

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS**



“CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES DE RNA EN *ESCHERICHIA COLI* BAJO ESTRÉS OXIDATIVO Y DE SU EFECTO SOBRE LA TRADUCCIÓN DEL MENSAJE GENÉTICO”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Ciencias mención Microbiología

LORENZO EUGENIO LEIVA ARAYA

Directores de Tesis

DR. OMAR ORELLANA ORELLANA

DR. ASSAF KATZ ZONDEK

Santiago-Chile

Mayo 2020

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Bacteriana, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con el financiamiento de los proyectos FONDECYT #11140222, FONDECYT #1191074, Proyecto inserción a la academia #79130044 del Doctor Assaf Katz Z., y las becas CONICYT Doctorado Nacional #21151441 (2015-2018) y Fundación María Ghilardi Venegas (2019) obtenidas por Lorenzo Leiva A.

Los resultados y conocimientos generados de la presente Tesis dieron origen total o parcialmente a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos.

Publicaciones:

Rojas J, Castillo G, **Leiva LE**, Elgamal S, Orellana O, Ibba M, Katz A (2018) Codon usage revisited: Lack of correlation between codon usage and the number of tRNA genes in enterobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 502, 450–455.

Leiva LE, Pincheira A, Elgamal A, Kienast SD, Bravo V, Leufken J, Gutierrez DV, Leidel SA, Ibba M, Katz A. (2019) Modulation of *Escherichia coli* translation by the specific inactivation of tRNAGly under oxidative stress. *Frontiers in Genetics*, section RNA (en revisión).

Presentaciones orales:

Leiva LE, Pincheira A, Elgamal S, Ibba M, Katz A. (2016). "Respuesta no transcripcional de *Escherichia coli* a estrés oxidativo". XXXVIII Congreso de la sociedad Chilena de Microbiología. Valdivia, Chile. 2016.

Leiva LE, Elgamal S, Ibba M, Katz A. (2019). "Efecto del estrés oxidativo sobre la eficiencia traduccional de los codones en *Escherichia coli*". XLI Congreso de la sociedad Chilena de Microbiología. Puerto Varas, Chile. 2019.

Presentaciones a congresos nacionales:

Martinez JP, **Leiva LE**, Katz A. "Papel de la regulación del inicio de la traducción en la adaptación de *Escherichia coli* a condiciones de estrés". XLI Congreso de la sociedad Chilena de Microbiología. Puerto Varas, Chile. 2019.

Leiva L, Pincheira A, Elgamal S, Ibba M, Katz A. "Consecuencias fisiológicas de cambios en la actividad de tRNAGly durante estrés oxidativo". XL Congreso de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Puerto Varas, Chile. 2017.

Pincheira A, **Leiva L**, Elgamal S, Amaya F, Ibba M, Katz A. "Cambios en los niveles de tRNA isoaceptores de glicina modula la respuesta a estrés oxidativo en *Escherichia coli*". XXXVII Congreso de la sociedad Chilena de Microbiología.. La Serena, Chile. 2015.

Presentaciones a congresos internacionales:

Leiva LE, Pincheira A, Elgamal S, Kienast SD, Bravo V, Leufken J, Leidel S, Orellana O, Ibba M, Katz A. "Physiological consequences of a decreased tRNAGly activity under oxidative stress in *Escherichia coli*". 27th tRNA Conference, Strasbourg, France. 2018.

Leiva L, Pincheira A, Elgamal S, Bravo V, Leidel S, Ibba M, Katz A. "tRNAGly tune the response of *Escherichia coli* to oxidative stress". 22nd Annual Meeting of the RNA Society, República Checa. 2017.

Leiva L, Pincheira A, Elgamal S, Amaya F, Ibba M, Katz A. "Role of tRNAGly in the response to oxidative stress". Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japón. 2016

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nació en Santiago de Chile en 1988. Tras realizar su Educación Media en el Liceo de Aplicación A-9, ingresó a la carrera de Bioquímica de la Universidad de Chile el año 2006. Luego de la realización de su tesis profesional y de magíster en el laboratorio de la Dra. María Inés Contreras, recibe su título profesional de Bioquímico junto con el grado de Magíster en Bioquímica, en la mención Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Biotecnología, el año 2013. Ese mismo año ingresa a trabajar en el Laboratorio de InmunoBiotecnología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. María Carmen Molina. El año 2015 ingresa al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología, que imparten conjuntamente las Universidad de Santiago de Chile y Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco al Dr. Assaf Katz y Dr. Omar Orellana por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo, confianza y estímulo durante todos estos años.

A los integrantes de la Comisión Evaluadora de la tesis, Dr. Oscar León, Dr. Álvaro Glavic, Dr. Carlos Santiviago y Dr. Felipe Arenas, por sus valiosas críticas y sugerencias que contribuyeron a mejorar el contenido y forma de esta tesis.

A todos los que me han acompañado en este laboratorio: Andrea, Guillermo, Joaquín y Juan Pablo, con quienes hemos tratado de desentrañar los misterios de la regulación traduccional de *Escherichia coli*. A Daniela, Sandra, Diego, Camila, Loreto, Rodrigo, Andrés, Pamela, con quienes compartí tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al Dr. Michael Ibba y su gran equipo de trabajo por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar parte de los experimentos presentados en esta tesis.

A mis padres, quienes siempre han hecho su mayor esfuerzo para verme en el lugar en que me encuentro hoy.

A cada mano que me sostuvo a lo largo de esta etapa.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estrés oxidativo y sus consecuencias.....	1
1.2. Respuesta transcripcional a estrés oxidativo.....	3
1.3. Regulación de la traducción: Iniciación.....	3
1.4. mRNA carentes de secuencia líder y estrés.....	5
1.5. Regulación de la traducción: Elongación.....	6
1.6. Dinámica de los tRNA frente a estrés.....	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos.....	13
3.2. Cepas bacterianas.....	14
3.3. Plasmidios.....	15
3.4. Oligonucleótidos.....	16
3.5. Medios y condiciones de cultivo bacteriano.....	19
3.6. Técnicas básicas de biología molecular.....	20
3.6.1. Extracción de DNA cromosomal.....	20
3.6.2. Extracción de DNA plasmidial.....	20
3.6.3. Extracción de RNA total.....	21
3.6.4. Purificación de DNA de reacciones de PCR y digestiones.....	21
3.6.5. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	21
3.6.6. Preparación y transformación de células electrocompetentes.....	22
3.6.7. Preparación y transformación de células quimiocompetentes.....	22
3.6.8. PCR de colonias.....	23
3.7. Análisis de cambios en la eficiencia traduccional.....	23
3.7.1. Hibridación y clonamiento de oligonucleótidos complementarios.....	24
3.7.2. Análisis de cambios en la eficiencia traduccional.....	25

3.8. Predicción de estructura secundaria del extremo 5' de los mRNA.....	25
3.9. Verificación de regulación de la traducción en genes con alto porcentaje de codones GGA.....	26
3.9.1. Construcción de productos de PCR para la generación de fusiones traduccionales.....	27
3.9.2. Incorporación de productos de PCR mediante recombinación homóloga.....	28
3.9.3. Cuantificación de reporteros fluorescentes a partir de extractos de proteínas.....	28
3.10. Verificación de regulación de la traducción en genes con repeticiones de codones GGA.....	29
3.11. Análisis de mutantes de <i>glyVX</i>	30
3.12. Análisis de cepas sobreproductoras de tRNA ^{Gly}	30
3.12.1. Clonamiento de tRNA ^{Gly} en plasmidio pKK223-3.....	31
3.12.2. Curvas de crecimiento.....	31
3.12.3. Ensayos de movilidad bacteriana en placa.....	31
3.12.4. Determinación de niveles de 5',5'''-P1, P4 diadenosin tetrafosfato (Ap4A).....	32
3.12.5. Determinación de niveles <i>in vivo</i> de aminoacilación.....	32
3.12.5.1. Extracción de RNA total en condiciones ácidas.....	33
3.12.5.2. Electroforesis en geles desnaturantes.....	34
3.12.5.3. <i>Northern blot</i>	34
3.13. Estimación de la contribución de cada codón en la traducción de GFP.....	35
3.14. Análisis estadísticos.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Búsqueda de cambios en la eficiencia traduccional de codones bajo estrés oxidativo.....	36
4.1.1. Determinación de los efectos del estrés oxidativo sobre la eficiencia traduccional usando el vector pS1....	36
4.1.2. Análisis sistemático de eficiencias traduccionales bajo estrés oxidativo.....	37
4.1.3. Relación entre eficiencia traduccional y frecuencia de uso de codones.....	42
4.1.4. Relación entre eficiencia traduccional y estructura del extremo 5' del mRNA.....	43
4.2. Análisis de cambios traduccionales en codones de glicina: búsqueda de posibles causas y consecuencias....	45
4.2.1. Traducción de los codones de glicina en respuesta a las condiciones del medio de cultivo.....	45
4.2.2. Regulación de la traducción de codones de glicina en el contexto de genes silvestres.....	46
4.3. Consecuencias de las alteraciones en los niveles de tRNA ^{Gly}	49
4.3.1. Cambios en la eficiencia traduccional de los codones de glicina producto de la reducción de tRNA ^{Gly}	49
4.3.2. Estudio fenotípico de la sobreexpresión de tRNA ^{Gly}	51
4.3.3. Cambios en los niveles de aminoacilación al sobreexpresar tRNA ^{Gly}	54
4.4. Traducción de mRNA carentes de líder (lmRNA) bajo estrés oxidativo.....	56
4.4.1. Análisis de la traducción de mRNA carentes de región líder, bajo estrés oxidativo.....	56

4.4.2. Análisis de la traducción de mRNA carentes de región líder silvestres, bajo estrés oxidativo.....	60
4.5. Evaluación del papel de MazF en la traducción de lmrna.....	61
4.5.1. Dependencia de MazF en los cambios traduccionales de lmrna bajo estrés oxidativo.....	61
4.5.2. Determinación del papel de MazF en la producción de nuevos lmrna bajo estrés oxidativo.....	63
4.5.3 Formación de ribosomas de estrés 70S ^{Δ43} bajo estrés oxidativo.....	65
4.6. Cambios globales en los ribosomas bajo estrés oxidativo.....	69
4.7. Evaluación del papel de (p)ppGpp en la traducción de lmrna y mRNA canónicos.....	70
4.7.1. Inhibición en la traducción de mRNA canónicos dependiente de RelA.....	71
4.7.2. Papel de Lon en la regulación de los niveles de ribosomas bajo estrés oxidativo.....	72
4.8. Análisis de la etapa limitante en la traducción bajo estrés oxidativo.....	73
4.8.1. Verificación de la disminución global en la tasa traduccional bajo estrés oxidativo.....	73
4.8.2. Cambios a nivel de la iniciación versus cambios a nivel de la elongación.....	74
4.9. Análisis predictivos.....	75
4.9.1. Estimación de la contribución en la eficiencia traduccional de cada codón en las variantes de GFP.....	75
4.9.2. Comparación entre eficiencias traduccionales predichas para condición control y bajo estrés.....	77
5. DISCUSIÓN.....	79
5.1. Evolución de las estrategias experimentales para el estudio de la regulación de la traducción.....	79
5.2. Cambios en la eficiencia traduccional de codones.....	81
5.3. Rol del aminoácido glicina en el contexto del estrés oxidativo.....	83
5.4. Mecanismos alternativos de la iniciación de la traducción durante estrés oxidativo.....	86
5.5. Regulación de la traducción bajo estrés oxidativo.....	88
6. CONCLUSIONES.....	91
7. BIBLIOGRAFÍA.....	92
8. ANEXOS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las etapas de iniciación y elongación de la traducción.....	4
Figura 2. tRNA aminoacilable de <i>E. coli</i> disminuye bajo estrés oxidativo.....	8
Figura 3. Conservación del total de tRNAGly y cambios en su fracción aminoacilada <i>in vivo</i> en <i>E. coli</i> bajo estrés oxidativo.....	9
Figura 4. Histograma de los valores de CAI para genes inducidos bajo estrés oxidativo y todos los genes de <i>E. coli</i>	10
Figura 5. Representación esquemática de la construcción de fusiones cromosomales a <i>gfp-mCherry</i>	26
Figura 6. Sistema biscistrónico de genes reporteros.....	37
Figura 7. Análisis de eficiencia traduccional de codones codificantes en <i>E. coli</i>	38
Figura 8. Distribución de las eficiencias traduccionales de la genoteca y controles.....	40
Figura 9. Distribución de los cambios de eficiencias de traducción de la genoteca entre condición de estrés y control.....	40
Figura 10. Codones implicados en cambios de la eficiencia traduccional bajo estrés oxidativo.....	41
Figura 11. Relación entre los valores de GFP/mCherry obtenidos para cada codón en dos condiciones de cultivo versus frecuencia de uso codogénico en genes de alta expresión.....	43
Figura 12. Relación entre eficiencia traduccional y estabilidad de las estructuras predichas para el extremo 5' del transcrito.....	44
Figura 13. Disminución en los niveles de fluorescencia dependiente de los codones de glicina, bajo estrés oxidativo.....	46
Figura 14. Análisis de la regulación traduccional de genes con alto contenido de GGA, con reporteros cromosomales.....	47
Figura 15. Alteración en la traducción de codones de glicina en un contexto silvestre.....	49
Figura 16. Eficiencia traduccional de codones de glicina en una mutante con menos tRNA ^{Gly} _{CCG}	50
Figura 17. Curvas de crecimiento de cepas sobreproductoras de tRNA, bajo estrés oxidativo.....	51
Figura 18. Movilidad de cepas sobreproductoras de tRNA ^{Gly} , bajo estrés oxidativo.....	52
Figura 19. Sobreproducción de tRNA ^{Gly} altera los niveles de Ap4A <i>in vivo</i> , bajo estrés oxidativo.....	53
Figura 20. Aminoacilación <i>in vivo</i> de aceptores de glicina en cepas sobreproductoras de tRNA ^{Gly}	55
Figura 21. Distribución de las eficiencias de traducción de la genoteca de variantes de GFP en condiciones control y bajo estrés oxidativo.....	56
Figura 22. lmrRNA se traduce de manera más eficiente bajo estrés oxidativo.....	58
Figura 23. lmrRNA silvestres se traducen de manera más eficiente bajo estrés oxidativo.....	61

Figura 24. <i>mazEF</i> no es esencial para el aumento de eficiencia traduccional de los lmrRNA bajo estrés oxidativo.	62
Figura 25. Análisis de la eficiencia traduccional de <i>katG-gfp</i> bajo estrés oxidativo inducido con paraquat.....	64
Figura 26. Análisis de la integridad del extremo 3' del rRNA 16S de <i>E. coli</i> bajo estrés oxidativo.....	66
Figura 27. Región del rRNA 16S procesada por MazF.....	68
Figura 28. Perfil de ribosomas de <i>E. coli</i> bajo estrés oxidativo.....	70
Figura 29. Análisis de la eficiencia traduccional de SD GFP y lmrRNA GFP en las mutantes $\Delta relA$ y Δlon	71
Figura 30. Efecto del estrés oxidativo sobre la traducción de motivos de poliprolinas.....	73
Figura 31. Efecto codogénico de leucina en vectores con y sin región líder.....	75
Figura 32. Modelos matemáticos utilizados para el cálculo de la eficiencia traduccional predicha.....	76
Figura 33. Distribución de las eficiencias traduccionales predichas en condiciones control y bajo estrés oxidativo.....	78
Figura 34. Modelo de alteraciones y/o regulación de la maquinaria traduccional bajo oxidativo.....	91

RESUMEN

En los últimos años, distintos grupos apoyan la tesis de una regulación traduccional bajo algunas condiciones de estrés, tanto a nivel de la iniciación como de la elongación. Sin embargo, existe controversia en algunos de los mecanismos propuestos. Una de las principales condiciones adversas a las que se enfrentan las bacterias es el estrés oxidativo. Frecuentemente las bacterias están expuestas a diversos factores ambientales y antropogénicos capaces de promover la formación de moléculas oxidantes, que en ciertas condiciones pueden inducir estrés oxidativo. En consecuencia, tales microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes muy hostiles, como el interior de macrófagos humanos u otros animales. Por años, el estudio del control de estos mecanismos se ha centrado en los cambios transcripcionales que ocurren producto de dicha condición de estrés. Sin embargo, los componentes de RNA que participan en la traducción no son estáticos, y también responden a los cambios ocurridos en el entorno celular. En efecto, existen ejemplos de alteraciones inducidas bajo algunas condiciones de estrés, que afectan a los tres RNA centrales de la traducción: mRNA, tRNA y rRNA.

Este trabajo intenta contribuir a esta discusión, determinando cambios en componentes de la maquinaria traduccional de *Escherichia coli* bajo estrés oxidativo, centrando el análisis en las moléculas de RNA y cómo estos cambios inciden en la traducción del mensaje genético.

Nuestros análisis muestran que el estrés oxidativo inhibe el inicio canónico de la traducción de mRNA y al mismo tiempo activa el inicio traduccional de mRNA carentes de líder (lmRNA). El inicio canónico de la traducción parece ser inhibido producto de la acumulación de (p)ppGpp. Distinto a los que ha sido propuesto en la literatura, la traducción de lmRNA no dependería de la endoribonucleasa MazF. Sin embargo, ésta participaría en la generación de algunos lmRNA a través de la digestión de mRNA canónicos. Alternativamente, proponemos que la traducción de lmRNA puede ser activada producto de la generación de partículas ribosomales más pequeñas, observadas en perfiles de sedimentación.

Finalmente, generamos un método que nos permitió estimar la eficiencia traduccional de cada codón durante la elongación. Esta consiste en una genoteca de variantes de GFP, que nos permitió observar la síntesis de proteínas en el tiempo, en distintas condiciones de cultivo. Haciendo uso de ésta, comparamos la eficiencia traduccional de todos los codones en medio mínimo y bajo estrés oxidativo. De este análisis observamos que bajo estrés oxidativo algunos codones (TCC, GGA, CTC, CCT y CCC) conservan o incrementan su eficiencia traduccional respecto al resto de codones, a pesar de la inhibición antes mencionada para mRNA canónicos. Basado en estos y otros resultados proponemos que la inhibición del inicio canónico de la traducción es mayor que la inhibición de la elongación.

