece del gen *relA* ($\Delta relA$) provocan que aumente el tiempo para recuperar el crecimiento en la cepa. Este efecto es más notorio en la cepa $\Delta relA$ que en la cepa $\Delta rpoZ$, lo que insinúa que estos dos genes son necesarios para la recuperación del crecimiento a partir de una situación de falta de nutrientes, con una mayor importancia para *relA* (Bhardwaj et al., 2018).

CONCLUSIONES

-Durante el día 1 de la fase logarítmica la mayoría de las proteínas expresadas son comunes a WT y 926. Hay unas pocas proteínas que se expresan en WT y no en 926 y otras pocas que se expresan en 926 y no en WT.

-Queda la incógnita de posibles vías por las que el fenotipo se está traduciendo. Se han encontrado 2 proteínas presentes en WT y no presentes en 926 (*smpB* y *selB*), y 1 proteína presente en 926 y no presente en WT (*rpoZ*) que pensamos que pueden ser posibles candidatos para explicar parte del fenotipo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Wilson, J. H., & Hunt, T. (2010). *Biología molecular de la célula* (5th ed.). Barcelona: Omega.
2. Álvarez, J. V., Bravo, S. B., García-Vence, M., De Castro, M. J., Luzardo, A., Colón, C., . . . Couce, M. L. (2019). Proteomic analysis in morquio A cells treated with immobilized enzymatic replacement therapy on nanostructured lipid systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4610. doi: 10.3390/ijms20184610. doi:10.3390/ijms20184610 [doi]
3. Asai, T., Zaporozets, D., Squires, C., & Squires, C. L. (1999). An escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 1971-1976. doi:10.1073/pnas.96.5.1971 [doi]
4. Bhardwaj, N., Syal, K., & Chatterji, D. (2018). The role of ω -subunit of escherichia coli RNA polymerase in stress response. *Genes to Cells*, 23(5), 357-369. doi:10.1111/gtc.12577
5. Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L., & Tzareva, N. V. (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Research*, 19(1), 155-162. doi:10.1093/nar/19.1.155
6. Bonzon-Kulichenko, E., Pérez-Hernández, D., Núñez, E., Martínez-Acedo, P., Navarro, P., Trevisan-Herraz, M., . . . Vázquez, J. (2011). A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by ^{18}O labeling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), M110.003335. doi:10.1074/mcp.M110.003335
7. Brock, T. D., Madigan, M. T., Guerrero, R., & Ruiz Berraquero, F. (2009). *Biología de los microorganismos* (12th ed.). Madrid etc: Pearson-Addison Wesley.

8. CANONACO, M. A., GUALERZI, C. O., & PON, C. L. (1989). Alternative occupancy of a dual ribosomal binding site by mRNA affected by translation initiation factors. *European Journal of Biochemistry*, 182(3), 501-506. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14856.x
9. Carballido, 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*
10. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802), 340-348. doi:10.1038/35030019
11. Cassan, M., Berteaux, V., Angrand, P. -, & Rousset, J. -. (1990). Expression vectors for quatitating in vivo translational ambiguity: Their potential use to analyse frameshifting at the HIV gag-pol junction. *Research in Virology*, 141(6), 597-610. doi:[https://doi.org/10.1016/0923-2516\(90\)90033-F](https://doi.org/10.1016/0923-2516(90)90033-F)
12. Comparación de los ribosomas de las células procarióticas y eucarióticas. Retrieved from <https://docplayer.es/docs-images/76/73197835/images/4-1.jpg>
13. Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Wright, N. (2010). *La célula* (5th ed.). Madrid: Marbán.
14. Couselo-Seijas, M., López-Canoa, J. N., Agra-Bermejo, R., Díaz-Rodríguez, E., Fernandez, A. L., Martinez-Cereijo, J., . . . Eiras, S. (2019). Cholinergic activity regulates the secretome of epicardial adipose tissue: Association with atrial fibrillation. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 10512-10522. doi:10.1002/jcp.27723
15. Cundliffe, E. (1981). Antibiotic inhibitors of ribosome function. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, , 402-545.
16. Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA. *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*, , 479-490.
17. Curva de crecimiento bacteriano. Retrieved from https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/12/Curva_crecimiento_bacteriano.png
18. del Pilar Chantada-Vázquez, M., López, A. C., Bravo, S. B., Vázquez-Estévez, S., Acea-Nebril, B., & Núñez, C. (2019). *Proteomic analysis of the bio-corona formed on the surface of (au, ag, pt)-nanoparticles in human serum* doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.056>
19. del Pilar Chantada-Vázquez, M., López, A. C., Vence, M. G., Vázquez-Estévez, S., Acea-Nebril, B., Calatayud, D. G., . . . Núñez, C. (2020). *Proteomic investigation on bio-corona of au, ag and fe nanoparticles for the discovery of triple negative breast cancer serum protein biomarkers* doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103581>
20. Dong, J., Nanda, J. S., Rahman, H., Pruitt, M. R., Shin, B., Wong, C., . . . Hinnebusch, A. G. (2008). Genetic identification of yeast 18S rRNA residues required for efficient recruitment of initiator tRNAMet and AUG selection. *Genes & Development*, 22(16), 2242-2255.
21. Fabbretti, A., Schedlbauer, A., Brandi, L., Kaminishi, T., Giuliodori, A. M., Garofalo, R., . . . Fucini, P. (2016). Inhibition of translation initiation complex formation by GE81112 unravels a 16S rRNA structural switch involved in P-site decoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), E2286-E2295. doi:10.1073/pnas.1521156113
22. Feduchi Canosa, E., & García-Hoz Jiménez, C. (2010). *Bioquímica : Conceptos esenciales* (1st ed.). Buenos Aires ;; Editorial Médica Panamericana.
23. File, T. M., Jr. (2002). Appropriate use of antimicrobials for drug-resistant pneumonia: Focus on the significance of β -Lactam—Resistant streptococcus pneumoniae. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement_1), S17-S26. doi:10.1086/324526
24. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., & Stark, H. (2015). Structure of the E. coli ribosome-EF-tu complex at $<3\text{\AA}$ resolution by cs-corrected cryo-EM. *Nature*, 520(7548), 567-570. doi:10.1038/nature14275
25. Fundación instituto de investigación sanitaria de santiago de compostela. Retrieved from <http://www.fundacionidisantiago.es/plataformas/plataforma-de-proteomica/>
26. GIUDICE, E., MACE, K., & GILLET, R. (2014). Trans-translation exposed: Understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Frontiers in Microbiology*, 5, 113.

27. GIULIODORI, A. M., GUALERZI, C. O., SOTO, S., VILA, J., & TAVÍO, M. M. (2007). Review on bacterial stress topics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(1), 95-104. doi:10.1196/annals.1391.008
28. Goldstein, J., Pollitt, N. S., & Inouye, M. (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(1), 283. doi:10.1073/pnas.87.1.283
29. González, S. (2016). *Implicación del ribosoma bacteriano en respuesta al estrés*
30. Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., & Glaser, G. (2001). Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 570-579. doi:10.1128/JB.183.2.570-579.2001
31. HAMADA, M., HASHIMOTO, T., TAKAHASHI, T., YOKOYAMA, S., MIYAKE, M., TAKEUCHI, T., . . . UMEZAWA, H. (1965). Antimicrobial activity of kasugamycin. *The Journal of Antibiotics*, 18, 104-106.
32. Hartz, D., Binkley, J., Hollingsworth, T., & Gold, L. (1990). Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. *Genes & Development*, 4(10), 1790-1800. doi:10.1101/gad.4.10.1790 [doi]
33. Häuser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., Naeve, F., . . . Uetz, P. (2012). RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002815. doi:10.1371/journal.pgen.1002815 [doi]
34. 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(35), 12-14. doi:10.1038/newbio233012a0
35. HELSER, T. L., DAVIES, J. E., & DAHLBERG, J. E. (1972). Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nature New Biology*, 235(53), 6-9. doi:10.1038/newbio235006a0
36. Hermida-Nogueira, L., Barrachina, M. N., Izquierdo, I., García-Vence, M., Lacerenza, S., Bravo, S., . . . García, Á. (2020). *Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion* doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103529>
37. Himeno, H., Kurita, D., & Muto, A. (2014). tmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell. *Frontiers in Genetics*, 5, 66.
38. Hussain, T., Llácer, J. L., Wimberly, B. T., Kieft, J. S., & Ramakrishnan, V. (2016). Large-scale movements of IF3 and tRNA during bacterial translation initiation. *Cell*, 167(1), 133-144.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.08.074
39. Hussain, T., Llácer, J., Fernández, I., Munoz, A., Martin-Marcos, P., Savva, C., . . . Ramakrishnan, V. (2014). Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex. *Cell*, 159(3), 597-607. doi:10.1016/j.cell.2014.10.001
40. Ishigami, J., Fukuda, Y., & Hara, S. (1967). Clinical use of kasugamycin for urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antibiotics. Ser. B*, 20(2), 83-84.
41. Izquierdo, I., Rosa, I., Bravo, S. B., Guitián, E., Pérez-Serra, A., Campuzano, O., . . . Toro, R. (2016). *Proteomic identification of putative biomarkers for early detection of sudden cardiac death in a family with a LMNA gene mutation causing dilated cardiomyopathy* doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.020>
42. Khusainov, I., Fatkhullin, B., Pellegrino, S., Bikkullin, A., Liu, W., Gabdulkhakov, A., . . . Yusupov, M. (2020). Mechanism of ribosome shutdown by RsfS in *Staphylococcus aureus* revealed by integrative structural biology approach. *Nature Communications*, 11(1), 1656. doi:10.1038/s41467-020-15517-0
43. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C., Mensua Fernández, J. L., Bueno i Torres, D., & Ward, S. W. (2006). *Conceptos de genética* (8th ed.). Madrid etc: Pearson Prentice Hall.
44. Kozak, M. (2005). *Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes* doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.037>
45. La Teana, A., Gualerzi, C. O., & Brimacombe, R. (1995). From stand-by to decoding site. adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA (New York, N.Y.)*, 1(8), 772-782.
46. Land, M., Hauser, L., Jun, S., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T., . . . Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), 141-161. doi:10.1007/s10142-015-0433-4