SUMMARY

“Characterization of RNA alterations in *Escherichia coli* under oxidative stress and their effects over translation of the genetic message”

In recent years, different researchers have proposed that translational regulation is central to the response to some stress conditions, during either its initiation and/or elongation steps. However, there is controversy over some of proposed mechanisms. One of the important hostile conditions confronted by bacteria is oxidative stress. Bacteria are often exposed to various environments and anthropogenic factors that favor the production of oxidative molecules, which in some conditions can produce oxidative stress. Consequently, these microorganisms have developed mechanisms to overcome this stress at diverse environments, such as inside of macrophages from humans or other animals. For many years, the study of these mechanisms has focused on transcriptional changes triggered by the stress. However, the RNA components involved in translation are not static and also respond to changes in the cellular environment. In fact, there are examples of alterations induced by oxidative stress conditions to the main three types of RNA key to translation: mRNA, tRNA, and rRNA.

This work tries to contribute to that discussion, determining changes in the components of the *Escherichia coli* translation machinery under oxidative stress, focusing our analysis on RNA molecules and how these changes affect the translation of the genetic message.

Our analyzes show that oxidative stress inhibit initiation of translation from canonical mRNA and, at the same time, activates translation initiation from leaderless mRNA (lmRNA). Canonical translation seems to be inhibited by the accumulation of (p) ppGpp. Contrary to what other have been proposed, translation of lmRNA does not depend on MazF endoribonuclease, which may, nevertheless, promote the generation of some of the lmRNA through digestion of canonical mRNA. As an alternative mechanism, we propose that translation of lmRNA may be activated by the production of lighter ribosomal particles which we have observed on sedimentation profiles.

Finally, we used a library of GFP variants to estimate the efficiency of translation for each codon during elongation. This allows us to study protein synthesis over time, comparing the efficiency of translation of all codons between minimal media and oxidative stress conditions. From this analysis we observe that under oxidative stress, some codons (TCC, GGA, CTC, CCT and CCC) maintain or increase their efficiency of translation, despite the general inhibition of the canonical mRNAs mentioned above. Based on these and other results we propose that inhibition of canonical translation initiation is stronger than inhibition of elongation.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, podemos encontrar bacterias prácticamente en todos los ambientes, muchos de los cuales pueden ser adversos, e inhibir el crecimiento y la supervivencia bacteriana (*Rothschild et al., 2001*). Esto último, es producto del daño celular causado tanto por agentes de origen biótico (como el originado por otros microorganismos o el sistema inmune de animales) como abiótico (como metales pesados, alta salinidad, acidez del medio, temperatura y radiación ionizante) (*Kataria et al., 2014*).

Cuando observamos con mayor detención a microorganismos que habitan ambientes hostiles, denominados extremófilos, podemos percatarnos que han desarrollado enzimas con una mayor estabilidad térmica, robustos sistemas de reparación del DNA, bombas de protones que regulan el pH intracelular, capas mucoidales para envolver las colonias, y diversos mecanismos que les permiten mantener una homeostasis en ambientes en que otras células normalmente sufrirían estrés celular (*Babu et al., 2015*). Por otra parte, bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) no están adaptadas para sobrevivir en ambientes extremos. Sin embargo, cuentan con mecanismos para sobrevivir en ambientes dinámicos, donde la temperatura, la concentración de nutrientes y agentes causantes de daño celular pueden variar abruptamente. Para enfrentar estas situaciones de estrés, las bacterias deben iniciar programas de respuesta específica según el tipo de estrés que las afecte, usualmente promoviendo la síntesis *de novo* de macromoléculas que ayudan a restaurar la homeostasis, y evitando la síntesis de moléculas prescindibles para dicha condición (*Ron et al., 2013*).

1.1. Estrés oxidativo y sus consecuencias

Dado que parte del ciclo infectivo de enterobacterias como *E. coli* ocurre en ambientes aeróbicos, muchos de los desbalances generados por las condiciones de estrés favorecen la producción de moléculas oxidantes. Además, parte del sistema inmune de los animales involucra la síntesis y liberación de moléculas oxidantes para combatir el ataque de patógenos. Esto lleva a que el estrés oxidativo sea un tipo de estrés muy recurrente en enterobacterias (*Imlay, 2019*).

Brevemente, el estrés oxidativo corresponde a un desbalance entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la capacidad celular para degradarlas o reparar el daño causado por éstas (*Lushchak et al., 2014*). Esto lleva a la acumulación de moléculas como radical hidroxilo (HO^\bullet), peróxido (H_2O_2), y superóxido (O_2^-), generadas como consecuencia del metabolismo aeróbico de la bacteria, y la reacción de *Fenton* cuando se ven alteradas las concentraciones intracelulares de Fe^{+2} libre (*Korshunov et al., 2010; Messner et al., 1999*). Debido a la alta reactividad de algunas ROS, como el HO^\bullet , todas las macromoléculas son susceptibles a ser oxidadas. En el caso de las proteínas, su oxidación puede modificar su estructura y/o función, alterando múltiples procesos celulares (*Steiner et al., 2019*). Algunas de las modificaciones observadas en proteínas, son:

- *Oxidación de grupos prostéticos*, siendo los centros de hierro-azufre uno de los más estudiados, dada la facilidad con que se oxidan y sus implicancias en la respuesta a estrés oxidativo. Por ejemplo se ha descrito que al verse incrementados los niveles de ROS, el O_2^- destruye el centro [4Fe-4S] del sitio catalítico de la Dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD), una de las enzimas de la vía de biosíntesis de aminoácidos ramificados (alanina, isoleucina y leucina). Esto lleva a una auxotrofia por tales aminoácidos en una condición de estrés oxidativo (Kuo et al., 1987). Adicionalmente a la inactivación de enzimas con centros de hierro-azufre, se suma la liberación de Fe^{2+} , lo que puede catalizar la producción de HO^\bullet a partir de peróxido de hidrógeno mediante la reacción de *Fenton*, exacerbando la oxidación de otras macromoléculas (Stadtman et al., 1993).
- *Oxidación de cadenas laterales de aminoácidos*, como por ejemplo los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. En un ambiente citosólico éstas permanecen preferentemente reducidas, y su oxidación lleva a errores en el plegamiento y consecuente agregación de proteínas. Además de la oxidación de cisteína, es frecuente la oxidación de histidina, arginina, lisina, prolina y metionina, más aún cuando se encuentran en la vecindad de un catión metálico que pueda catalizar su oxidación, generando una serie de productos (Suzuki et al., 2010; Stadtman et al., 1993; Stadtman et al., 2006).

Otra macromolécula que ha recibido especial atención es el DNA, pues nucleótidos modificados pueden promover la mutagénesis, al facilitar interacciones no *Watson-Crick* durante la replicación. Además, las ROS son capaces de oxidar tanto a las ribosas como a las bases de los ácidos nucleicos, generando una gran variedad de modificaciones que alteran la estructura de la doble hebra. Ejemplo de esto son los dímeros de nucleótidos y aductos en el DNA (Cooke et al., 2003; Farr et al., 1991). Sin embargo, uno de los productos más frecuentes de la oxidación del DNA es la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG), posiblemente debido a que la guanosina posee el menor potencial de oxidación entre los nucleótidos, actuando como un sumidero de electrones (Jovanovic et al., 1986; Park et al., 1990). Todo el daño oxidativo que incide sobre el DNA, puede tener efectos nocivos en la expresión génica y síntesis de proteínas tanto durante la situación de estrés, como una vez que se restablezca la “normalidad”. Debido a la importancia de preservar la información codificada en el DNA, es que encontramos distintos mecanismos para atenuar o reparar el daño. Algunos de estos mecanismos son las proteínas DPS (*DNA-binding protein from starved cells*) que se unen de manera inespecífica al DNA para protegerlo, y los sistemas NER (*Nucleotide Excision Repair*), BER (*Base Excision Repair*), y SOS que actúan de manera jerárquica para reparar el daño causado por agentes oxidantes (Chiancone et al., 2008; Rastogi et al., 2010; Imlay et al., 1987).

En contraste con el DNA, el análisis del RNA bajo estrés oxidativo no ha tenido la misma atención, a pesar que el RNA es una molécula mucho más abundante que el DNA (~10 veces), y crucial en la producción de proteínas. Respecto a la oxidación de guanosinas, reportes indican que al estresar *E. coli* con H_2O_2 también

habría un rápido aumento en la concentración de 8-hidroxiuanosina (8-OH-G) en RNA, aunque mucho mayor al observado para 8-OH-dG en DNA (Liu *et al.*, 2012; Neidhardt *et al.*, 1996; Nunomura *et al.*, 2017). Aún no está bien establecido el papel de 8-OH-G en la traducción, pero en modelos eucariontes se ha visto que la acumulación de 8-OH-G gatillada por estrés oxidativo, es concomitante con el retardo en la traducción o la terminación prematura de transcritos oxidados y formación de polipéptidos cortos (Tanaka *et al.*, 2007; Calabretta *et al.*, 2015). Resultados similares se han obtenido en experimentos en bacterias, los cuales muestran una ralentización en la formación del enlace peptídico durante la traducción de mRNA que contienen 8-OH-G (Simms *et al.*, 2014; Nunomura *et al.*, 2017). Efectos inhibitorios similares se han observado en oxidaciones ocurridas en el rRNA 23S (Willi *et al.*, 2018). Esto toma gran relevancia, ya que algunos investigadores indican que las oxidaciones 8-OH-G ocurren principalmente en rRNA (particularmente en el rRNA 23S). Aunque se desconoce cuales son los factores preponderantes que promueven este sesgo en la oxidación del rRNA (Willi *et al.*, 2018).

1.2. Respuesta transcripcional a estrés oxidativo

Dado el amplio daño que puede generar el estrés oxidativo, bacterias como *E. coli* responden induciendo la síntesis de proteínas de los sistemas de detoxificación y reparación, como superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD), catalasa o glutatión reductasa (Pomposiello *et al.*, 2001; Farr *et al.*, 1991). La coordinación de esta respuesta génica se ha estudiado ampliamente, y ha posicionado a los factores OxyR y SoxR como reguladores transcripcionales clave en la respuesta al estrés oxidativo. Estos factores transcripcionales se encuentran constitutivamente inactivos, pero el acceso de H₂O₂ a OxyR y O₂⁻ a SoxR, genera los cambios conformacionales necesarios para su activación producto de la oxidación de cisteínas y formación de cistinas y la oxidación de centros Fe-S, respectivamente (Åslund *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2001; Jo *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2008). Si bien estos dos sensores comandan la transcripción de varios de los genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo (regulones OxyR y SoxRS), solo son parte de una red de reguladores transcripcionales que continuamente monitorean el balance redox, necesarios para la tolerancia al estrés, así como para la adaptación al crecimiento con distintos niveles de oxígeno (Green *et al.*, 2004).

1.3. Regulación de la traducción: Iniciación

Toda respuesta transcripcional que involucre RNA codificante, requiere de una maquinaria traduccional que permita la decodificación del mensaje genético. Sin embargo, varios autores han descrito la ocurrencia de cambios en el proceso traduccional, como consecuencia del estrés oxidativo (Nishiyama *et al.*, 2004; Kojima *et al.*, 2007; Shenton *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2019). En el modelo canónico de traducción podemos reconocer tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Brevemente, la primera de éstas requiere del posicionamiento del

RNA de transferencia (tRNA) iniciador (fMet-tRNA) en el codón de inicio del mRNA, en el sitio del peptidil-tRNA (sitio P) de la subunidad menor del ribosoma (30S), junto con los factores de iniciación 1 (IF1), 2 (IF2) y 3 (IF3). Se postula que inicialmente se uniría IF3 a la subunidad 30S, liberando el mRNA y el tRNA desacilado de la traducción anterior y posteriormente se uniría IF1, IF2 y fMet-tRNA, generando el complejo de iniciación 30S. Posterior a la unión de la subunidad 50S, ocurre la hidrólisis de GTP catalizada por IF2, y la disociación de IF1 e IF3. Solo tras la salida de IF2 el sitio del aminoacil-tRNA (sitio A) queda disponible para el ingreso del factor de elongación Tu (EF-Tu) con el tRNA aminoacidado (AA-tRNA) para comenzar la síntesis del polipéptido (Figura 1) (Schmeing *et al.*, 2009; Gualerzi *et al.*, 2015).

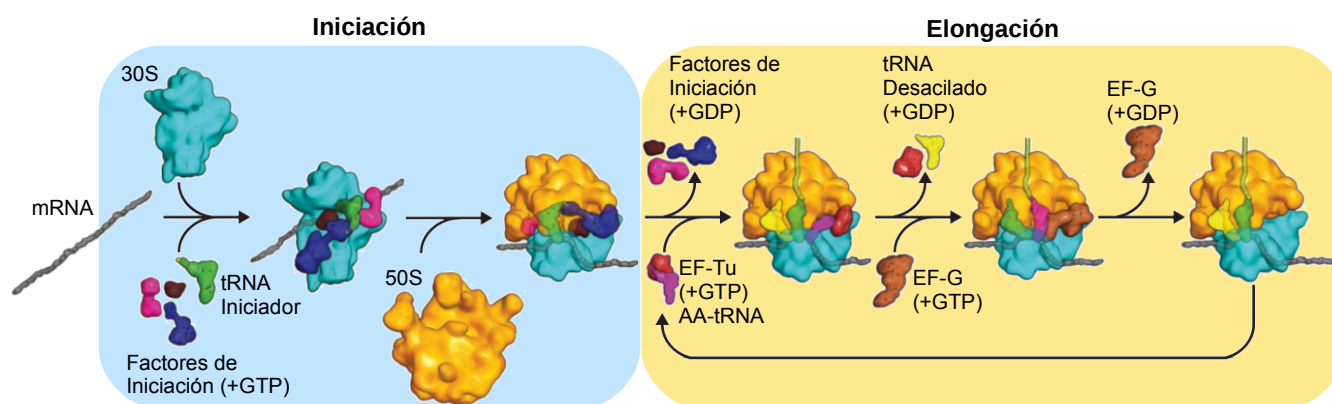


Figura 1. Representación esquemática de las etapas de iniciación y elongación de la traducción. En fondo celeste se describe la formación del complejo de iniciación 30S, para luego dar paso al monosoma 70S, tras la integración de la subunidad 50S. En fondo anaranjado se observa de manera secuencial los pasos clave ocurridos durante la elongación. Esta inicia con la salida de los factores de iniciación e ingreso de EF-Tu y el aminoacil-tRNA (AA-tRNA). Luego de la formación del enlace peptídico, ocurre la salida del tRNA desacilado e ingresa EF-G, para catalizar la traslocación del ribosoma. Figura modificada de Schmeing *et al.*, 2009.

Cambios en la eficiencia de cualquiera de las etapas de la traducción pueden impactar en la velocidad del ribosoma y consecuentemente en la cantidad de proteína sintetizada (Hersh *et al.*, 2014). Sin embargo, durante el crecimiento exponencial la iniciación es la etapa limitante para la mayoría de los genes y consecuentemente muchos de los mecanismos regulatorios que se han descrito, actúan a nivel de la iniciación (Kennell *et al.*, 1977). Un ejemplo de esto en *E. coli* es la regulación a estrés por frío dependiente de la proteína Y (pY), la cual se une a los sitios A y P del ribosoma (complejo 70S), bloqueando la iniciación de la traducción (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Otro ejemplo es la alarmona (p)ppGpp, cuya síntesis se induce tras la deprivación de aminoácidos. Si bien tiene un papel preponderante en la regulación de la transcripción, ésta podría reprimir la traducción a través de la unión a factores de iniciación o elongación dependientes de GTP, como IF2 (Gualerzi *et al.*, 2015; Katz *et al.*, 2012). Esto coincide con un reporte donde observaron que en periodos de carencia de nutrientes, la tasa de

elongación no se ve afectada, pero que los cambios en la tasa traduccional dependen mayormente de regulación de la iniciación (Dai et al., 2016).

La regulación de la iniciación también puede ser llevada a cabo por RNA, como por ejemplo aquella ejercida por sRNA, cuya interacción por complementariedad de bases con el mRNA activa o reprime la traducción al inducir cambios en la estructura de la región 5' del mRNA o bloqueando sitios de unión al ribosoma (RBS), entre otras funciones (Bossi et al., 2016). Ejemplo de esto es OxyS, un RNA no codificante de 109 nts, inducido bajo estrés oxidativo, que evita la traducción de genes como *rpoS* y *fhlA* a través de su unión al RBS de sus transcritos (Altuvia et al., 1998).

1.4. mRNA carentes de secuencia líder y estrés

En la traducción canónica, el posicionamiento del mRNA en la subunidad 30S se explica por la interacción entre la secuencia *Shine-Dalgarno* (SD) del mRNA y la secuencia *anti Shine-Dalgarno* (aSD) en el extremo 3' del rRNA 16S (Schmeing et al., 2009). Sin embargo, algunos autores han descrito la existencia de mRNA carentes de secuencia líder (*Leaderless mRNAs* o *lmRNAs*), zona donde se localiza la secuencia SD, dejando al codón de inicio sobre o muy próximo al extremo 5' del mRNA (Ptashne et al., 1976; Vesper et al., 2011; Sauert et al., 2016). Si bien se desconoce el mecanismo que permite el inicio de la traducción de estos transcritos, algunos investigadores han logrado determinar que los lmRNA forman complejos de iniciación preferentemente con monosomas 70S, en lugar de la subunidad 30S (Udagawa et al., 2004; Moll et al., 2004; Vesper et al., 2011).

En *E. coli* el transcrito generado por el gen *cI* del bacteriófago Lambda fue utilizado por muchos años como modelo de estudio de los lmRNA, y solo en los últimos años han sido identificados nuevos transcritos que cumplen estas características (Ptashne et al., 1976, Sauert et al., 2016). Por otra parte, algunos autores han realizado búsquedas de los inicios de transcripción en otros microorganismos y han determinando que el número de lmRNA generados por la RNA polimerasa dista mucho de ser marginal. Por ejemplo, en *Mycobacterium tuberculosis* se detectó que un 26% de los genes genera lmRNA, mientras que en *Deinococcus deserti* un 47% de los inicios de transcripción coincide con el inicio de traducción (Cortes et al., 2013; Groot et al., 2014).

Recientemente, se ha generado una controversia respecto al papel que cumpliría un sistema Toxina-Antitoxina (TA) MazEF en la regulación de la traducción, producto del procesamiento de mRNA y ribosomas (Vesper et al., 2011). Este sistema se encuentra codificado en el operón *mazEF* de *E. coli*, el cual codifica una endoribonucleasa selectiva por la secuencia ACA en RNA monohebra (MazF) y una proteína que inhibe su actividad (MazE) (Zhang et al., 2003). Producto de la rápida degradación de MazE por la serina proteasa ClpPA, MazE funciona como sensor de la síntesis de RNA y/o proteínas. En consecuencia, cualquier evento que disminuya su transcripción y/o traducción, gatilla una activación de MazF (Aizenman et al., 1996).