- 47.Landels, A., Evans, C., Noirel, J., & Wright, P. C. (2015). *Advances in proteomics for production strain analysis* doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.001>
- 48.Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 101-123. doi:10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005
- 49.Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2010). Comparison of 61 sequenced escherichia coli genomes. *Microbial Ecology*, 60(4), 708-720. doi:10.1007/s00248-010-9717-3
- 50.Luo, Y., Mok, T. S., Lin, X., Zhang, W., Cui, Y., Guo, J., . . . Wang, T. (2017). SWATH-based proteomics identified carbonic anhydrase 2 as a potential diagnosis biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *Scientific Reports*, 7(1), 41191. doi:10.1038/srep41191
- 51.Maio, A., Brandi, L., Donadio, S., & Gualerzi, O. C. (2016). The oligopeptide permease opp mediates illicit transport of the bacterial P-site decoding inhibitor GE81112. *Antibiotics*, 5(2) doi:10.3390/antibiotics5020017
- 52.Masukawa, H., Tanaka, N., & Umezawa, H. (1968). Inhibition by kasugamygin of protein synthesis in piricularia oryzae. *The Journal of Antibiotics*, 21(1), 73-74.
- 53.Mato, J. (2013). *El papel del ribosoma en la resistencia cruzada inducida por estrés*
- 54.Meyer, J. G., & Schilling, B. (2017). Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(5), 419-429. doi:10.1080/14789450.2017.1322904 [doi]
- 55.Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X., & Thomas, P. D. (2019). Protocol update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols*, 14(3), 703-721. doi:10.1038/s41596-019-0128-8 [doi]
- 56.Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., & Thomas, P. D. (2018). PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D419-D426. doi:10.1093/nar/gky1038
- 57.Moazed, D., & Noller, H. F. (1990). Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 211(1), 135-145.
- 58.Moll, I., & Bläsi, U. (2002). Differential inhibition of 30S and 70S translation initiation complexes on leaderless mRNA by kasugamycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), 1021-1026.
- 59.Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger principios de bioquímica* (5th ed.). Barcelona: Omega.
- 60.Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C., Gangoda, L., Quek, C. Y. J., Williamson, N. A., . . . Mathivanan, S. (2015). FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 15(15), 2597-2601. doi:10.1002/pmic.201400515
- 61.Pathan, M., Keerthikumar, S., Chisanga, D., Alessandro, R., Ang, C., Askenase, P., . . . Mathivanan, S. (2017). A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1321455. doi:10.1080/20013078.2017.1321455
- 62.Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., . . . Yáñez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11649-11661. doi:10.1074/jbc.M112.445304 [doi]
- 63.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. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- 64.Pierce, B. A. (2005). *Genética : Un enfoque conceptual* (2nd ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- 65.Poldermans, B., Goosen, N., & Van Knippenberg, P. H. (1979). Studies on the function of two adjacent N6,N6-dimethyladenosines near the 3' end of 16 S ribosomal RNA of escherichia coli. I. the effect of kasugamycin on initiation of protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(18), 9085-9089.
- 66.Radhouani, H., Pinto, L., Poeta, P., & Igrejas, G. (2012). *After genomics, what proteomics tools could help us understand the antimicrobial resistance of escherichia coli?* doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.035>