Inicialmente, a este sistema se le atribuyó la función de detener la síntesis proteica, producto de la

degradación generalizada de mRNA, bajo distintas condiciones de estrés (Zhang *et al.*, 2003; Hazan *et al.*, 2004). Sin embargo, posteriormente se observó que dicha inhibición no es completa, persistiendo la síntesis selectiva de proteínas requeridas tanto para muerte celular de una población bacteriana bajo estrés, como para la supervivencia de pequeñas subpoblaciones de la misma (Amitai *et al.*, 2009). Al analizar aquellos mRNA cuya traducción continúa bajo estrés, se documentó que correspondían a l-mRNA que habían sido generados por el procesamiento de MazF (Vesper *et al.*, 2011). Este mismo grupo de investigadores indicó que la sobreexpresión de MazF en *E. coli* genera un subgrupo de ribosomas, cuyo rRNA 16S carece de 43 nucleótidos del extremo 3' (Ribosomas de estrés, o 70S^{Δ43}), región que contiene la secuencia *anti-Shine Dalgarno* (Vesper *et al.*, 2011). Como consecuencia de este procesamiento los ribosomas de estrés (70S^{Δ43}) no reconocerían mRNA canónicos, y únicamente permitirían la traducción de l-mRNA (Udagawa *et al.*, 2004; Moll I *et al.*, 2004; Vesper *et al.*, 2011; Sauert *et al.*, 2016). Sin embargo, posterior a la publicación de estos artículos, otros equipos de investigadores obtuvieron resultados contradictorios que cuestionan seriamente el papel de MazF en la formación de poblaciones heterogéneas de ribosomas y de l-mRNA (Luidalepp *et al.*, 2016; Culviner *et al.*, 2018).

1.5. Regulación de la traducción: Elongación

Muchos investigadores sostienen que la etapa limitante de la traducción es la iniciación, pero otros afirman que eventos ocurridos durante la elongación también pueden incidir en la cantidad de proteína sintetizada (Dai *et al.*, 2016; Hersh *et al.*, 2014). Para contextualizar, la elongación inicia con un peptidil-tRNA en el sitio P y el sitio A vacío. El complejo ternario formado por EF-Tu, GTP y el aminoacil-tRNA ingresa al sitio A del ribosoma, donde luego del reconocimiento codón-anticodón del mRNA y tRNA, se cataliza la hidrólisis de GTP. Posteriormente a la salida de EF-Tu y GDP del ribosoma, se induce la formación del nuevo enlace peptídico, elongando el polipéptido en un aminoácido. Finalmente, hace ingreso el factor de elongación G (EF-G) unido a GTP para catalizar la traslocación del tRNA desacilado, el peptidil-tRNA y el siguiente codón del mRNA a los sitios E, P y A del la subunidad 30S, respectivamente (Figura 1) (Schmeing *et al.*, 2009; Rodnina *et al.*, 2016).

La eficiencia de traducción durante la elongación puede depender de distintos factores, como la estructura del mRNA, la velocidad de formación del enlace peptídico de algunos aminoácidos, y modificaciones en los tRNA que afectan la interacción codón-anticodón, entre otros factores (Rodnina *et al.*, 2016; Starzyk *et al.*, 1984). Como se mencionó, la traducción puede responder a la producción de la alarmona (p)ppGpp, ya que ensayos *in vitro* muestran que factores que unen GTP, como EF-Tu y EF-G, pueden ser inhibidos según las condiciones de la reacción (Rojas *et al.*, 1984). Es de interés destacar que algunos autores han logrado cuantificar el impacto que tienen determinados codones en la traducción de proteínas (probablemente en la elongación) según la disponibilidad de aminoácidos en el medio de cultivo y la concentración de tRNA observando cambios a niveles de proteínas y de fenotipos (Subramaniam *et al.*, 2013a; Subramaniam *et al.*,

2013b). Esto hace cuestionarnos cuál será el real impacto de las concentraciones intracelulares de aminocil-tRNA en la tasa de elongación.

1.6. Dinámica de los tRNA frente a estrés

Un importante factor a considerar en el proceso de traducción es la abundancia de los tRNA. Se ha determinado que ésta cambia para *E. coli* según la tasa de crecimiento (Dong *et al.*, 1996), y también puede cambiar frente a condiciones de estrés inducidas por agentes oxidantes (Zhong *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2019).

Dada la estructura y alto contenido de bases modificadas, los tRNA son mucho menos susceptibles a la degradación en comparación a los mRNA. Sin embargo, se ha descrito que bajo algunas condiciones, hay ribonucleasas especializadas en la degradación de algunos de éstos, como Rny1 y angiogenina en eucariontes o EcoPrrC y VapC en bacterias (Winther *et al.*, 2011; Nawrot *et al.*, 2011). Algunos reportes indican que en eucariontes la modulación de los niveles de tRNA mediante fragmentación estaría ampliamente difundida, y además esta generaría fragmentos de RNA con papeles regulatorios (Thompson *et al.*, 2008; Nawrot *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2011).

Una característica que destaca a los tRNA es el elevado número de nucleótidos modificados, que estabilizan y modulan su funcionalidad y especificidad (Phizicky *et al.*, 2010). Un ejemplo de esto es la tiolación de N6-isopentenyladenosina (I⁶A) para formar 2-metiltio-N6-isopentenyladenosina (ms²I⁶A). Esta es una modificación presente en *E. coli*, que depende de los niveles intracelulares de hierro. La ausencia de esta modificación afecta a una serie de tRNA (tRNA^{Tyr}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Leu} y tRNA^{Ser}), reduciendo la eficiencia de la traducción de algunos de los codones decodificados por éstos. Sin embargo, la ralentización en la traducción de codones de aminoácidos aromáticos induce la síntesis de sideróforos, que ayuda a restaurar los niveles de hierro y ms²I⁶A en los tRNA (Starzyk *et al.*, 1984; Katz *et al.*, 2016). Otro ejemplo de regulación es la ocurrida en *Saccharomyces cerevisiae*, la cual incrementa la metilación en el anticodón del tRNA^{Leu}_{GAA} bajo estrés oxidativo, incidiendo en la interacción codón-anticodón y elevando la eficiencia traduccional de mRNA enriquecidos en codones UUG (Chan *et al.*, 2012). Este tipo de regulación por modificaciones químicas ha sido reportada para otros tRNA en levadura, donde la modulación de la respuesta a estrés estaría dada por cambios en la eficiencia traduccional sin alterar los niveles de tRNA total (Fernández-Vázquez *et al.*, 2013).

Trabajo *in vitro* desarrollado con tRNA de *E. coli*, sugiere que parte de los cambios en el patrón de modificación de los tRNA también puede deberse al daño causado por agentes oxidantes. Modificaciones como 4-tiouridina (s⁴U), 5-metilaminometil-2-tiouridina (mnm⁵s²U), 2-tiocitidina (s²C) y ms²i⁶A, son susceptibles a la destiolización, disminuyendo la capacidad de tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} y tRNA^{Lys} para ser aminoacilados (Rao *et al.*, 1974; Katz *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si esto ocurre *in vivo* y si tendría efectos en la fisiología bacteriana.

Un caso distinto de modificación sufrido por tRNA es la acetilación y consecuente inactivación de tRNA aminoacilados, por parte de la toxina TacT en *Salmonella Typhimurium*. Esta modificación difiere a las referidas anteriormente dado que ocurre en el aminoácido y no en el tRNA, pudiendo ser revertida por peptidil tRNA hidrolasas (Pth), encargadas del reciclaje de peptidil-tRNA generados por traducciones abortivas en ribosomas estancados (Cheverton *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2014).

Trabajo no publicado desarrollado en nuestro laboratorio, muestra que bajo dos distintas condiciones inductoras de estrés oxidativo (20 minutos con 2,5mM de H₂O₂ o 30 min con 1mM de paraquat en LB), ocurre una disminución del 35-40% en el nivel de tRNA aminoacilable aceptor de glicina (tRNA^{Gly}), mientras que la aminoacilación de otros 9 tRNA no muestran diferencias frente al mismo tratamiento (Figura 2). Glicina cuenta con tres isoaceptores: tRNA^{Gly}_{GCC}, que decodifica GGT y GGC; tRNA^{Gly}_{UCC}, que decodifica GGA y GGG; tRNA^{Gly}_{CCC}, que decodifica GGG. Mediante *Northern blot* quisimos determinar si la disminución de tRNA^{Gly} aminoacilable observada bajo estrés oxidativo, era producto de la disminución de alguno de sus isoaceptores. Para sorpresa nuestra, los niveles totales de tRNA^{Gly} permanecieron constantes luego de la inducción de estrés oxidativo (Figura 3A). Esto nos sugiere que una población de los tRNA^{Gly} sería inactivada producto del estrés oxidativo, ya sea por cambios en su patrón de modificaciones químicas o por oxidaciones causadas por la acumulación de moléculas oxidantes. Para determinar cuál de los tRNA^{Gly} es más afectado por el estrés oxidativo, nuestro grupo determinó la fracción aminoacilada *in vivo* para cada uno de los isoaceptores de glicina en bacterias estresadas con 1mM de paraquat, y determinó que ésta disminuye para todos los tRNA^{Gly}, pero en distinta medida según qué tRNA^{Gly} se analiza (Figura 3B). Dada esta diferencia, cabe preguntarse si el efecto sobre la traducción de los codones de glicina se verá afectado de igual medida.

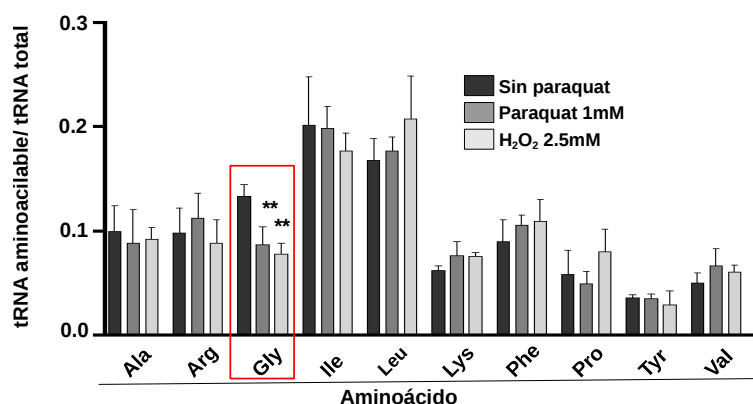


Figura 2. tRNA aminoacilable de *E. coli* disminuye bajo estrés oxidativo. tRNA fueron purificados de *E. coli* K12 MG1655 cultivadas bajo condiciones control (LB) o bajo estrés oxidativo (LB + 1 mM paraquat o 2,5 mM H₂O₂). El total de isoaceptores se calculó del *plateau* de la reacción de aminoacilación usando extracto S100 y el correspondiente aminoácido radioactivo. ** P ≤ 0,01, ANOVA de una vía y posterior test de *Dunnnett* versus control para cada aminoácido.

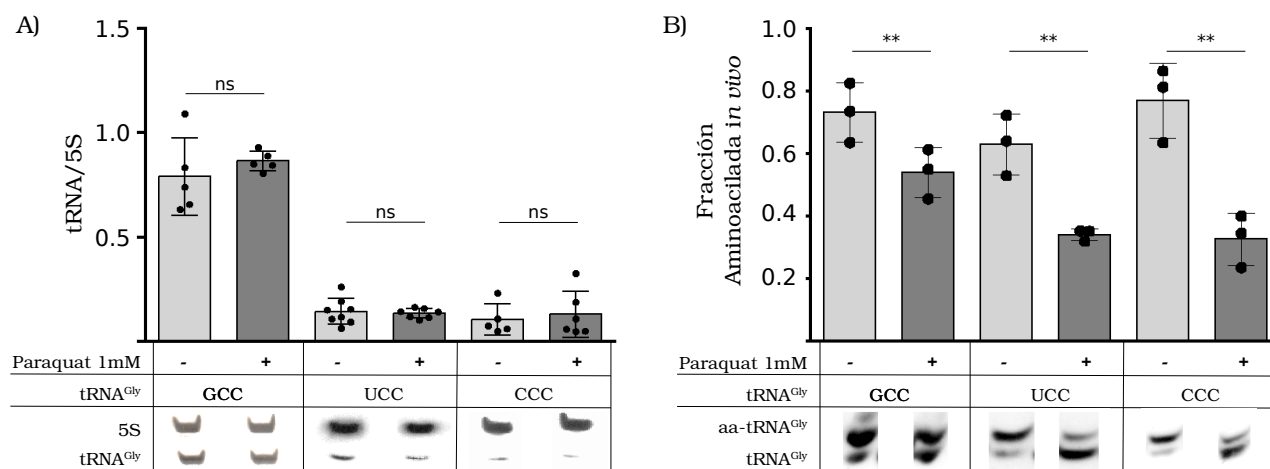


Figura 3. Conservación del total de tRNA^{Gly} y cambios en su fracción aminoacilada *in vivo* en *E. coli* bajo estrés oxidativo. *E. coli* K12 MG1655 fue cultivada bajo condiciones control (LB) o bajo estrés oxidativo (LB + 1 mM paraquat). (A) Extractos de RNA total fueron sometidos a experimentos de *Northern blot* utilizando sondas específicas para cada tRNA isoceptor, se evaluó el cambio en la concentración producto del estrés oxidativo. (B) Se efectuó una extracción ácida de tRNA, con la cual se determinó la fracción aminoacilada de cada isoceptor de glicina. Para ello se eliminó la adenosina terminal de los tRNA desacilados, mediante el método del periodato y luego se realizaron ensayos de *Northern blot*. Prueba *t-student* para determinación de cambios en la concentración de tRNA (A) y Prueba *t-student* pareado para análisis de fracción aminoacilada *in vivo* (B). ** P ≤ 0,01.

Las diferencias observadas en la disminución de los niveles de tRNA aminoacilados *in vivo* para los tres aceptores de glicina, nos sugieren que algunos de ellos son más susceptibles a los efectos del estrés oxidativo. Esto puede deberse tanto a diferencias en su secuencia, como a diferencias en sus modificaciones. Dado que en todos los grupos de tRNA isoceptores se observan este tipo de diferencias en secuencia y modificaciones, podemos suponer que ellos también tienen distinta sensibilidad a los efectos del estrés oxidativo. Considerando que el estrés oxidativo es un tipo de estrés tan recurrente, ¿existirá algún grado de adaptación de los tRNA, que asegure la traducción de los genes que se inducen en respuesta a esta condición de estrés?

Una medida que ha sido utilizada para medir el grado de adaptación del uso de codones a los requerimientos traduccionales de los genes, es el cálculo de *Índice de Adaptación Codogénica* (CAI). Éste busca comparar la frecuencia de uso de cada codón de un gen en cuestión, con el de las proteínas más abundantes de la especie, bajo la premisa que estas cuentan un mayor grado de adaptación del uso de sus codones (*Sharp et al., 1987*). Al comparar el CAI de un grupo de genes inducidos en respuesta a estrés oxidativo, regulado por los factores transcripcionales OxyR, SoxR y SoxS, y el genoma completo de *E. coli*, no observamos diferencias en la distribución de CAI de ambos grupos (Figura 4). Una de las debilidades de este análisis es que considera que

permanecen estáticos todos los factores necesarios para la traducción de los genes analizados, independientemente que éstos sean sintetizados en una condición de estrés. Como se mostró para el caso de glicina, los tRNA son factores dinámicos bajo estrés oxidativo, pudiendo variar los niveles de tRNA activo, así como su nivel de aminoacilación. Por esta razón consideramos que una aproximación experimental para obtener valores de eficiencia traduccional (término utilizado para expresar la cantidad de proteína producida por molécula de mRNA en el tiempo) sería lo más apropiado para comparar grupos de genes que se traducen en diferentes condiciones (*Schwanhäusser et al., 2011*).

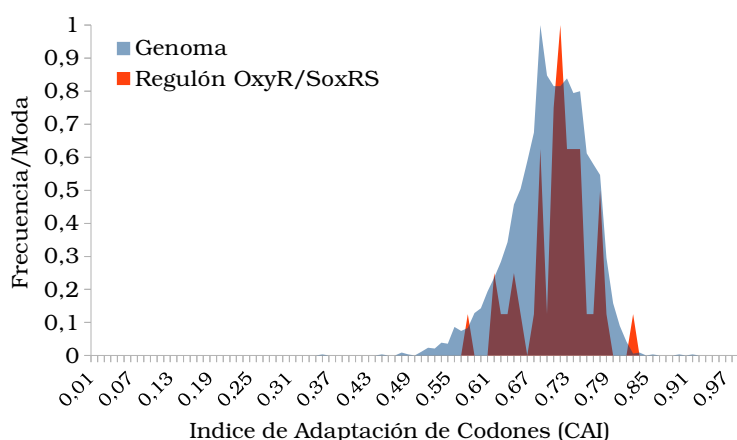


Figura 4. Histograma de los valores de CAI para genes inducidos bajo estrés oxidativo y todos los genes de *E. coli*. Se efectuó el cálculo de CAI para los genes codificantes de *E. coli* K12 MG1655 y para 52 genes (de la misma cepa) cuya transcripción se induce bajo estrés oxidativo, regulados por los factores transcripcionales OxyR, SoxR y/o SoxS (*Seo et al., 2015*).

Muchos autores han intentado correlacionar los valores de CAI con la velocidad de traducción (cantidad de proteína producida en el tiempo) y eficiencia traduccional, sin obtener buenos resultados hasta la fecha. Algunos han logrado observar correlaciones entre velocidades locales durante la elongación y la frecuencia de uso codogénico, que a su vez estaría vinculado con el plegamiento de la proteína naciente (*Yu et al., 2015*). Sin embargo, estos hallazgos se remiten a ciertos modelos biológicos o determinados grupos de genes. Además, pocos estudios consideran los posibles cambios en la estabilidad de las proteínas producto de alteraciones en su plegamiento o disminución en la fidelidad de la traducción (decodificación errónea del código genético) producto de los cambios en la velocidad de traducción (*Prabhakar et al., 2017; Xie et al., 2019*).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se mencionó, es poco lo que se sabe respecto del efecto del estrés oxidativo sobre los componentes de la maquinaria traduccional, particularmente sobre los RNA. Existe una controversia sobre el papel de los sistemas Toxina-Antitoxina para la generación de lmrRNA y ribosomas 70S^{A43}. Independiente de esta controversia y del mecanismo que permite la traducción de lmrRNA, nos propusimos determinar si este tipo de traducción se activa bajo estrés oxidativo, ya que permitiría la traducción de mRNA específicos en condiciones donde la traducción de la mayoría de los mRNA se inhibe.

Por otra parte, cuando comenzó esta tesis se desconocía qué ocurre con los tRNA de *E. coli* bajo estrés oxidativo. Considerando que no todos los tRNA son igualmente susceptibles a la degradación y/o modificación frente a estrés oxidativo, es posible que esté ocurriendo una respuesta diferencial para cada tRNA, donde algunos de ellos sean blanco de modificaciones químicas (pudiendo afectar su interacción con las aminoacil-tRNA sintetasas, la interacción codón-anticodón, entre otras), mientras que otros cambien su concentración (producto de cambios en su síntesis o degradación). Datos experimentales de nuestro laboratorio avalan esta respuesta diferencial de los tRNA, donde al menos los niveles de tRNA^{Gly} aminoacilable disminuyen, aunque desconocemos qué lo provoca y cuáles son sus consecuencias fisiológicas.

Finalmente, resulta importante determinar cómo se relacionan todos estos fenómenos: la disponibilidad y modificaciones de los tRNA bajo estrés oxidativo, la aparición de mecanismos alternativos de iniciación de la traducción, y la adaptación del uso codogénico de transcritos traducidos preferentemente en esta condición.

Por lo tanto, de acuerdo a los antecedentes descritos, en este trabajo se propone la siguiente **Hipótesis**:

"La velocidad de traducción del mensaje genético de Escherichia coli es alterada producto del estrés oxidativo inducido por paraquat: (1) A nivel de la iniciación, debido a una traducción preferencial de lmrRNA por sobre mRNA canónicos, por parte de ribosomas de estrés y (2) a nivel de la elongación, producto de cambios en la eficiencia traduccional de los codones."

En esta tesis se planteó como **Objetivo General** "Determinar el efecto del estrés oxidativo inducido por paraquat sobre la velocidad de traducción del mensaje genético de *Escherichia coli*, producto del aumento en la traducción de lmrRNA mediante mecanismos alternativos a la iniciación canónica, así como por cambios en la eficiencia traduccional durante la elongación".

Los **Objetivos Específicos** fueron:

1. Determinar cambios en la eficiencia traduccional de codones en *E. coli* bajo estrés oxidativo.
2. Analizar la eficiencia de traducción de lmRNA y presencia de ribosomas de estrés (70S^{Δ43}) en *E. coli* bajo estrés oxidativo.
3. Comparar patrones de uso de codones del total de genes de *E. coli* con el de genes transcritos preferentemente bajo estrés oxidativo utilizando datos experimentales de eficiencia traduccional.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

De Sigma se obtuvo: Leucina, isoleucina, valina, glicina, histidina, arginina, prolina, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (PSA), polivinilpirrolidona, BSA fracción V, DNA de salmón, caseína, ácido maleico, tween 20, xilen cianol, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, fosfodiesterasa I de *Crotalus atrox* (PSV).

De Merck se obtuvo: Todas las sales, tampones y solventes grado pro análisis, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), uréa, acrilamida, bisacrilamida, filtros de nitrocelulosa de 0,025 μ m (Millipore).

De Becton Dickinson se obtuvo: Extracto de levadura, triptona, Bacto agar.

De Thermo Scientific se obtuvo: Estreptavidina-HRP, dNTPs, inhibidor de RNasa Ribolock, transcriptasa inversa, estándares de peso molecular 1kb y 100bp, enzimas de restricción *EcoRI*, *XhoI* y *SpeI* con sus respectivos tampones, glicógeno, TRIZOL, fenol ácido pH 4,5.

De Agilent se obtuvo: DNA polimerasa Paq 5000, Herculase II Fusion

De New England Biolabs se obtuvo: DNA ligasa T4, polinucleótido quinasa T4 (PNK T4), enzimas de restricción *NotI*, *PacI* con sus respectivos tampones.

De US Biological se obtuvo: Dodecil sulfato de sodio (SDS), ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), etilendiamino-tetraacético (EDTA).

De Biotium se obtuvo: *GelRed*®.

De Promega se obtuvo: *Wizard*® *Genomic DNA Purification Kit*, fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP), *CellTiter-Glo*® *Reagent*.

De GEHealthcare se obtuvo: Ficoll type 400, membrana de Nylon Amersham Hybond™-N⁺.

De Lafken se obtuvo: agarosa grado analítico.

De Genesee Scientific se obtuvo: cubetas de electroporación con anchura de ranura de 1 mm.

De Integrated DNA Technologies: Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

De Qiagen se obtuvo: QIAprep Spin Miniprep Kit.

De Favorgen se obtuvo: FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit, FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit.

3.2. Cepas bacterianas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente tesis.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Fuente o referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>	Laboratorio Dr. Assaf Katz
<i>E. coli</i> DH5 α λ <i>pir</i>	<i>endA1 hsdR17 glnV44 (= supE44) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 ϕ80dlacΔ(lacZ)M15 Δ(lacZYA-argF)U169 zdg-232::<i>Tn10 uidA::pir</i></i>	Laboratorio Dr. Carlos Santiviago
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::<i>Tn10 proAB</i>⁺ <i>lacI</i>^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i>	Laboratorio Dr. Michael Ibba
<i>E. coli</i> K12 MG1655	<i>K-12 F⁻ λ⁻ ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>	Laboratorio Dr. Assaf Katz
<i>insG-gfp</i>	<i>E. coli</i> K12 MG1655 <i>insG-gfp-mCherry::FRT</i>	Este trabajo
Δ <i>glyVX</i>	K12 MG1655 Δ <i>glyVX::FRT</i>	Este trabajo
Δ <i>mazEF</i>	K12 MG1655 Δ <i>mazEF::FRT</i>	Este trabajo
Δ <i>efp</i>	K12 MG1655 Δ <i>efp::FRT</i>	Laboratorio Dr. Michael Ibba
Δ <i>relA</i>	K12 MG1655 Δ <i>relA::FRT</i>	Laboratorio Dr. Michael Ibba
Δ <i>lon</i>	K12 MG1655 Δ <i>lon::FRT</i>	Laboratorio Dr. Michael Ibba

3.3. Plasmidios

Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o Referencia
pBAD30	Vector inducible por arabinosa, Amp ^R	Laboratorio Dr. Assaf Katz
pS1	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R	Laboratorio Dr. Michael Ibba
pC1	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , inserto: AAC-TAC-CAC-CAG	Laboratorio Dr. Assaf Katz
pC2	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , inserto: TGG-GAA-TTC-AAT	Laboratorio Dr. Assaf Katz
Genoteca de variantes de <i>gfp</i>	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , inserto: Cuatro sucesiones de cada codón	Laboratorio Dr. Assaf Katz
<i>narJ(GGA)-gfp</i>	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , <i>narJ(GGA)-gfp</i>	Este trabajo
<i>narJ(GGC)-gfp</i>	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , <i>narJ(GGC)-gfp</i>	Este trabajo
<i>narJ(GGA)-gfp modificado</i>	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , <i>narJ(GGA)-gfp-horquilla-mCherry</i>	Este trabajo
<i>narJ(GGC)-gfp modificado</i>	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , <i>narJ(GGC)-gfp-horquilla-mCherry</i>	Este trabajo
pKK223-3	Vector inducible por IPTG, Amp ^R	Laboratorio Dr. Assaf Katz
pGlyV	pKK223-3:: <i>glyV</i> , Amp ^R	Este trabajo
pGlyT	pKK223-3:: <i>glyT</i> , Amp ^R	Este trabajo
pGlyU	pKK223-3:: <i>glyU</i> , Amp ^R	Este trabajo
pTyrV	pKK223-3:: <i>TyrV</i> , Amp ^R	Este trabajo
pS1ModNot24	<i>psfGFP-mCherry</i> , Amp ^R , sitio <i>NotI</i> en P _{BAD}	Este trabajo
pSD GFP	pS1ModNot24, Amp ^R , P _{BAD} - SD RNA <i>gfp</i>	Este trabajo
plmRNA GFP	pS1ModNot24, Amp ^R , P _{BAD} - lmRNA <i>gfp</i>	Este trabajo
<i>cI P_{RM}</i>	pS1ModNot24, Amp ^R , P _{BAD} - lmRNA <i>cI-gfp</i>	Este trabajo
<i>katG ACA</i>	pS1ModNot24, Amp ^R , P _{BAD} - 5'UTR(ACA)- <i>katG-gfp</i>	Este trabajo
<i>katG AGA</i>	pS1ModNot24, Amp ^R , P _{BAD} - 5'UTR(AGA)- <i>katG-gfp</i>	Este trabajo

3.4. Oligonucleótidos

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la generación de la genoteca de variantes de GFP.

Nombre de la construcción	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido complementario
pBAD30SFIT/01>Met ATG	5'- <i>tcgag</i> ATGATGATGATGa	5'- <i>ctagt</i> CATCATCATCATc
pBAD30SFIT/02>Trp TGG	5'- <i>tcgag</i> TGGTGGTGGTGGa	5'- <i>ctagt</i> CCACCACCACCACc
pBAD30SFIT/03>Phe TTT	5'- <i>tcgag</i> TTTTTTTTTTTTTa	5'- <i>ctagt</i> AAAAAAAAAAAAAac
pBAD30SFIT/04>Phe TTC	5'- <i>tcgag</i> TTCTTCTTCTTCa	5'- <i>ctagt</i> GAAGAAGAAGAAc
pBAD30SFIT/05>Tyr TAT	5'- <i>tcgag</i> TATTATTATTATa	5'- <i>ctagt</i> ATAATAATAATAc
pBAD30SFIT/06>Tyr TAC	5'- <i>tcgag</i> TACTACTACTACa	5'- <i>ctagt</i> GTAGTAGTAGTAc
pBAD30SFIT/07>Cys TGT	5'- <i>tcgag</i> TGTTGTTGTTGTa	5'- <i>ctagt</i> ACAACAACAACAc
pBAD30SFIT/08>Cys TGC	5'- <i>tcgag</i> TGCTGCTGCTGCa	5'- <i>ctagt</i> GCAGCAGCAGCACc
pBAD30SFIT/09>His CAT	5'- <i>tcgag</i> CATCATCATCATa	5'- <i>ctagt</i> ATGATGATGATGc
pBAD30SFIT/10>His CAC	5'- <i>tcgag</i> CACCACCACCACa	5'- <i>ctagt</i> GTGGTGGTGGTGc
pBAD30SFIT/11>Gln CAA	5'- <i>tcgag</i> CAACAACAACAa	5'- <i>ctagt</i> TTGTTGTTGTTGc
pBAD30SFIT/12>Gln CAG	5'- <i>tcgag</i> CAGCAGCAGCAGa	5'- <i>ctagt</i> CTGCTGCTGCTGc
pBAD30SFIT/13>Asn AAT	5'- <i>tcgag</i> AATAATAATAATa	5'- <i>ctagt</i> ATTATTATTATTc
pBAD30SFIT/14>Asn AAC	5'- <i>tcgag</i> AACAACAACAACa	5'- <i>ctagt</i> GTTGTTGTTGTTc
pBAD30SFIT/15>Lys AAA	5'- <i>tcgag</i> AAAAAAAAAAAAAa	5'- <i>ctagt</i> TTTTTTTTTTTTTc
pBAD30SFIT/16>Lys AAG	5'- <i>tcgag</i> AAGAAGAAGAAGa	5'- <i>ctagt</i> CTTCTTCTTCTTc
pBAD30SFIT/17>Asp GAT	5'- <i>tcgag</i> GATGATGATGATa	5'- <i>ctagt</i> ATCATCATCATCc
pBAD30SFIT/18>Asp GAC	5'- <i>tcgag</i> GACGACGACGACa	5'- <i>ctagt</i> GTCGTCGTCGTCc
pBAD30SFIT/19>Glu GAA	5'- <i>tcgag</i> GAAGAAGAAGAAa	5'- <i>ctagt</i> TTCTTCTTCTTc
pBAD30SFIT/20>Glu GAG	5'- <i>tcgag</i> GAGGAGGAGGAGa	5'- <i>ctagt</i> CTCCTCCTCCTCc
pBAD30SFIT/21>Ile ATT	5'- <i>tcgag</i> ATTATTATTATTa	5'- <i>ctagt</i> AATAATAATAATc
pBAD30SFIT/22>Ile ATC	5'- <i>tcgag</i> ATCATCATCATCa	5'- <i>ctagt</i> GATGATGATGATc
pBAD30SFIT/23>Ile ATA	5'- <i>tcgag</i> ATAATAATAATAa	5'- <i>ctagt</i> TATTATTATTATc
pBAD30SFIT/24>Pro CCT	5'- <i>tcgag</i> CCTCCTCCTCCTa	5'- <i>ctagt</i> AGGAGGAGGAGGc
pBAD30SFIT/25>Pro CCC	5'- <i>tcgag</i> CCCCCCCCCCCCa	5'- <i>ctagt</i> GGGGGGGGGGGGc
pBAD30SFIT/26>Pro CCA	5'- <i>tcgag</i> CCACCACCACCACa	5'- <i>ctagt</i> TGGTGGTGGTGGc
pBAD30SFIT/27>Pro CCG	5'- <i>tcgag</i> CCGCCGCCGCCGCa	5'- <i>ctagt</i> CGGCGGCCGCCGc
pBAD30SFIT/28>Thr ACT	5'- <i>tcgag</i> ACTACTACTACTa	5'- <i>ctagt</i> AGTAGTAGTAGTc
pBAD30SFIT/29>Thr ACC	5'- <i>tcgag</i> ACCACCACCACCACa	5'- <i>ctagt</i> GGTGGTGGTGGTc
pBAD30SFIT/30>Thr ACA	5'- <i>tcgag</i> ACAACAACAACAa	5'- <i>ctagt</i> TGTTGTTGTTGTc

pBAD30SFIT/31>Thr ACG	5'- <i>tcgag</i> ACGACGACGACG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CGTCGTCGTCGTC <i>c</i>
pBAD30SFIT/32>Ala GCT	5'- <i>tcgag</i> GCTGCTGCTGCT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> AGCAGCAGCAGC <i>c</i>
pBAD30SFIT/33>Ala GCC	5'- <i>tcgag</i> GCCGCCGCCGCC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GCCGCCGCCGCC <i>c</i>
pBAD30SFIT/34>Ala GCA	5'- <i>tcgag</i> GCAGCAGCAGC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TGCTGCTGCTGCT <i>c</i>
pBAD30SFIT/35>Ala GCG	5'- <i>tcgag</i> GCGGCGGCGGCG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CGCCGCCGCCGCC <i>c</i>
pBAD30SFIT/36>Val GTT	5'- <i>tcgag</i> GTTGTTGTTGTT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> AACAACAACAAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/37>Val GTC	5'- <i>tcgag</i> GTCGTCGTCGTC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GACGACGACGAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/38>Val GTA	5'- <i>tcgag</i> GTAGTAGTAGT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TACTACTACTAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/39>Val GTG	5'- <i>tcgag</i> GTGGTGGTGGTG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CACCACCACCAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/40>Gly GGT	5'- <i>tcgag</i> GGTGGTGGTGGT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> ACCACCACCACC <i>c</i>
pBAD30SFIT/41>Gly GGC	5'- <i>tcgag</i> GGCGGCGGCGG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GCCGCCGCCGCC <i>c</i>
pBAD30SFIT/42>Gly GGA	5'- <i>tcgag</i> GGAGGAGGAGG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TCCTCCTCCTCC <i>c</i>
pBAD30SFIT/43>Gly GGG	5'- <i>tcgag</i> GGGGGGGGGGG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CCCCCCCCCCCC <i>c</i>
pBAD30SFIT/44>Ser AGT	5'- <i>tcgag</i> AGTAGTAGTAGT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> ACTACTACTACT <i>c</i>
pBAD30SFIT/45>Ser AGC	5'- <i>tcgag</i> AGCAGCAGCAGC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GCTGCTGCTGCT <i>c</i>
pBAD30SFIT/46>Ser TCT	5'- <i>tcgag</i> TCTTCTTCTTCT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> AGAAGAAGAAGAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/47>Ser TCC	5'- <i>tcgag</i> TCCTCCTCCTCC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GGAGGAGGAGGAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/48>Ser TCA	5'- <i>tcgag</i> TCATCATCATCA <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TGATGATGATGAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/49>Ser TCG	5'- <i>tcgag</i> TCGTCGTCGTCG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CGACGACGACGAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/50>Arg AGA	5'- <i>tcgag</i> AGAAGAAGAAGA <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TCTTCTTCTTCT <i>c</i>
pBAD30SFIT/51>Arg AGG	5'- <i>tcgag</i> AGGAGGAGGAGG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CCTCCTCCTCCT <i>c</i>
pBAD30SFIT/52>Arg CGT	5'- <i>tcgag</i> CGTCGTCGTCGT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> ACGACGACGACG <i>c</i>
pBAD30SFIT/53>Arg CGC	5'- <i>tcgag</i> CGCCGCCGCCCG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GCGGCGGCGGCG <i>c</i>
pBAD30SFIT/54>Arg CGA	5'- <i>tcgag</i> CGACGACGACGA <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TCGTCGTCGTCG <i>c</i>
pBAD30SFIT/55>Arg CGG	5'- <i>tcgag</i> CGGCGGCGGCGG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CCGCCGCCGCCG <i>c</i>
pBAD30SFIT/56>Leu TTA	5'- <i>tcgag</i> TTATTATTATTA <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TAATAATAATAAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/57>Leu TTG	5'- <i>tcgag</i> TTGTTGTTGTTG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CAACAACAACAAC <i>c</i>
pBAD30SFIT/58>Leu CTT	5'- <i>tcgag</i> CTTCTTCTTCTT <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> AAGAAGAAGAAGC <i>c</i>
pBAD30SFIT/59>Leu CTC	5'- <i>tcgag</i> CTCCTCCTCCTC <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> GAGGAGGAGGAGC <i>c</i>
pBAD30SFIT/60>Leu CTA	5'- <i>tcgag</i> CTACTACTACTA <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> TAGTAGTAGTAGC <i>c</i>
pBAD30SFIT/61>Leu CTG	5'- <i>tcgag</i> CTGCTGCTGCTG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CAGCAGCAGCAGC <i>c</i>
pBAD30SFIT/C1	5'- <i>tcgag</i> A ACT ACCACCAG <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> CTGGTGGTAGTT <i>c</i>
pBAD30SFIT/C2	5'- <i>tcgag</i> TGGGAATTC AA T <i>a</i>	5'- <i>ctagt</i> ATTGAATTCCCA <i>c</i>