67. Schlunzen, F., Takemoto, C., Wilson, D. N., Kaminishi, T., Harms, J. M., Hanawa-Suetsugu, K., . . . Fucini, P. (2006). The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(10), 871-878. doi:10.1038/nsmb1145
68. Schuwirth, B. S., Day, J. M., Hau, C. W., Janssen, G. R., Dahlberg, A. E., Cate, J. H., & Vila-Sanjurjo, A. (2006). Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(10), 879-886. doi:nsmb1150 [pii]
69. Sciex the power of precision. Retrieved from <https://sciex.com/products/software/proteinpilot-software>
70. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, *68*(5), 850-858. doi:10.1021/ac950914h
71. Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., . . . Schaeffer, D. A. (2007). The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, *6*(9), 1638-1655. doi:10.1074/mcp.T600050-MCP200
72. Srivatsan, A., & Wang, J. D. (2008). *Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp* doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>
73. Sahara, Y., Maeda, K., Umezawa, H., & Ohno, M. (1966). *Chemical studies on kasugamycin. V. the structure of kasugamycin* doi:[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)99701-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)99701-1) "
74. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., . . . Mering, C. (2018). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131
75. TAKEUCHI, T., ISHIZUKA, M., TAKAYAMA, H., KUREHA, K., HAMADA, M., & UMEZAWA, H. (1965). Pharmacology of kasugamycin and the effect on pseudomonas infection. *The Journal of Antibiotics*, *18*, 107-110.
76. Tamara, C., Nerea, L. B., Susana Belén, B., Aurelio, S., Iván, C., Fernando, S., . . . María, P. (2020). Vesicles shed by pathological murine adipocytes spread pathology: Characterization and functional role of insulin Resistant/Hypertrophied adiposomes. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 2252. doi: 10.3390/ijms21062252. doi:10.3390/ijms21062252 [doi]
77. Tanaka, N., Yoshida, Y., Sashikata, K., Yamaguchi, H., & Umezawa, H. (1966). Inhibition of polypeptide synthesis by kasugamycin an aminoglycosidic antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, *19*(2), 65-68.
78. Tang, W. H., Shilov, I. V., & Seymour, S. L. (2008). Nonlinear fitting method for determining local false discovery rates from decoy database searches. *Journal of Proteome Research*, *7*(9), 3661-3667. doi:10.1021/pr070492f
79. Umezawa, H., Hamada, M., Sahara, Y., Hashimoto, T., & Ikekawa, T. (1965). Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *5*, 753-757.
80. Uniprot. Retrieved from <https://www.uniprot.org/>
81. van Buul, C. P. J. J., Visser, W., & van Knippenberg, P. H. (1984). Increased translational fidelity caused by the antibiotic kasugamycin and ribosomal ambiguity in mutants harbouring the ksgA gene. *FEBS Letters*, *177*(1), 119-124. doi:10.1016/0014-5793(84)80994-1
82. VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA*, *87*(15), 5589. doi:10.1073/pnas.87.15.5589
83. Varela-Rodríguez, B. M., Juiz-Valiña, P., Varela, L., Outeiriño-Blanco, E., Bravo, S. B., Garcia-Brao, M. J., . . . Sangiao-Alvarellos, S. (2020). Beneficial effects of bariatric surgery-induced by weight loss on the proteome of abdominal subcutaneous adipose tissue. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(1) doi:10.3390/jcm9010213
84. Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B., Hau, C. W., & Cate, J. H. D. (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(11), 1054-1059. doi:10.1038/nsmb850
85. Vila-Sanjurjo, A., Squires, C. L., & Dahlberg, A. E. (1999). *Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16 S ribosomal RNA of escherichia coli I* Edited by D. E. Draper doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3160>