*En *itálica* y *minúscula* se indican los extremos cohesivos generados por las enzimas *Xho*I y *Spe*I.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el clonamiento de los tRNA^{Gly} y tRNA^{Tyr}.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
tRNAglyU5	5'- <i>aattc</i> atctcgaagcgggcgtagttcaatggtagaacgagagcttccc
tRNAglyU5c	5'-gagcttgggaagctctcgttctaccattgaactacgcccgcttcgagatg
tRNAglyU3	5'-aagctctatacgagggttcgattcccttcgcccgtccaatttatct <i>a</i>
tRNAglyU3c	5'- <i>agctt</i> tgataaattggagcgggcgaaggaatcgaacctcgtata
tRNAglyT5	5'- <i>aattc</i> ccaggatgcgggcacgtataatggctattacctcagccttc
tRNAglyT5c	5'-agcttgaaggctgaggaatagccattatac gatcccgcacccctggag
tRNAglyT3	5'-caagctgatgatcggggttcgattcccctgcccgtccaagatgtg <i>a</i>
tRNAglyT3c	5'- <i>agctt</i> gcacatctggagcgggcagcgggaatcgaaccgcacatc
tRNAglyV5	5'- <i>aattc</i> agtagtacgcgggaatagctcagttgtagagcacgaccttgc
tRNAglyV5c	5'-accttggcaaggctcgtgctctaccaactgagctattcccgcgtactactg
tRNAglyV3	5'-caaggtcggggtcgcgagttcgagtctcgtttcccgtcctcaaaatttg <i>a</i>
tRNAglyVc	5'- <i>agctt</i> caaatttggagcgggaaacgagactcgaactcgcgaccccg
tRNATyrV5	5'- <i>aattc</i> ttacccttggtggggttcccagcggcctcaaggagcagactgtaaat
tRNATyrV5c	5'-cggcagatttacgtctgctcccttggccgctcgggaaccccaccaggggtaag
tRNATyrV3	5'-ctgccgtcatcgacttcgaaggttcgaatccttccccaccaccatcactttc <i>a</i>
tRNATyrVc	5'- <i>agctt</i> gaaagtgatgggtgggggaaggattcgaaccttcgaagtcgatga

*En itálica y subrayado se indican los extremos cohesivos generados por las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la presente tesis.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
insG_gfp_Fw	5'-gaaataccccacagccccgaaaaagagccagtcagttgctatgagcaaaactcgagggcaa
P2_mCherry_Rv	5'-tattcatatgttattttagagctcatcca
mcherry_P2_Fw	5'-ctacaaataacatataatcctccttag
insG_p1_Rv	5'-tgaaacgaaataggcatcttggttctgtaatgccagtcaggtgtaggctggagctgcttc
insG_upstream_Fw	5'-acaccagaaccaagattaatgccg
S1sfGFP_3'XhoI_Rv	5'-tgcccattaacatcaccatc
pKK223dir	5'-ctgttttatcagaccgcttc
pKK223inv	5'-atcggctcgtataatgtgtg

NarJ_EcoRI_5'_Fw	5'-ccggaattc aggaggaatttacc atgatcgaactcgtgatt
NarJ_XhoI_3'_GGC_Rv	5'-ccgctcgag gtgctggccgccggtggtgatattca
NarJ_XhoI_3'_GGA_Rv	5'-ccgctcgag gtgctgtctccggtggtgatattca
Str_Yam_Fw	5'-gatctgatccaacaaaaacacggggacccttgcgggggtcccaaaaca
Str_Yam_Rv	5'-catgtgttttggggaccgcccaaggggtccccgtttgtttgtttggatca
glyV_(H1+P1)	5'-gcagaaatgc gaaaattacg aaagcaaat taagtagtac gtgcaggctggagctgcttc
glyX_(H2+P2)	5'-cccgttggg tggctgtgc ctacagcac ttcaaattt catatgaatatcctccttag
glyVXY_upstream	5'-gcatcaggcggatggatgatc
glyVXY_downstream	5'-cctgaggctgtggataactctg
C3	5'-cagctgaacggtctggttatagg
B-SONglyV	5'-gac tcg aac tcg cga ccc cga cct tgg c
B-SONglyU	5'-gaatcgaaccctcgtatagagcttggg
B-SONglyT	5'-gaatcgaaccgcatcatcagcttgg
SONglyU	5'-gcgggcgaagggaatcgaa
SONglyT	5'-gcgggcagcgggaatcgaa
V7-K12	5'-gtgatccaaccgaggttccctac
V43-K12	5'-ccacatgctccaccgc
X15_rRNA	5'-tacgacttcacccagct
Y12_rRNA	5'-taaggaggtgatccaaccgc
S7_rRNA	5'-agaatgccacggtgaatcag
pre16S_rv	5'-atcagacaatctgtgtgagcac

3.5. Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Todas las cepas utilizadas en este estudio fueron crecidas en los medios de cultivo líquido LB (1 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % NaCl), M9 (47,7 mM Na₂HPO₄, 22,0 mM KH₂PO₄, 8,6 mM NaCl, 18,7 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,4 % glicerol), M9r (medio M9 suplementado con 50 µg/mL isoleucina, 50 µg/mL leucina, 50 µg/mL valina), M9-Triptona (M9 suplementado con 0,1 % triptona), o bajo en fosfato suplementado con aminoácidos (40 mM MOPS, 4 mM Tricina, 50 mM KCl, 10 mM NH₄Cl, 0,2 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgSO₄, 10 µM FeCl₃, 0,4 % glucosa, 50 µg/mL histidina, 50 µg/mL arginina, 50 µg/mL prolina, 50 µg/mL leucina, 50 µg/mL treonina, 50 µg/mL isoleucina y 50 µg/mL valina) (*Bochner et al., 1982*).

Luego de la transformación de plasmidios o productos de PCR algunas cepas fueron recuperadas en LB o SOC (2 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa).

Los cultivos rutinarios en medio sólido se realizaron en medio LB suplementado con 15 g/L agar-agar. Todos los cultivos fueron realizados en condición aeróbica a 37 °C, a excepción de las cepas transformadas con plasmidios de replicación termosensible (pKD46 y pCP20), que fueron crecidos a 30 °C. Cuando fue necesario eliminar estos plasmidios, las cepas se cultivaron sin antibiótico a una temperatura no permisiva (42 °C).

Según se indica en los experimentos, a los medios de cultivo se les agregó IPTG (100 µM), glicina (50 µg/mL), arabinosa (0,4 %) y/o paraquat (250 µM, 700 µM, o 1 mM). En los casos que fue necesario se agregaron antibióticos a las siguientes concentraciones: ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, cloranfenicol 20 µg/mL.

3.6. Técnicas básicas de biología molecular

3.6.1. Extracción de DNA cromosomal

Las cepas se cultivaron en 5 mL de caldo LB (con el antibiótico correspondiente, en caso de contar con genes de resistencia para su selección) durante toda la noche con agitación a 37 °C. Luego se extrajo DNA cromosomal utilizando el sistema comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 mL de cultivo saturado fue sedimentado, resuspendido en 600 µL de solución de lisis (*Nuclei Lysis Solution*) e incubado a 80 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 1 hora, en presencia de 20 µg/mL de RNasa A. Luego, se adicionaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*), se incubó en hielo durante 5 minutos, y se sedimentó por centrifugación durante 3 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue trasladado a un tubo limpio, y se agregó igual volumen de isopropanol, para la precipitación del DNA. Luego de sedimentar por centrifugación, el DNA fue lavado con etanol 70 %, secado, resuspendido en 100 µL de solución de rehidratación (*Rehydration Solution*), e incubado a 65 °C durante 1 hora. El material extraído se mantuvo a -20 °C.

3.6.2. Extracción de DNA plasmidial

Las cepas se cultivaron en 5 mL de caldo LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche con agitación a 30 °C o 37 °C, según corresponda. El total del cultivo fue sedimentado, y se realizó la extracción de DNA plasmidial utilizando los sistemas comerciales *FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen) o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), según las indicaciones del fabricante. Ambos métodos se basan en el protocolo de extracción de DNA plasmidial mediante lisis alcalina (*Birnboim et al., 1979; Ish-Horowicz et al.,*

1981), e incluyen un paso de limpieza en columnas de silicagel. Para mejorar la eficiencia de elución de este último paso, las columnas fueron incubadas a 50 °C con agua nanopura durante 5 minutos, y luego centrifugadas a temperatura ambiente, a 14000 x g durante 5 minutos. El material extraído se mantuvo a -20 °C.

3.6.3. Extracción de RNA total

A partir de un preinóculo en caldo LB o M9-Triptona, las bacterias se cultivaron en 5 mL de caldo LB o M9r, respectivamente, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,6), a 37 °C con agitación. Una vez alcanzada la DO600 requerida, se tomó 1,5 mL de cultivo bacteriano, se centrifugó durante 1 minuto a 12000 x g a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas en 50 µL de tampón de lisis (80,65 mM Tris HCl pH 8,0, 3,23 mM EDTA pH 8,0, 1,61 % SDS, 3,59 % β-mercaptoetanol) e incubadas a 37 °C por 3 minutos. Se agregó 1,125 mL de TRIzol, y luego se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se agregaron 150 µL de cloroformo. Luego de agitar vigorosamente, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, para luego ser centrifugada durante 15 minutos a 12000 x g a 4 °C. Luego de trasladar la fase acuosa de la mezcla a un tubo limpio, se agregó igual volumen de isopropanol, y se incubó por 30 minutos a -20 °C antes de centrifugar durante 30 minutos a 12000 x g a 4 °C. Finalmente, el RNA sedimentado fue lavado con etanol 70 %, secado y resuspendido en 26 µL de agua libre de RNasas. El material extraído se mantuvo alicuotado a -80 °C.

3.6.4. Purificación de DNA de reacciones de PCR y digestiones

Fragmentos de DNA provenientes de reacciones de PCR o reacciones de digestión, fueron purificados utilizando el sistema comercial *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit* (Favorgen), según las indicaciones del fabricante. Aquellas reacciones que tenían como resultado más de un fragmento de DNA, fueron cargadas en geles de agarosa (0,7 – 2,0 %) teñidos con *GelRed®* (Biotium) 0,5x, y separadas de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis. Las bandas de interés fueron cortadas desde el gel, pesadas y procesadas siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.6.5. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Los geles para la electroforesis se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0,7 y 2,0% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), agregando 0,5x de la tinción *GelRed®* (Biotium). Las muestras se mezclaron con 1/6 de volumen de tampón de carga 6x (15% Ficoll-400, 66 mM EDTA, 0,102% SDS, 0,09% azul de bromofenol, 19,8 mM Tris-HCl pH 8,0) antes de ser cargadas en el gel. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 80 y 100 V. Los resultados de la electroforesis fueron visualizados y fotografiados sobre

un transiluminador UV, con una cámara digital (*Kodak Digital Science DC120 Zoom Digital Camera*).

3.6.6. Preparación y transformación de células electrocompetentes

Se utilizó este método para transformar reacciones de ligación de DNA que tuvieron baja eficiencia al utilizar células quimiocompetentes, y para llevar a cabo los protocolos de recombinación homóloga con productos de PCR. Brevemente, a partir de un preinóculo en caldo LB, las bacterias se cultivaron en 50 mL de caldo LB, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,6). En el caso de cepas que contenían el plasmidio pKD46, caldo LB con ampicilina fue inoculado directo desde la placa, y cultivado a 30 °C con agitación. Una vez alcanzada la DO600 requerida, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 5000 x g a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas en 30 mL de agua nanopura estéril fría, y luego nuevamente centrifugadas 5 minutos a 5000 x g a 4 °C. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de agua nanopura estéril. Paralelamente, el DNA fue dializado en filtros de nitrocelulosa de 0,025 µm de tamaño de poro (Millipore) sobre agua nanopura, durante al menos 30 minutos.

Para la transformación, se mezcló en cubetas frías de electroporación con anchura de ranura de 1 mm (*Genesee Scientific*) 10 µL de reacción de ligación o 20 µL de productos de PCR, más el volumen de células electrocompetentes necesario para completar 100 µL de mezcla. Esta última fue sometida a un pulso eléctrico de 2,4 kV en un electroporador *Gene Pulser Xcell* (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación, se agregó 1 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C por 1 h, sin agitación. Una vez transcurrido este tiempo, las células transformadas se sembraron en agar LB con los antibióticos correspondientes, y se incubó toda la noche a 37 °C.

3.6.7. Preparación y transformación de células quimiocompetentes

Se prepararon células quimiocompetentes para la transformación de plasmidios y reacciones de ligación de DNA, con el método de CaCl₂ (*Cohen et al., 1972*). Brevemente, a partir de un preinóculo en caldo LB, las bacterias se cultivaron en 50 mL de caldo LB, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,6). Una vez alcanzada la DO600 requerida, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 2700 x g a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas suavemente en 15 mL de una solución fría de 80 mM MgCl₂ y 20 mM CaCl₂. Luego de centrifugar durante 10 minutos a 2700 x g a 4 °C y remover el sobrenadante, las células se resuspendieron en 2 mL de 100 mM CaCl₂.

Para la transformación, se mezclaron 10 ng de plasmidio o 10 µL de reacción de ligación, con 200 µL de células quimiocompetentes. La mezcla fue incubada durante 30 minutos en hielo, luego se transfirió a 42 °C durante 90 segundos, y luego se volvió a transferir a hielo durante 1 a 2 minutos. Inmediatamente después de la transformación, se agregó 1 mL de caldo LB o SOC y se incubó a 37 °C por 1 h, sin agitación. Los plasmidios de

origen termosensible, como pKD46 y pCP20, fueron incubados a 30 °C. Una vez transcurrido este tiempo, las células transformadas se sembraron en agar LB con los antibióticos correspondientes, y se incubó toda la noche a la temperatura correspondiente (37 °C o 30 °C).

3.6.8. PCR de colonias

Como primer método de verificación de clonamiento en plasmidios y eventos de mutagenesis a nivel cromosomal, se realizaron reacciones de PCR a partir de las colonias crecidas en el medio de selección. Para esto, parte de la colonia fue resuspendida en 100 µL de agua destilada estéril, calentados a 98 °C durante 15 minutos, y centrifugados a máxima velocidad durante 5 minutos. Estos sobrenadantes fueron utilizados como templado para la mezcla de reacción, siguiendo las siguientes recetas y programas de temperaturas, según las instrucciones del proveedor.

Tabla 6. PCR colonia con *Pfu* DNA polimerasa y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
Suspensión bacteriana	2,0 µL	-	95 °C	2 min	1 ciclo
Tampón 10 x <i>Pfu</i> *	2,0 µL	1 x			
dNTPs [2,5 mM c/u]	2,0 µL	0,25 mM c/u	95 °C	30 s	35 ciclos
Partidor directo [10 µM]	0,1 µL	0,05 µM	T° <i>annealing</i>	30 s	
Partidor inverso [10 µM]	0,1 µL	0,05 µM	72 °C	1 min/kb	
<i>Pfu</i> (DNA pol.)*	0,2 µL	-	72 °C	5 min	1 ciclo
Agua	13,6 µL	-	4 °C	∞	-

*tampón 10 x *Pfu* (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM (NH₄)SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % tritón X-100, 1 mg/mL BSA, 100 mM KCl).

Tabla 7. PCR colonia con *Paq 5000* DNA polimerasa y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
Suspensión bacteriana	2,0 µL	-	98 °C	2 min	1 ciclo
Tampón 10 x <i>Paq5000</i>	2,0 µL	1 x			
dNTPs [10 mM c/u]	0,4 µL	0,2 mM c/u	95 °C	20 s	35 ciclos
Partidor directo [10 µM]	0,4 µL	0,2 µM	T° <i>annealing</i>	20 s	
Partidor inverso [10 µM]	0,4 µL	0,2 µM	72 °C	1 min/kb	
<i>Paq 5000</i> (DNA pol.) [5 U/µL]	0,2 µL	0,05 U/µL	72 °C	2 min	1 ciclo
Agua	13,4 µL	-	4 °C	∞	-

3.7. Análisis de cambios en la eficiencia traduccional

Para la determinación de cambios en la eficiencia traduccional, se utilizó un sistema genético con los genes reporteros *superfold green fluorescent protein (sfGFP)* e *itag-mCherry*, fusionados transcripcionalmente en el

plasmidio pS1 (o pBAD30SFIT; *Rojas et al., 2018*). Este plasmidio fue utilizado para la construcción de una genoteca de variantes de GFP, en el sitio de clonamiento entre las enzimas *XhoI* y *SpeI*, mediante la hibridación de los oligonucleótidos complementarios (sección 3.7.1) indicados en la tabla 3 (sección 3.4). Esto permitió ingresar insertos con sucesiones de cuatro codones idénticos (una variante por cada codón) entre el 5^{to} y 8^{vo} codón del gen de *sfgfp*. Los plasmidios resultantes de esta genoteca fueron purificados, y utilizados para transformar células quimiocompetentes (sección 3.6.7) de la cepa *E. coli* K12 MG1655. Finalmente, se realizaron cinéticas de la producción de los reporteros fluorescentes para la determinación de cambios en la eficiencia traduccional de cada uno de los clones, en medio M9r (control) y M9r más paraquat (estrés) (sección 3.7.2).

3.7.1. Hibridación y clonamiento de oligonucleótidos complementarios

A partir de oligonucleótidos sintéticos se generaron pequeños insertos de DNA doble hebra con extremos cohesivos, tal como si estos hubieran sido generados por la digestión de enzimas de restricción. Para llevar a cabo esto, se fosforiló el extremo 5' de cada oligonucleótido con la enzima polinucleótido quinasa T4 (PNK T4, NEB) de acuerdo a la siguiente receta, durante 30 minutos a 37 °C.

Tabla 8. Reacción de fosforilación con PNK T4.

Componentes de la reacción	Volúmen	Concentración
Oligonucleótido [10 µM]	5 µL	2,5 µM
Tampón PNK T4 10 x (NEB)	2 µL	1 x
ATP [10 mM]	2 µL	1 mM
PNK T4 (NEB) [10 U/µL]	1 µL	0,5 U/µL
Agua libre de nucleasas	10 µL	-

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, 5 µL de la reacción de un oligonucleótido fueron mezclados con 5 µL de la reacción del oligonucleótido complementario. Esta mezcla fue calentada por 5 minutos a 95 °C en un bloque termoregulado, y enfriada lentamente en el mismo equipo hasta alcanzar la temperatura ambiente. La mezcla con los oligonucleótidos hibridados fue diluida en una proporción 1: 6 con agua libre de nucleasas. Esta mezcla fue utilizada como inserto en la reacción de ligación que se indica a continuación, e incubada a 16 °C toda la noche.

Tabla 9. Reacción de ligación con DNA ligasa T4 .

Componentes de la reacción	Volúmen	Concentración
Tampón DNA ligasa T4 10x (NEB)	2 μ L	1 x
Inserto	1 μ L	-
Vector digerido (50 ng)	-	2,5 ng/ μ L
DNA ligasa T4 (NEB) [400 U/ μ L]	1 μ L	0,5 U/ μ L
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 μ L	-

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, 10 μ L de esta mezcla se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de alguna cepa de clonamiento (*E. coli* DH5 α o *E. coli* XL1 Blue).