- 86.von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., . . . Bork, P. (2005). STRING: Known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research*, *33*(suppl_1), D433-D437. doi:10.1093/nar/gki005
- 87.Weis, F., Bron, P., Giudice, E., Rolland, J. P., Thomas, D., Felden, B., & Gillet, R. (2010). tmRNA-SmpB: A journey to the centre of the bacterial ribosome. *The EMBO Journal*, *29*(22), 3810-3818. doi:10.1038/emboj.2010.252 [doi]
- 88.Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., . . . Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(26), 17020-17024. doi:10.1073/pnas.252529799
- 89.Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., & Noller, H. F. (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *The EMBO Journal*, *10*(10), 3099-3103.
- 90.Yamanaka, K. (1999). Cold shock response in *escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *1*(2), 193-202.
- 91.Yates, J. R. (2013). The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(5), 1629-1640. doi:10.1021/ja3094313
- 92.Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, *106*(2), 233-241. doi:10.1016/S0092-8674(01)00435-4
- 93.Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M., & Yates, J. R. (2013). Protein analysis by Shotgun/Bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, *113*(4), 2343-2394. doi:10.1021/cr3003533

APÉNDICES

Apéndice 1: Organización de carpetas

Para lograr la organización de los datos se colocaron en un sistema jerárquico formado por 7 niveles de carpetas. El contenido de cada nivel es el siguiente:

Nivel 0: Contiene un archivo LEER_estructura_carpetas.doc en el que se explica la organización de las carpetas.

Nivel 1: Incluye la clasificación de los resultados en días (una carpeta para el día 1 y otra para el día 2).

Nivel 2: Contiene las carpetas de las diferentes comparaciones y un documento LEER_comparación_titulo-de-comparación.doc en cada una de ellas, con una descripción de lo que se compara.

Nivel 3: Hace la división entre datos cualitativos y cuantitativos. Debido a que se realizó solamente el análisis de datos cualitativos, en el sistema de carpetas encontramos la carpeta de datos cualitativos, pero no la de los datos cuantitativos (en el momento en que se realice el análisis de esta información, se colocarán los datos en una carpeta al mismo nivel y que tendría el nombre de “cuantitativos”). A este nivel se incluyen las presentaciones de los datos crudos en formato “Powerpoint” para su filtrado posterior.

Nivel 4: Contiene las carpetas correspondientes a los 3 programas utilizados (FunRich, Panther y String), es decir una carpeta por programa.

Nivel 5: Incluye “todos los gene symbol” obtenidos con FunRich además de los genes “only” (WT y 926), que son resultado de los diagramas de Venn en FunRich y que se emplearán posteriormente en los análisis bioinformáticos con String y Panther.

-Dentro de la carpeta “FunRich” incluye una subcarpeta de “Gene symbols”, que contiene los símbolos de los genes obtenidos con FunRich a partir de la conversión de los códigos de acceso de UniProt (UniProt accession) a Gene symbol. Además, contiene un archivo, LEER_gene-symbols.doc en el que se explica la obtención de los “gene symbol”, así como del tratamiento de estos para su utilización en los diferentes programas (FunRich, String y Panther)-

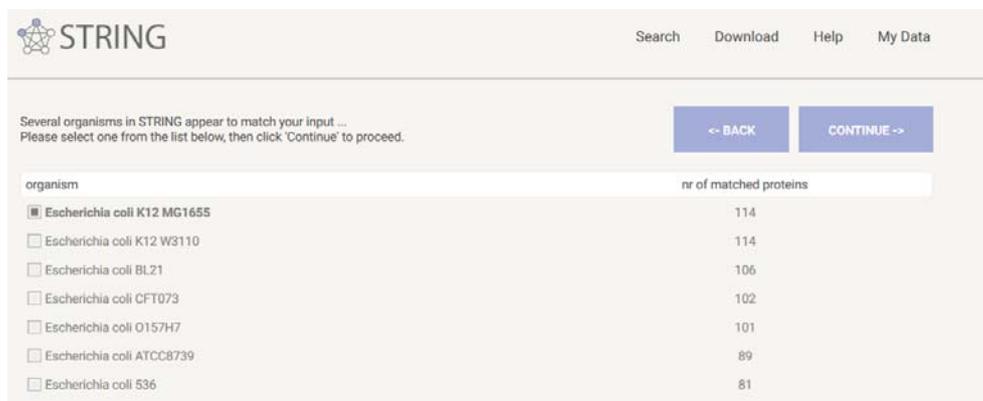
-Dentro de la carpeta “Panther” encontramos dos subcarpetas de genes “only” (WT y 926) para cada comparación.

-Dentro de la carpeta “String” encontramos dos subcarpetas de genes “only” para cada comparación.

Nivel 6: En este último nivel encontramos los gene symbol de FunRich separados en dos grupos (“Todos los gene symbol” y “gene symbol no identificados con cepa k12”). Por otro lado, los “genes only” se dividen en siete subcarpetas (una por cada cepa) en el caso de String y en tres subcarpetas (una por cada análisis) en Panther.

-La subcarpeta “Gene symbol” de “FunRich” divide a los ficheros “gene symbol” en 2 subcarpetas: una que contiene todos los “gene symbol”, y otra que abarca los “gene symbol” no identificados con la cepa K12 de *Escherichia coli*. En el archivo CONTENIDO DE LOS ARCHIVOS TODOS LOS GENE SYMBOL.docx, que se encuentra dentro de la carpeta “Todos los gene symbol” se detalla el contenido de cada uno de los archivos Excel de “gene symbol”. Por otro lado, en el archivo CONTENIDO DE LOS ARCHIVOS GENE SYMBOL NO IDENTIFICADOS CON LA CEPA K12.docx, que se localiza en la carpeta “gene symbol no identificados con cepa k12” se especifica la información que contiene cada archivo Excel de “gene symbol” que no han sido identificados al emplear la cepa K12 de *Escherichia coli*.

-Las dos subcarpetas de genes “only” de *String* se dividen a su vez en otras siete subcarpetas (cepa 536, cepa ATCC8739, cepa BL21, cepa CFT073, cepa K12 MG1655, cepa K12 W3110 y cepa O157H7), una por cada cepa. Esta división la seguimos de esta manera porque este programa clasifica los genes introducidos en las siete cepas anteriores (Figura 21).



The screenshot shows the STRING database search results. At the top, there is a navigation bar with 'Search', 'Download', 'Help', and 'My Data'. Below the navigation bar, a message states: 'Several organisms in STRING appear to match your input ... Please select one from the list below, then click 'Continue' to proceed.' There are two buttons: '<- BACK' and 'CONTINUE ->'. Below this is a table with two columns: 'organism' and 'nr of matched proteins'. The table lists eight *Escherichia coli* strains with their corresponding number of matched proteins.

organism	nr of matched proteins
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> K12 MG1655	114
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> K12 W3110	114
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> BL21	106
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> CFT073	102
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> O157H7	101
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> ATCC8739	89
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> 536	81

Figura 21. Clasificación de los genes de *E.coli* introducidos (input) en String en siete cepas diferentes (cepa 536, cepa ATCC8739, cepa BL21, cepa CFT073, cepa K12 MG1655, cepa K12 W3110 y cepa O157H7).

-Las dos subcarpetas de genes only de Panther se dividen a su vez en otras tres subcarpetas (Gene list, Functional classification viewed in graphic charts y Statistical overrepresentation test), uno por cada análisis realizado con el programa bioinformático (Figura 22).

3. Select Analysis.

Functional classification viewed in gene list

Functional classification viewed in graphic charts Bar chart Pie chart

Statistical overrepresentation test

Statistical enrichment test

Figura 22. Análisis llevados a cabo con el programa Panther. Los análisis realizados abarcan los tres primeros puntos de la imagen, es decir, Functional classification viewed in gene list, Functional classification viewed in graphic charts y Statistical overrepresentation test.

Apéndice 2: Abreviaturas dominios proteicos de FunRich

AAA: ATPases associated with a variety of cellular activities
REC: cheY-homologous receiver domain
S1: Ribosomal protein S1-like RNA-binding domain
Molybdop_Fe4S4: Molybdopterin oxidoreductase Fe4S4 domain
DEXDc: DEAD-like helicases superfamily
CSP: Cold shock protein domain
HELICc: helicase superfamily c-terminal domain
S4: S4 RNA-binding domain
Trans_reg_C: Transcriptional regulatory protein, C terminal
HTH_LUXR: helix_turn_helix, Lux Regulon

Apéndice 3: Tabla de resultados de Panther

ANÁLISIS PANTHER GRUPO DE GENES 926 LOGARÍTMICO DÍA 1 ONLY (COMPARACIÓN 926 LOGARÍTMICO DÍA 1 VS WT LOGARÍTMICO DÍA 1)				
	MOLECULAR FUNCTION	Total genes (33)	%Total genes	% Total function hits (17)
1	binding (GO:0005488)	3	9.1%	17.6%