3.7.2. Análisis de cambios en la eficiencia traduccional

A partir de preinóculos en medio M9-Triptona, las bacterias se cultivaron en 3 mL de medio M9r con ampicilina, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,6). Una vez alcanzada la DO600 requerida, una alícuota de 50 μ L del cultivo fueron diluídos en 150 μ L de medio M9r fresco, suplementado con 0,4 % arabinosa y 250 μ M de paraquat (concentraciones finales), en placas oscuras de 96 pocillos con fondo óptico (Thermo). Las placas fueron medidas durante 12 horas en un espectrofotómetro/fluorímetro de placas (INFINITE M200PRO, TECAN) a 37 °C, intercalando agitación orbital (142 rpm, 6mm amplitud, 4 minutos), agitación lineal (296 rpm, 6 mm amplitud, 4 minutos), medición de DO600 e intensidad de fluorescencia de GFP (Ex. 480 \pm 4,5 nm, Em. 515 \pm 10 nm) y mCherry (Ex. 555 \pm 4,5 nm, Em. 600 \pm 10 nm), en ciclos de 10 minutos.

Para análisis adicionales con los codones de glicina, se introdujeron algunos cambios en el experimento, tales como la utilización de medio M9r para los preinóculos, una mayor concentración de paraquat (700 μ M), y la suplementación de 50 μ g/mL de glicina, cuando está indicado.

Para el análisis de los datos, se sustrajeron los valores de fluorescencia intrínseca de GFP y mCherry de acuerdo al número de células (DO600), a partir de la curva de fluorescencia versus DO600 realizada con la cepa *E. coli* K12 MG1655 transformada con el plasmidio pBAD30. Los datos de eficiencia traduccional fueron expresados como la razón GFP/mCherry.

3.8. Predicción de estructura secundaria del extremo 5' de los mRNA

Para realizar la predicción de estructura secundaria y estabilidad, se utilizaron los primeros 150 nucleótidos de cada transcrito (región 5' no codificante y región codificante) y fueron analizados en el servidor en línea “RNAalifold WebServer” (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>) (Bernhart *et al.*, 2008). Posteriormente, las estructuras predichas fueron convertidas de notación *Dot-Bracket* a la notación

BEAR (*Brand nEw Alphabet for RNAs*) (Mattei et al., 2014), y comparadas una a una en el servidor “Web-Beagle” (<http://beagle.bio.uniroma2.it/>) (Mattei et al., 2015). Finalmente, se utilizó el software Rstudio para realizar el agrupamiento de estructuras utilizando el algoritmo *K-means* (MacQueen, 1967).

3.9. Verificación de regulación de la traducción en genes con alto porcentaje de codones GGA

Para realizar el análisis de cambios en la eficiencia de la traducción, asociados a codones de glicina en el contexto de genes silvestres de *E. coli*, se construyó una fusión traduccional del operón *gfp-mCherry* al gen *insG*, el cual posee un alto contenido de codones GGA. Para realizar esta fusión a nivel cromosómico, se utilizó un método de recombinación homóloga con productos de PCR (Figura 5).

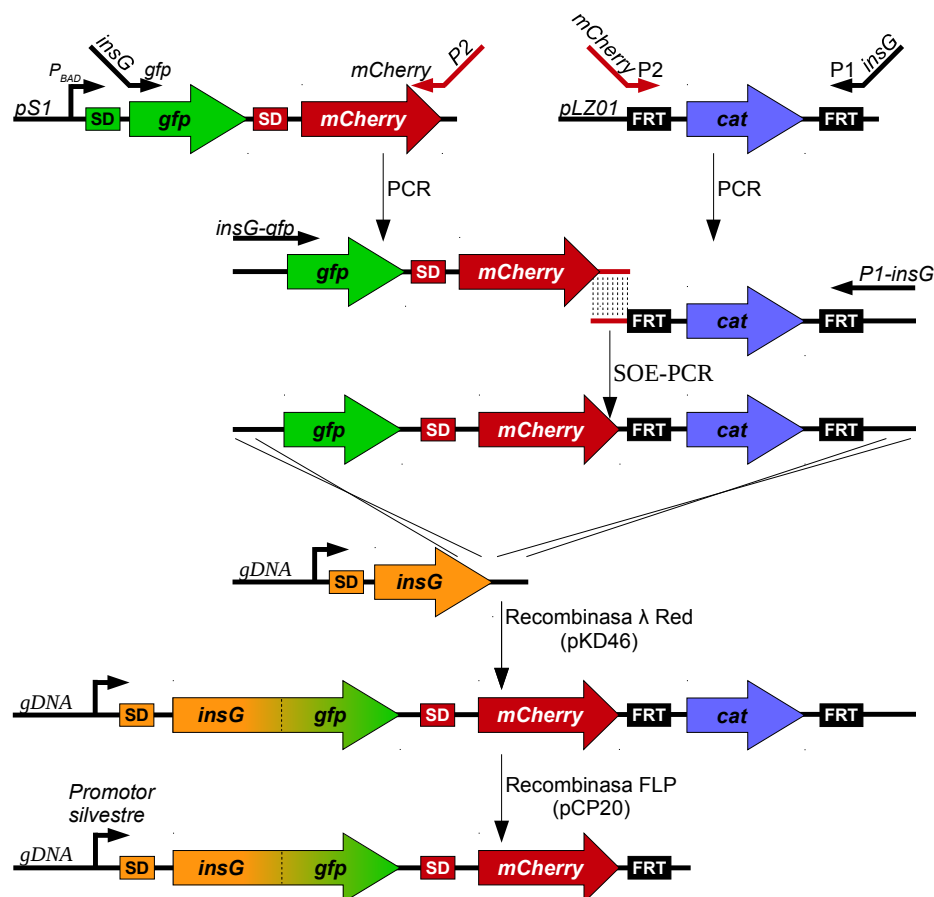


Figura 5. Representación esquemática de la construcción de fusiones cromosomales a *gfp-mCherry*. En una primera etapa se muestra como fue generado el producto para la recombinación mediante SOE-PCR (*splicing by overlap extension PCR*), y posteriormente fue utilizado el método de recombinación homóloga con productos de PCR. Las flechas rojas y negras en la parte superior, representan los partidores utilizados para la reacción de PCR.

3.9.1. Construcción de productos de PCR para la generación de fusiones traducionales

Primero se generaron dos productos de PCR de manera independiente. El primero de ellos corresponde a un producto que contiene los genes *gfp* y *mCherry*. Para esto se utilizaron los partidores *insG_gfp_Fw* y *P2_mCherry_Rv*, los cuales hibridan con los primeros 20 nucleótidos de *gfp* y con los últimos 20 nucleótidos de *mCherry*, adicionando 40 nucleótidos de la región río arriba del codón de detención de *insG* y 10 nucleótidos de la región P2 presente en el otro producto de PCR, respectivamente. El segundo producto de PCR corresponde a la amplificación del *cassette* de resistencia a cloranfenicol desde el plasmidio pLZ01 (Blondel et al., 2013). Para esto se utilizaron los partidores *mcherry_P2_Fw* e *insG_p1_Rv*, los cuales hibridan con 20 nucleótidos de la región P2 y P1 (que flanquean el *cassette* de resistencia) adiciona 10 nucleótidos del extremo del otro producto de PCR y 40 nucleótidos río abajo del codón de detención de *insG*, respectivamente (Figura 5). Para ambas reacciones se utilizaron las mismas condiciones de reacción, las cuales se indican a continuación.

Tabla 10. Reacción de PCR Herculase II Fusion y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA (30 ng)	2,0 µL	-	95 °C	1 min	1 ciclo
Tampón 5 x Herculase II Fusion	13,0 µL	1 x			
dNTPs [10 mM c/u]	1,65 µL	0,2 mM c/u	95 °C	20 s	25 ciclos
Partidor directo [10 µM]	1,65 µL	0,2 µM	58 °C	20 s	
Partidor inverso [10 µM]	1,65 µL	0,2 µM	72 °C	90 s	
Herculase II Fusion	0,65 µL	-	72 °C	2 min	1 ciclo
Agua	44,5 µL	-	4 °C	∞	-

Estos productos de PCR fueron purificados, mezclados en concentraciones equimolares, y utilizados como templado para fusionarlos en un único producto de PCR, mediante *splicing by overlap extension PCR* (SOE-PCR) con los partidores *insG_gfp_Fw* e *insG_p1_Rv* (Horton et al., 1989). Para esto se realizaron dos reacciones. En la primera de ellas se mezclaron ambos productos de PCR sin partidores, para promover la hibridación y extensión de las cadenas, y en la segunda se agregaron partidores para promover la producción exponencial del producto fusionado.

Tabla 11. Reacción de SOE-PCR (reacción 1) y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA 1 (120 fmol)	-	-	95 °C	1 min	1 ciclo
DNA 2 (120 fmol)	-	-			
Tampón 5 x Herculase II Fusion	4,0 µL	1 x	95 °C	20 s	35 ciclos
dNTPs [10 mM c/u]	0,5 µL	0,2 mM c/u	58 °C	20 s	
Herculase II Fusion	0,4 µL	-	72 °C	90 s	
Total	20 µL		72 °C	2 min	1 ciclo

Tabla 12. Reacción de SOE-PCR (reacción 2) y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA reacción 1	5,0 µL	-	95 °C	1 min	1 ciclo
Tampón 5 x Herculase II Fusion	20,0 µL	1 x			
dNTPs [10 mM c/u]	2,5 µL	0,2 mM c/u	95 °C	20 s	30 ciclos
Partidor directo [10 µM]	2,5 µL	0,2 µM	58 °C	20 s	
Partidor inverso [10 µM]	2,5 µL	0,2 µM	72 °C	2 min	
Herculase II Fusion	1,0 µL	-	72 °C	5 min	1 ciclo
Agua	66,5 µL	-	4 °C	∞	-

3.9.2. Incorporación de productos de PCR mediante recombinación homóloga

Se transformó la cepa *E. coli* K12 MG1655 con el plasmidio pKD46 como se indica en la sección 3.6.7. Esta cepa transformada fue crecida en 50 mL de caldo LB con ampicilina, a 30 °C con agitación. Una vez que el cultivo alcanzó una DO600 de ~ 0,3, fue suplementado con 10 mM de L-arabinosa. Luego se continuó su crecimiento hasta una DO600 ~ 0,6, y se electrotransformó con se indica en la sección 3.6.6, con el producto de PCR preparado previamente. Los clones verificados mediante PCR de colonias con los partidores insG_upstream_Fw y S1sfGFP_3'XhoI_Rv, fueron transducidos a un *background* genético limpio de *E. coli* K12 MG1655, haciendo uso de bacteriófago P1vir (Sauer, 2011).

Para eliminar el *cassette* de resistencia a cloranfenicol, las cepas fueron transformadas con el plasmidio pCP20 y seleccionadas en placas de agar LB con ampicilina. Este plasmidio contiene el gen que codifica la recombinasa FLP, la cual reconoce los sitios FRT que flanquean el *cassette* de resistencia y cataliza el corte y ligación de los extremos generados, dejando como cicatriz una copia del sitio FRT. Posteriormente, se eligieron al azar algunas de las colonias obtenidas y se sembraron en placas con ampicilina, e incubaron a 30 °C durante toda la noche. Estas colonias fueron resembradas por duplicado en placas sin antibiótico, e incubadas a 42 °C durante toda la noche. Esto fue repetido hasta obtener colonias sensibles a ampicilina y cloranfenicol.

3.9.3. Cuantificación de reporteros fluorescentes a partir de extractos de proteínas

A partir de preinóculos en medio M9r, se cultivaron en 50 mL de medio M9r con ampicilina, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,6). Una vez alcanzada la DO600 requerida, se retiró la mitad del cultivo y se centrifugó 10 minutos a 7000 x g. Estos cultivos fueron resuspendidos en 1 mL de PBS, sonicados y centrifugados durante 2 minutos a máxima velocidad. Al cultivo restante se agregó 700 µM de paraquat y se incubó a 37 °C con agitación durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue tratado de igual manera que el cultivo control. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford, y la intensidad de fluorescencia de los reporteros GFP (Ex. 480±4,5 nm, Em. 515±10 nm) y mCherry (Ex. 555±4,5 nm, Em. 600±10 nm).

3.10. Verificación de regulación de la traducción en genes con repeticiones de codones GGA

Para realizar el análisis de cambios en la eficiencia de la traducción asociados a codones de glicina en el contexto de genes silvestres de *E. coli*, se construyó una fusión traduccional de un gen con sucesiones del codón GGA al gen de *gfp*, en el vector pS1. Para llevarlo a cabo, se amplificó la secuencia del gen *narJ* desde DNA genómico de *E. coli* K12 MG1655 utilizando las parejas de partidores NarJ_EcoRI_5'_Fw y NarJ_XhoI_3'_GGC_Rv, y NarJ_EcoRI_5'_Fw y NarJ_XhoI_3'_GGA_Rv. Esta combinación de partidores permitió amplificar la secuencia codificante del gen *narJ* entre el codón de inicio y el codón que precede el codón de detención, incorporando una secuencia de corte para la enzima *EcoRI* en el extremo 5', y una secuencia de corte para la enzima *XhoI* en el extremo 3'. Con el uso del partidador inverso NarJ_XhoI_3'_GGC_Rv se efectuó la mutación en la sucesión de codones GGA-GGA, cambiándola por GGC-GGC. Para ambas reacciones se utilizaron las mismas condiciones de reacción, las cuales se indican a continuación.

Tabla 13. Reacción de PCR Herculase II Fusion y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA (130 ng)	2,0 µL	-	95 °C	2 min	1 ciclo
Tampón 5 x Herculase II Fusion	13,0 µL	1 x	95 °C	20 s	30 ciclos
dNTPs [10 mM c/u]	1,65 µL	0,2 mM c/u	63 °C	20 s	
Partidor directo [10 µM]	1,65 µL	0,2 µM	72 °C	20 s	
Partidor inverso [10 µM]	1,65 µL	0,2 µM	72 °C	2 min	1 ciclo
Herculase II Fusion	0,65 µL	-	72 °C	2 min	1 ciclo
Agua	44,5 µL	-	4 °C	∞	-

Tanto el vector pS1 como los productos de PCR de *narJ* fueron purificados, digeridos secuencialmente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, y posteriormente ligados con la enzima DNA ligasa T4, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Adicionalmente, con el objetivo de reducir los efectos sobre el inicio de la traducción de *mCherry* producto de cambios traduccionales en *gfp*, se incorporó una secuencia que forma una horquilla estable entre los genes de *gfp* y *mCherry*. Esta estructura facilita el desacoplamiento de ribosomas que provienen de la traducción de *gfp* y resbalan hasta *mCherry*, promoviendo su inicio de la traducción (Yamamoto *et al.*, 2016). Esta secuencia fue incorporada por hibridación y clonamiento de los oligonucleótidos complementarios Str_Yam_Fw y Str_Yam_Rv (sección 3.7.1), entre los sitios de restricción de las enzimas *BglII* y *PciI*.

Para comparar los cambios en la eficiencia traduccional de ambas construcciones, se realizaron mediciones de la fluorescencia de los genes reporteros de acuerdo a lo indicado en la sección 3.7.2, utilizando medio M9r para los preinóculos y una concentración de 700 µM de paraquat.

3.11. Análisis de mutantes de *glyVX*

Para analizar el efecto traduccional causado por cambios en los niveles de tRNA^{Gly}, independiente de efectos colaterales causados por el estrés oxidativo, se construyó una mutante con una menor dosis de genes de tRNA^{Gly_{GCC}} (*E. coli* K12 MG1655 Δ *glyVX::FRT*), mediante reemplazo alélico por recombinación de productos de PCR (Datsenko et al., 2000).

En primer lugar se amplificó el *cassette* de resistencia a cloranfenicol del plasmidio pLZ01 con los partidores *glyV* (H1+P1) y *glyX* (H2+P2), los cuales hibridan con 20 nucleótidos de la región P1 y P2 (que flanquean el *cassette* de resistencia) y 40 nucleótidos río arriba y río abajo de los genes *glyV* y *glyX*, respectivamente (Blondel et al., 2013). Esta reacción fue realizada siguiendo las condiciones que se indican a continuación.

Tabla 14. Reacción de PCR Herculase II Fusion y programa de temperaturas.

Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA (50 ng)	2,0 μ L	-	95 °C	1 min	1 ciclo
Tampón 5 x Herculase II Fusion	13,0 μ L	1 x			
dNTPs [10 mM c/u]	1,65 μ L	0,2 mM c/u	95 °C	20 s	35 ciclos
Partidor directo [10 μ M]	1,65 μ L	0,2 μ M	58 °C	20 s	
Partidor inverso [10 μ M]	1,65 μ L	0,2 μ M	72 °C	90 s	
Herculase II Fusion	0,65 μ L	-	72 °C	2 min	1 ciclo
Agua	44,5 μ L	-	4 °C	∞	-

Posteriormente, el producto de PCR fue purificado y transformado de acuerdo a lo indicado en la sección 3.9.2. La verificación de las mutantes fue efectuada mediante PCR de colonia con los partidores *glyVXY_{upstream}*, *glyVXY_{downstream}* y C3. De acuerdo a como se indica en la sección 3.9.2, la mutación fue transducida a la cepa silvestre y el *cassette* de resistencia escindido, dejando una cicatriz FRT en el *loci* de los genes *glyV* y *glyX*. Los niveles de tRNA^{Gly_{GCC}} fueron verificados mediante *Northern blot* con la sonda B-SONglyV.

Finalmente esta cepa fue transformada con los vectores pBAD30SFIT/40>Gly|GGT|, pBAD30SFIT/41>Gly|GGC|, pBAD30SFIT/42>Gly|GGA| y pBAD30SFIT/43>Gly|GGG|, y se comparó la eficiencia traduccional de todos los reporteros de acuerdo a lo indicado en la sección 3.7.2, utilizando medio M9r para los preinóculos.

3.12. Análisis de cepas sobreproductoras de tRNA^{Gly}

Dado que en *E. coli* K12 MG1655 muchos de los genes de tRNA^{Gly} son de copia única, la mayoría veces la delección de éstos resulta ser letal para las bacterias. En vista que dentro del grupo de tRNA^{Gly} únicamente podemos hacer ese tipo de análisis para el tRNA^{Gly_{GCC}}, analizamos el efecto de cambios en los niveles de los tRNA sobre la fisiología de *E. coli* sobreexpresando los tRNA^{Gly} en el vector pKK223-3.

3.12.1. Clonamiento de tRNA^{Gly} en plasmidio pKK223-3

E. coli K12 MG1655 posee seis tRNA aceptores de glicina codificados en su genoma. Cuatro de estos tRNA son idénticos (*glyV*, *glyW*, *glyX* y *glyY*) y reconocen los codones más frecuentes de glicina (GGC y GGU). Los dos tRNA de glicina restantes reconocen codones de bajo uso, siendo *glyU* el que reconoce el codón GGG y *glyT* capaz de reconocer GGG y GGA (Chang et al., 2009; Grosjean et al. 2010). Para estudiar el efecto de los cambios en el nivel de tRNA de glicina en respuesta a estrés oxidativo, se clonó un gen de tRNA para cada anticodón (*glyV*, *glyU* y *glyT*) entre los sitios *EcoRI* y *HindIII* del plasmidio pKK223-3, mediante hibridación de oligonucleótidos complementarios (sección 3.7.1). Para utilizar como control, se clonó un gen de tRNA aceptor de tirosina (*tyrV*) que no presentó cambios en sus niveles frente a estrés oxidativo (Figura 2).

Los clones (obtenidos previamente en el laboratorio) fueron verificados mediante PCR de colonia, utilizando los partidores pKK223dir y pKK223inv, y una temperatura de *annealing* de 51 °C. De aquellos clones cuyo inserto correspondía al tamaño de los tRNA, se purificaron los plasmidios para confirmar la ausencia de mutaciones mediante secuenciación. Luego éstos se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* K12 MG1655 y realizar los experimentos que se detallan a continuación.

3.12.2. Curvas de crecimiento

A partir de un preinóculo en caldo LB (inoculado directo desde el stock a -80 °C), se inocularon 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina e IPTG, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,7). Una vez alcanzada la DO600 requerida, se preparó una suspensión bacteriana con 2 DO (en 1 mL). Se utilizaron 50 µL de esta suspensión para inocular 150 µL del mismo medio de cultivo (control) o medio más 1 mM de paraquat, en placas multipocillo (96 pocillos). Los crecimientos y mediciones fueron realizados en un espectrofotómetro de placas (INFINITE M200PRO, TECAN) a 37 °C, intercalando agitación orbital (142 rpm, 6mm amplitud, 4 minutos) y agitación lineal (296 rpm, 6mm amplitud, 4 minutos), en ciclos de 10 minutos.

3.12.3. Ensayos de movilidad bacteriana en placa

Para estos ensayos se utilizaron placas con medio semisólido (LB agar 0,3%), suplementado con 100 µg/mL ampicilina y 100 µM IPTG. Cuando se indica, 500 µM de paraquat fueron agregados a las placas. Las placas fueron preparadas el mismo día de cada ensayo, por lo que fue necesario esperar que el exceso de humedad de la superficie se evaporara antes de utilizarlas.

A partir de un preinóculo en caldo LB, se inocularon 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina e IPTG, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 ~ 0,7). Una vez alcanzada la DO600 requerida, se sedimentó por centrifugación 1,5 mL de cultivo y se preparó una suspensión

bacteriana de 1 mL con DO600 de 1, y se inocularon las placas con y sin paraquat, con 5 μ L de cada cepa. Las placas fueron incubadas durante 8 horas (control) o 24 horas (paraquat) en una cámara húmeda, a 30 °C. El diámetro de nado fue medido y expresado como el tamaño relativo respecto a la cepa transformada con el plasmidio parental (pKK223-3; cuyo diámetro fue de 62 ± 5 mm en condición control y 19 ± 10 mm en presencia de paraquat) (Ha et al., 2014).

3.12.4. Determinación de niveles de 5',5'''-P1, P4 diadenosin tetrafosfato (Ap4A)

A partir de un preinóculo en medio líquido bajo en fosfato suplementado con aminoácidos y ampicilina, se cultivaron 5 mL del mismo medio suplementado con IPTG, a 37 °C con agitación, hasta una fase de crecimiento exponencial temprana (DO600 \sim 0,7). Una vez alcanzada la DO600 requerida, 1 mL del cultivo fue mezclado con ácido perclórico (10% (peso/peso) final) y luego neutralizado con KOH. Al cultivo restante se le agregó 700 μ M de paraquat y se incubó a 37 °C con agitación, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 1 mL y fue tratada de igual manera que la primera. Mediante centrifugación a máxima velocidad fueron sedimentados los restos celulares y sales de la neutralización (Brevet et al. 1989, Ibba et al., 1999). El ATP de cada muestra fue removido usando 0,0125 unidades/ μ L de fosfatasa alcalina (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Promega), durante 3 horas a 37 °C. Luego, esta enzima fue inactivada por calor incubando la reacción a 80 °C durante 1 hora.

Finalmente, para determinar los niveles de 5',5'''-P1, P4 diadenosin tetrafosfato (Ap4A) se mezclaron 15 μ L de muestra, 5 μ L de tampón de reacción (250 mM HEPES pH 7,8, 50 mM $MgCl_2$) y 25 μ L de Luciferasa (*CellTiter-Glo*® Reagent, Promega). Luego de incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (para consumir los remanentes de ATP), se agregaron 5 μ L de 10 mg/mL de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (fosfodiesterasa I de *Crotalus atrox*, Sigma P4506) preparada en 100 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 10 % Glicerol. La luminiscencia proveniente de la producción de ATP a partir del Ap4A fue detectada en un luminómetro de microplacas Luminoskan™ Ascent. La concentración de Ap4A fue estimada a partir de curvas estándar realizadas con Ap4A comercial.

3.12.5. Determinación de niveles *in vivo* de aminoacilación

Para determinar los niveles de tRNA aminoacilado *in vivo* se realizó una purificación de RNA total en condiciones ácidas y posteriormente se eliminó el último nucleótido del extremo 3' de los tRNA desaminoacilados mediante oxidación con $NaIO_4$ y β -eliminación (Salazar et al, 2004). Estas muestras fueron resueltas por electroforesis en geles desnaturalantes (8M Urea) de poliacrilamida (10 %), y posteriormente analizadas por *Northern blot*.

3.12.5.1. Extracción de RNA total en condiciones ácidas

A partir de un preinóculo en caldo LB, se tomaron 300 μL de cultivo para inocular 50 mL de caldo LB. Éste se cultivó a 37 °C hasta una DO600 entre 0,6-0,9. Una vez alcanzada la DO600 requerida, se tomaron 15 mL del cultivo bacteriano, se centrifugó durante 6 minutos a 10000 x g a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Al cultivo restante se le agregó 1 mM de paraquat, y se incubó con agitación constante durante 30 minutos a 37 °C. Las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas en 500 μL de 300 mM NaAcO pH 5,2, 1 mM EDTA. Luego de resuspender las bacterias, se agregaron 500 μL de fenol ácido y se agitó vigorosamente durante 10 minutos a 4 °C. La mezcla fue centrifugada durante 6 minutos a 10000 x g a 4 °C. Luego se tomaron 500 μL de la fase acuosa y se mezclaron con 1 mL de etanol absoluto, para precipitar los ácidos nucleicos. Estas muestras fueron incubadas durante 30 minutos a -80 °C. En este intervalo se tomaron 15 mL del cultivo sometido a estrés oxidativo y se trató de igual manera que la fracción anterior. Una vez transcurridos los 30 minutos, las muestras a -80 °C fueron sedimentadas por centrifugación a 20000 x g durante 20 minutos, lavadas con una solución 75 % etanol, 10 mM NaAcO PH 5,2, y resuspendidas en 50 μL de agua nanopura (saturada de CO₂ atmosférico). De esta última, se tomó una alícuota de 25 μL y se mezcló con 1,42 μL de NaAcO 3M pH 5,2 (muestra A), mientras que los 25 μL restantes fueron mezclados con 6,25 μL de Tris-AcO 1M pH 9,0 (muestra B). La muestra B fue incubada durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, la muestra B fue precipitada con 3,13 μL de NaAcO 3M pH 5,2 y 62,5 μL de etanol absoluto, e incubada durante 30 minutos a -80 °C. Transcurrido este tiempo la muestra B fue sedimentada por centrifugación durante 20 minutos a 20000 x g a 4 °C, lavada con 70 % etanol, secada, y resuspendida en 26,4 μL de 160 mM NaAcO pH 5,2. Luego de este tratamiento tenemos una muestra A que conserva el grado de aminoacilación de sus tRNA y una muestra B totalmente desaminoacilada.

Desde este punto las muestras A y B fueron tratadas en paralelo. Ambas muestras fueron mezcladas con 4,84 μL de 250 mM NaIO₄, e incubadas durante 90 minutos en hielo y oscuridad. Transcurrido este tiempo, se agregaron 12,97 μL de glucosa 20 %, y se incubó durante 90 minutos más en hielo y oscuridad. Posteriormente, se agregaron 4,3 μL de 3M NaAcO pH 5,2, 87 μL de etanol absoluto, y se incubó 30 minutos a -80 °C. Las muestras fueron sedimentadas por centrifugación durante 20 minutos a 20000 x g, resuspendidas en 250 μL de lisina 0,5 M pH 8,0, e incubadas durante 60 minutos a 45 °C. Luego de agregar 25 μL de NaAcO y 500 μL de etanol absoluto, se incubó durante 30 minutos a -80°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 20 minutos a 20000 x g, se lavó el sedimento con 70 % etanol, y se resuspendió en 15 μL de agua nanopura. La concentración de RNA total se determinó a partir de la lectura de absorbancia a 260 nm.

3.12.5.2. Electroforesis en geles desnaturantes

Una vez obtenido el RNA total, la muestra fue resuelta en geles desnaturantes de poliacrilamida (39 cm de largo, 4 mm de espesor; 10% Acrilamida/Bis 19:1, 0,5X TBE, 0,085 % PSA, 0,171 % v/v TEMED, 8M Urea), el cual se pre-corrió a 45 *Watt* (~1200 V) por al menos 20 minutos, utilizando tampón 0,5X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA). Paralelamente, las muestras de RNA fueron mezcladas con tampón de carga 2X (8 M urea, 0,025 % azul de bromofenol, 0,025 % xilen cianol, 50 % glicerol, 0,5X TBE), calentadas a 95 °C durante 2 minutos, e incubadas 1 minuto en hielo. Para analizar los niveles de tRNA^{Gly_{GCC}} (*glyV*), tRNA^{Gly_{UCC}} (*glyT*) y tRNA^{Gly_{CCC}} (*glyU*), se cargaron 500 ng, 1000 ng y 3000 ng de RNA total, respectivamente. Para iniciar la corrida de las muestras se utilizó un voltaje de 60 V. Una vez que éstas ingresaron al gel, se subió el voltaje y se mantuvo una potencia constante de 45 *Watt* durante toda la corrida. Una vez terminada la electroforesis se realizó la electrotransferencia a una membrana de Nylon, utilizando tampón 0,5X TBE a 20 V durante 2 horas 15 minutos. Finalmente, las muestras de RNA fueron fijadas a la membrana utilizando el equipo *UV Stratalinker 2400*, para irradiarlas con 120000 µJoules.

3.12.5.3. Northern blot

Previo a la realización del *Northern blot* se prepararon las soluciones 20X SSC (3 M NaCl, 300 mM citrato de sodio) y reactivo de Denhardt's 50X (1 % Ficoll Type 400, 1 % Pirlivinilpirrolidona, 1 % BSA fracción V).

Luego de fijar las muestras de RNA a la membrana de Nylon, las membranas se incubaron durante 30 minutos con el tampón de prehibridación (6X SSC, 5X reactivo de Denhardt's, 0,1 % SDS, 100 µg/mL DNA de Salmón) precalentado a 42 °C. Luego de descartar esta solución, se agregó tampón de hibridación (6X SSC, 0,1 % SDS, 100 µg/mL DNA de Salmón) precalentado a 42 °C y las sondas específicas para cada tRNA. Para detectar tRNA^{Gly_{GCC}} se utilizó la sonda *caliente* (radiomarcada con ³²P) B-SONglyV a una concentración final de 2,5 nM. Para detectar tRNA^{Gly_{UCC}} se utilizó la sonda *caliente* B-SONglyT a una concentración final de 37 nM, y la sonda *fría* (no radiomarcada) SON_glyT a una concentración final de 12 nM. Para detectar tRNA^{Gly_{CCC}} se utilizó la sonda *caliente* B-SONglyU a una concentración final de 37 nM, y la sonda *fría* SON_glyU a una concentración final de 12 nM. Luego de incubar las membranas con las sondas toda la noche a 42 °C, se realizó un lavado fuerte con 2X SSC, 0,1 % SDS, durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se realizaron dos lavados suaves con 0,1X SSC, 0,1 SDS, durante 15 minutos cada uno a la temperatura de hibridación. Una vez terminados los lavados, las membranas fueron secadas, envueltas en plástico transparente (*Alusa Plast*), y expuestas en una pantalla de fósforo fotoestimulable. Ésta fue revelada en un escáner láser *Typhoon 900* (GE Healthcare).

3.13. Estimación de la contribución de cada codón en la traducción de GFP

A partir de los datos del cociente de las intensidades de fluorescencia de GFP y mCherry (GFP/mCherry) obtenidos para cada uno de los codones en condición control y bajo estrés oxidativo, se estimó la contribución de cada codón. Para esto se generó un sistema de ecuaciones lineales en que “Y” corresponde a una matriz de una columna con el valor de la razón GFP/mCherry para cada una de las variantes de GFP. Además se generó una matriz de 62 columnas y 64 filas, que llamaremos “X”. La primera columna es una constante de valor 1, y las 61 columnas restantes corresponden a la frecuencia o número de repeticiones de cada codón en GFP. Las filas de esta matriz también corresponden a cada una de las variantes de GFP.

Para resolver este sistema de ecuaciones primero se obtuvo la matrix traspuesta X^T , a partir de X. Posteriormente se calculó el producto entre la matriz X y X^T . De esta nueva matriz ($X \cdot X^T$), se obtuvo la matriz inversa $(X \cdot X^T)^{-1}$. Finalmente, se realizó el producto de las matrices $(X \cdot X^T)^{-1}$, X^T e Y, obteniendo una matriz de una columna y 62 filas. La primera de las filas corresponde al valor de la constante de la ecuación lineal, y las 61 filas restantes corresponden a la contribución en el valor GFP/mCherry de cada codón.

Para el modelo que utiliza las frecuencias de cada codón en GFP se utilizó un modelo lineal de la contribución de cada codón, de modo que los resultados obtenidos luego de resolver el sistema de ecuaciones corresponde directamente a la contribución de cada codón. Para resolver el sistema de ecuaciones del modelo exponencial éste debió ser linealizado mediante la aplicación de logaritmo a cada uno de sus factores. Es por esto que la matriz Y se construyó con el logaritmo natural de los valores GFP/mCherry, mientras que la matrix X se contruyó con el cociente entre el número de repeticiones de cada codón y el largo de GFP (número de aminoácidos) menos 1 (codón de inicio). La resolución del sistema de ecuaciones nos entrega el logaritmo natural de la constantes y la contribución de cada codón en el valor GFP/mCherry.

3.14. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el *software GraphPad Prism 6.0*. Para las comparaciones entre dos grupos de datos cuya distribución era normal y sus varianzas semejantes, se utilizó la prueba de *t-student* para datos no pareado. Para la comparaciones entre dos grupos de datos cuya distribución no era normal, se utilizó el test no paramétrico de los rangos con signo de *Wilcoxon*, o la prueba de *t-student* con corrección de *Welch*. Para analizar varios grupos de datos cuya distribución era normal y sus varianzas semejantes, se utilizó ANOVA de una vía y posterior test de *Dunnet* para comparaciones múltiples. Para analizar varios grupos de datos cuya distribución no era normal o sus varianzas eran muy distintas, se utilizó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* y luego de este se realizó la comparación múltiple con el test de *Dunn*.

4. RESULTADOS

4.1. Búsqueda de cambios en la eficiencia traduccional de codones bajo estrés oxidativo

4.1.1. Determinación de los efectos del estrés oxidativo sobre la eficiencia traduccional usando el vector pS1

Distintos estudios de cinética traduccional postulan que la iniciación corresponde a la etapa limitante del proceso de traducción, producto del tiempo requerido para el reconocimiento del mRNA y posterior ensamblaje del complejo de iniciación (Gualerzi *et al.*, 2015; Hersh *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos investigadores sostienen que eventos que afectan la velocidad de elongación también pueden tener un papel preponderante en la tasa de síntesis de proteínas. Por ejemplo, factores tales como la estructura del mRNA, velocidad de formación del enlace peptídico, características fisicoquímicas de los aminoácidos del péptido naciente, abundancia de aa-tRNA, entre otros (Zhu *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2008; Rodnina *et al.*, 2016; Hersh *et al.*, 2014). Esto captó nuestra atención, y quisimos analizar cómo cambios globales gatillados por el estrés oxidativo podían alterar la velocidad de lectura de los codones que componen el código genético, durante la elongación.

Para realizar este análisis se utilizó un sistema bicistrónico reporteros fluorescentes: GFP y mCherry (Figura 6A). Éste se encuentra codificado en un plasmidio de bajo número de copias, bajo el control transcripcional del promotor P_{BAD} . Este diseño nos permite cuantificar el efecto de distintos insertos en el reportero GFP según la intensidad de fluorescencia verde (proporcional a la cantidad de proteína producida y su tasa de síntesis), al normalizarla por la intensidad de fluorescencia roja del reportero mCherry (proporcional a la cantidad de mRNA). En la Figura 6B se muestran gráficas representativas de las cinéticas de aparición de los reporteros fluorescentes, luego de su inducción con arabinosa. En condición control (medio M9r) podemos observar que los valores de fluorescencia normalizados por cantidad de células (DO600) son muy bajos en la primera hora postinducción, pero cercanos a las dos horas éstos incrementan a una tasa constante. Luego de tres horas, las curvas de fluorescencia alcanzan una meseta que se mantiene en el tiempo. Por otra parte, observamos que bajo estrés oxidativo la tasa de síntesis de los reporteros cae drásticamente, lo que concuerda con reportes de una disminución generalizada en el proceso traduccional inducida bajo estrés oxidativo (Zhu *et al.*, 2019). Al normalizar los valores de GFP por mCherry, eliminamos de nuestro análisis las diferencias ocurridas a nivel transcripcional entre ambas condiciones. Las gráficas GFP/mCherry, que desde ahora llamaremos eficiencia traduccional, muestran un comportamiento asintótico cuyo valor tiende a la razón entre las velocidades de aparición de GFP y mCherry. Dado que los bajos valores de intensidad de fluorescencia previo a las dos horas contribuyen a una alta dispersión en la razón GFP/mCherry, y que luego de las tres horas el efecto de la degradación de las proteínas toma relevancia, muchas de las comparaciones se realizaron considerando los valores de eficiencia traduccional obtenidos a las dos horas de inducción de los reporteros.