2	structural molecule activity (GO:0005198)	1	3.0%	5.9%
3	molecular function regulator (GO:0098772)	1	3.0%	5.9%
4	catalytic activity (GO:0003824)	12	36.4%	70.6%
	BIOLOGICAL PROCESS	Total genes (33)	%Total genes	%Total process hits (19)
1	response to stimulus (GO:0050896)	2	6.1%	10.5%
2	cellular process (GO:0009987)	7	21.2%	36.8%
3	metabolic process (GO:0008152)	7	21.2%	36.8%
4	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1	3.0%	5.3%
5	localization (GO:0051179)	2	6.1%	10.5%
	CELLULAR COMPONENT	Total genes (33)	%Total genes	%Total component hits (14)
1	membrane (GO:0016020)	2	6.1%	14.3%
2	cell (GO:0005623)	12	36.4%	85.7%
	PROTEIN CLASS	Total genes (33)	%Total genes	%Total protein class hits (17)
1	transporter (PC00227)	1	3.0%	5.9%
2	chaperone (PC00072)	1	3.0%	5.9%

3	hydrolase (PC00121)	3	9.1%	17.6%	
4	oxidoreductase (PC00176)	4	12.1%	23.5%	
5	transferase (PC00220)	2	6.1%	11.8%	
6	ligase (PC00142)	1	3.0%	5.9%	
7	nucleic acid binding (PC00171)	2	6.1%	11.8%	
8	transcription factor (PC00218)	1	3.0%	5.9%	
9	calcium-binding protein (PC00060)	1	3.0%	5.9%	
10	isomerase (PC00135)	1	3.0%	5.9%	
	PATHWAYS	Total genes (33)	%Total genes	%Total pathway hits (2)	
1	TGF-beta signaling pathway (P00052)	1	3.0%	50.0%	
2	Salvage pyrimidine deoxyribonucle otides (P02774)	1	3.0%	50.0%	
	GENES RESPONSE TO STIMULUS				
	Mapped Ids	Gene Gene Ortholog	Name Symbol	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	yggX	Probable trafficking protein;yggX;ortholog	Fe(2+)-	FE(2+)- TRAFFICKING PROTEIN- RELATED (PTHR36965:SF1)	
2	ydbK	Probable flavodoxin	pyruvate-	PYRUVATE- FLAVODOXIN OXIDOREDUCTAS	reductase(PC00198)

		oxidoreductase;ydbK;ortholog	E-RELATED (PTHR32154:SF0)	
GENES TRANSCRIPTION FACTOR				
	Mapped Ids	Gene Gene Ortholog	Name Symbol Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	argR	Arginine repressor;argR;ortholog	ARGININE REPRESSOR (PTHR34471:SF1)	winged helix/forkhead transcription factor(PC00246)
GENES NUCLEIC ACID BINDING				
	Mapped Ids	Gene Gene Ortholog	Name Symbol Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	Nfo	Endonuclease 4;nfo;ortholog	SI:CH211-14109.10 (PTHR21445:SF0)	endodeoxyribonuclease(PC00093)
2	Mfd	Transcription-repair-coupling factor;mfd;ortholog	TRANSCRIPTION-REPAIR-COUPLING FACTOR (PTHR14025:SF29)	RNA helicase(PC00032);nuclease(PC00170)
ANÁLISIS PANTHER GRUPO DE GENES WT LOGARÍTMICO DÍA 1 ONLY (COMPARACIÓN 926 LOGARÍTMICO DÍA 1 VS WT LOGARÍTMICO DÍA 1)				
	MOLECULAR FUNCTION	Total genes (115)	%Total genes	%Total function hits (73)
1	translation regulator activity (GO:0045182)	1	0.9%	1.4%
2	transcription regulator activity (GO:0140110)	2	1.7%	2.7%
3	binding (GO:0005488)	14	12.2%	19.2%

4	catalytic activity (GO:0003824)	56	48.7%	76.7%
	BIOLOGICAL PROCESS	Total genes (115)	%Total genes	%Total process hits (64)
1	reproduction (GO:0000003)	1	0.9%	1.6%
2	response to stimulus (GO:0050896)	2	1.7%	3.1%
3	cellular process (GO:0009987)	17	14.8%	26.6%
4	metabolic process (GO:0008152)	38	33.0%	59.4%
5	biological regulation (GO:0065007)	2	1.7%	3.1%
6	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1	0.9%	1.6%
7	localization (GO:0051179)	3	2.6%	4.7%
	CELLULAR COMPONENT	Total genes (115)	%Total genes	%Total component hits (33)
1	protein- containing complex (GO:0032991)	1	0.9%	3.0%
2	cell (GO:0005623)	32	27.8%	97.0%
	PROTEIN CLASS	Total genes (115)	%Total genes	%Total protein class hits (67)
1	transporter (PC00227)	2	1.7%	3.0%
2	hydrolase (PC00121)	11	9.6%	16.4%
3	oxidoreductase (PC00176)	19	16.5%	28.4%

4	enzyme modulator (PC00095)	1	0.9%	1.5%
5	lyase (PC00144)	4	3.5%	6.0%
6	transfer/carrier protein (PC00219)	3	2.6%	4.5%
7	transferase (PC00220)	15	13.0%	22.4%
8	ligase (PC00142)	2	1.7%	3.0%
9	nucleic acid binding (PC00171)	3	2.6%	4.5%
10	transcription factor (PC00218)	4	3.5%	6.0%
11	isomerase (PC00135)	3	2.6%	4.5%
	PATHWAY	Total genes (115)	%Total genes	%Total pathway hits (14)
1	De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)	1	0.9%	7.1%
2	De novo purine biosynthesis (P02738)	1	0.9%	7.1%
3	Gamma-aminobutyric acid synthesis (P04384)	1	0.9%	7.1%
4	Peptidoglycan biosynthesis (P02763)	2	1.7%	14.3%
5	Chorismate biosynthesis (P02734)	2	1.7%	14.3%
6	Pantothenate biosynthesis (P02761)	1	0.9%	7.1%

7	O-antigen biosynthesis (P02757)	1	0.9%	7.1%
8	Aminobutyrate degradation (P02726)	1	0.9%	7.1%
9	5-Hydroxytryptamine degradation (P04372)	1	0.9%	7.1%
10	Mannose metabolism (P02752)	1	0.9%	7.1%
11	TCA cycle (P00051)	2	1.7%	14.3%
GENES RESPONSE TO STIMULUS				
	Mapped Ids	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	ynjE	Thiosulfate sulfurtransferase YnjE;ynjE;ortholog	THIOSULFATE SULFURTRANSFERASE YNJE (PTHR11364:SF26)	transfer/carrier protein(PC00219);transferase(PC00220)
2	Yaaa	UPF0246 protein YaaA;yaaA;ortholog	UPF0246 PROTEIN YAAA (PTHR30283:SF4)	
GENES BIOLOGICAL REGULATION				
	Mapped Ids	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	ItaE	Low specificity L-threonine aldolase;ItaE;ortholog	L-THREONINE ALDOLASE (PTHR10289:SF5)	aldolase(PC00044)
2	nagC	N-acetylglucosamine repressor;nagC;ortholog	N-ACETYLGLUCOSAMINE REPRESSOR	carbohydrate kinase(PC00065);epimerase/racemase(PC00096);transcription factor(PC00218)

			(PTHR18964:SF128)	
GENES TRANSCRIPTION FACTOR				
	Mapped Ids	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	Cra	Catabolite repressor/activator;cra; ortholog	CATABOLITE REPRESSOR/ACTIVATOR (PTHR30146:SF45)	Lambda repressor-like transcription factor(PC00245);winged helix/forkhead transcription factor(PC00246)
2	nagC	N-acetylglucosamine repressor;nagC;ortholog	N-ACETYLGLUCOSAMINE REPRESSOR (PTHR18964:SF128)	carbohydrate kinase(PC00065);epimerase/racemase(PC00096);transcription factor(PC00218)
3	uvrY	Response regulator UvrY;uvrY;ortholog	RESPONSE REGULATOR UVRY (PTHR43214:SF3)	methyltransferase(PC00155);protein kinase(PC00193);winged helix/forkhead transcription factor(PC00246)
4	pdhR	Pyruvate dehydrogenase complex repressor;pdhR;ortholog	HTH-TYPE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR LGOR-RELATED (PTHR43537:SF5)	transaminase(PC00216);winged helix/forkhead transcription factor(PC00246)
GENES NUCLEIC ACID BINDING				
	Mapped Ids	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1	nrdD	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase;nrdD;ortholog	ANAEROBIC RIBONUCLEOSIDE-TRIPHOSPHATE REDUCTASE (PTHR21075:SF0)	endoribonuclease(PC00094)
2	yheS	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding	SUBFAMILY NOT NAMED	ATP-binding cassette (ABC) transporter(PC00003);hydrolase(PC00121);translation elongation factor(PC00222)

		protein YheS;yheS;ortholog	(PTHR19211:SF99)	
3	selB	Selenocysteine-specific elongation factor;selB;ortholog	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 SUBUNIT 3 (PTHR42854:SF3)	G- protein(PC00020);hydrolase(PC00121);translati on elongation factor(PC00222);translation initiation factor(PC00224)