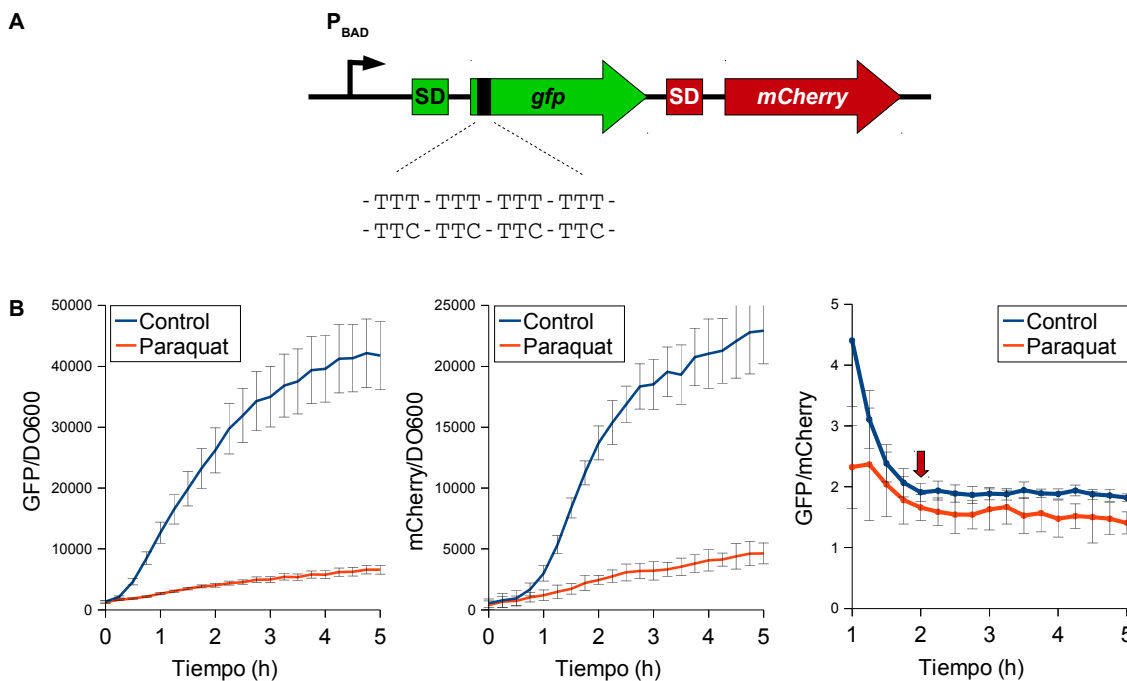


Figura 6. Sistema bicistrico de genes reporteros. **A)** Esquema de la fusión transcripcional de los genes *gfp* y *mCherry*. Se muestra el sitio de inserción de secuencias entre el 5^{to} y 8^{vo} codón de *gfp*. **B)** Cinética de fluorescencia de GFP (izquierda) y mCherry (centro) normalizados por DO600 y la razón de éstos en el tiempo (derecha), luego de su inducción con arabinosa. Mediciones realizadas en medio M9r y M9r más 250 μ M de paraquat.

4.1.2. Análisis sistemático de eficiencias traduccionales bajo estrés oxidativo

Utilizando insertos con sucesiones de cuatro codones idénticos (una variante por cada codón), se construyó una genoteca con 61 variantes de la proteína GFP (Figura 6), y se analizó la eficiencia traduccional (relación GFP/mCherry) de cada una de ellas, en dos condiciones: medio mínimo M9r y estrés oxidativo en medio mínimo M9r más 250 μ M de paraquat (concentración utilizada en otros trabajos para el estudio de estrés oxidativo en nuestra misma cepa de estudio). Los resultados obtenidos (Figura 7) muestran que la selección de un codón altera la velocidad de síntesis de GFP aún cuando dos codones codifiquen un mismo aminoácido. Estas drásticas diferencias se hacen evidentes en aminoácidos como arginina, serina, prolina y leucina. Por ejemplo, GFP se produce 7 veces más rápido al usar codones TTG, en lugar de CTC, aún cuando ambas secuencias codifican sucesiones de leucina.

Al categorizar los aminoácidos según características fisicoquímicas de sus cadenas laterales, observamos que los grupos ácidos tienen una baja eficiencia traduccional para todos sus codones en condición control (M9r). Esta disminución parece no estar vinculada con la frecuencia de uso de los codones de aspartato y glutamato, ya que sus porcentajes de frecuencia de uso (5,7% y 7,0%, respectivamente) en genes de proteínas altamente

expresadas en *E. coli* K12 MG1655 es similar a la media de frecuencia de uso del total de aminoácidos ($5,0 \pm 2,9\%$) (Tabla anexo 1) (Thanaraj *et al.*, 1996). Cuando comparamos los niveles de tRNA descritos en la literatura, observamos que el porcentaje de isoaceptores de aspartato y glutamato (3,7% y 7,3%, respectivamente) también es muy próximo a la media del total de tRNA ($5,0 \pm 3,5\%$) (Tabla anexo 1) (Dong *et al.*, 1996). Además, se ha descrito en la literatura que estos tRNA tienen altos niveles de aminoacilación *in vivo* (Avcilar-Kucukgoze *et al.*, 2016). Todo esto nos sugiere que la baja eficiencia traduccional se debe principalmente al carácter ácido de los aminoácidos, y no a bajas concentraciones de los aminoacil tRNA.

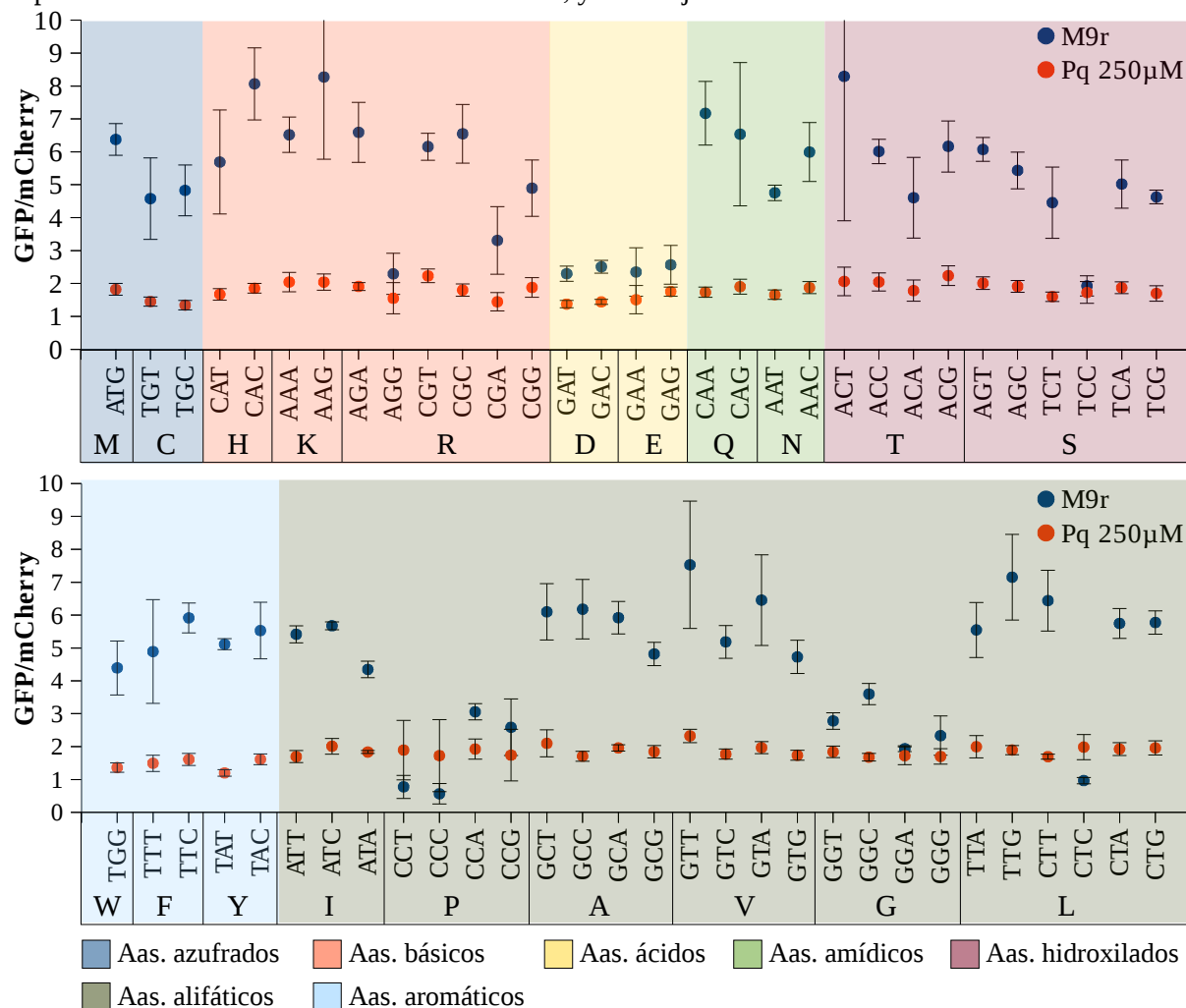


Figura 7. Análisis de eficiencia traduccional de codones codificantes en *E. coli*. Análisis de eficiencia traduccional (GFP/mCherry) utilizando reporteros *gfp* y *mCherry*, para estimar cambios traduccionales de los 61 codones codificantes bajo estrés oxidativo. Todas las mediciones fueron realizadas en medio M9r, tras la inducción de la producción del transcrito con 0,4% arabinosa, a 37 °C con agitación. La inducción de estrés oxidativo fue efectuada con 250 μM de paraquat, el que se adicionó al mismo tiempo que la arabinosa en los casos correspondientes. Los aminoácidos fueron agrupados de acuerdo a sus grupos funcionales.

Algunos investigadores han descrito que la eficiencia de la traducción puede verse influenciada por la naturaleza de los aminoácidos del péptido naciente. Por ejemplo, debido a la estructura cíclica de la cadena lateral del aminoácido prolina, su incorporación en la traducción es más lenta (Pavlov *et al.*, 2009). Esto concuerda con nuestros datos de eficiencia traduccional de prolina, que al igual que glicina, posee una menor eficiencia traduccional que el resto de aminoácidos en condición control (Figura 7) (Chevance *et al.*, 2014; Balakrishnan *et al.*, 2014; Avcilar-Kucukgoze *et al.*, 2016). Estas observaciones coinciden con resultados de *ribosome profiling* publicados recientemente, donde se observa que los codones de aspartato, prolina y glicina se traducen a una menor velocidad (aunque los medios de cultivo tenían diferencias importantes respecto a la disponibilidad de aminoácidos) (Mohammad *et al.*, 2019). Sin embargo, contradicen un fenómeno observado para aminoácidos con carga. Algunos autores han descrito que en el canal de salida del ribosoma hay una mayor densidad de cargas negativas, lo cual contribuiría a que péptidos con aminoácidos ácidos tengan una mayor tasa traduccional que péptidos con aminoácidos básicos, en bacterias (Lu *et al.*, 2008).

Cuando observamos los datos de eficiencia traduccional bajo estrés oxidativo, lo primero que salta a la vista es una disminución global en las mediciones de los reporteros de casi todos los codones (Figura 7). A esto se suma un estrechamiento en el rango dinámico de las eficiencias traduccionales de la genoteca. Para confirmar que en estas condiciones el método permite discriminar distintas velocidades de elongación, se compararon los datos de la genoteca con las mediciones del control S1. Este corresponde al vector original utilizado para la construcción de la genoteca, y que fue incluido como control interno en cada una de las réplicas del ensayo. Dado el alto número de réplicas de este control, podíamos determinar si éstos correspondían a la misma población de los datos obtenidos para la genoteca. Sin embargo, al igual que en condición control, bajo estrés oxidativo los valores de S1 corresponden a una población distinta a la genoteca, y de menor eficiencia traduccional (Figura 8). Similares diferencias fueron observadas para el control C1, el cual posee un inserto de cuatro codones elegidos al azar, que incrementó la eficiencia traduccional del reportero.

Producto del estrechamiento en el rango dinámico de los datos obtenidos bajo estrés oxidativo, es difícil determinar si la disminución generalizada es proporcional para la mayoría de los codones, a través de la mera búsqueda de correlaciones con los datos en bruto. En la Figura 9A se puede observar cierta linealidad entre los grupos de datos, pero con una pendiente baja, como se espera por la disminución del rango dinámico. Esto sugiere que algunos de los cambios inducidos bajo estrés oxidativo enlentecen alguna etapa de la traducción en que el contenido codogénico es menos relevante, como por ejemplo la iniciación, terminación y/o reciclaje.

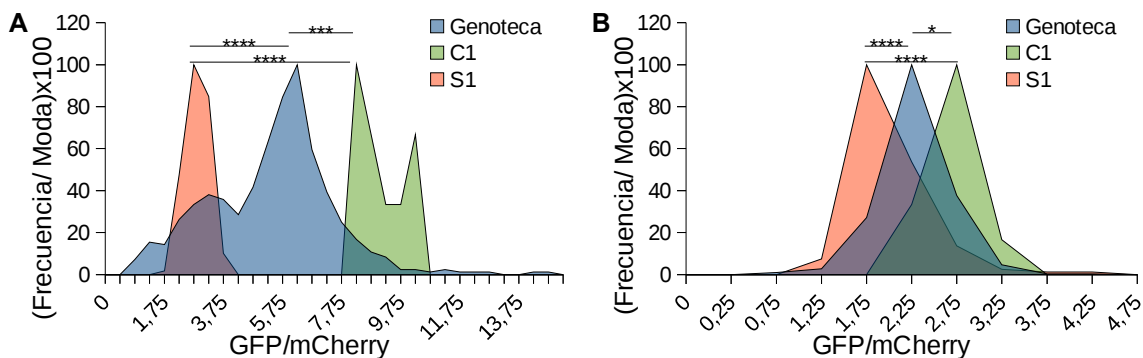


Figura 8. Distribución de las eficiencias traduccionales de la genoteca y controles. Histograma de frecuencia normalizada por la moda de las eficiencias traduccionales (x100), obtenidas del análisis de una genoteca de variantes de *gfp*, y los controles S1 y C1. Mediciones realizadas en condición control (A) y bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat (B). Cada réplica se consideró un valor independiente. Análisis por test de *Kruskal-Wallis* y posterior comparación múltiple con test de *Dunn*.

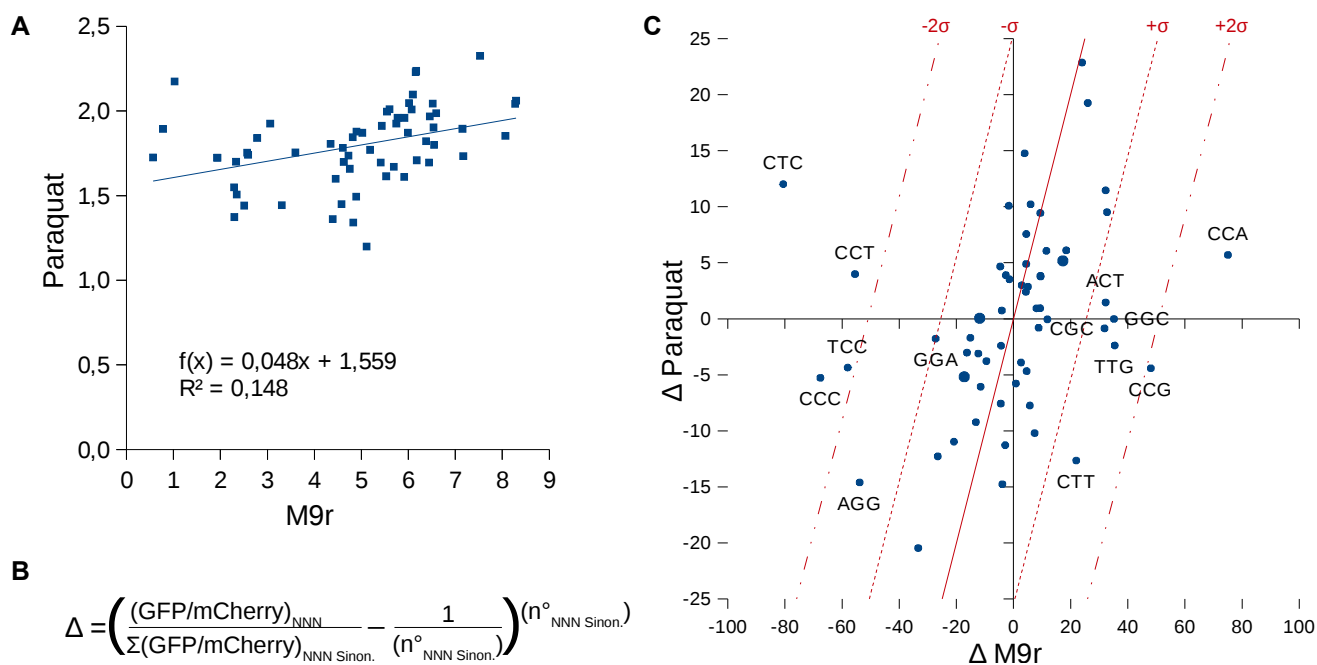


Figura 9. Distribución de los cambios de eficiencias de traducción de la genoteca entre condición de estrés y control. A) Comparación de los valores de eficiencia traduccional (GFP/mCherry) obtenidos para cada condición: M9r y M9r suplementado con 250 μ M de paraquat. B) Fórmula para el cálculo de delta (Δ), valor que da cuenta de la distancia entre eficiencia traduccional de cada codón normalizada por la sumatoria de eficiencias traduccionales de los codones sinónimos de un aminoácido, y el valor que se hubiera obtenido si todos los codones que codifican un aminoácido se tradujeran a la misma velocidad. Este valor (término entre paréntesis) es normalizado por el número de codones sinónimos. C) Comparación de los delta obtenidos para una condición de estrés oxidativo (paraquat) versus la condición control (M9r). Las líneas rojas indican la desviación estándar de los valores de delta, graficados respecto a una recta de pendiente 1.

Para comparar con mayor detalle los cambios de eficiencia traduccional en grupos de codones sinónimos, se calculó la distancia respecto al valor esperado si todos los codones fueran traducidos a la misma velocidad (Delta; Figura 9B). Con esto distinguimos tres grupos de codones: un grupo central de 46 codones con una fuerte correlación entre los datos de eficiencia traduccional en ambas condiciones de cultivo (donde no se vería afectado cuál es el codón más rápido/lento para un aminoácido), y otros dos grupos de 10 y 5 codones, que se alejan una o dos desviaciones estándar del grupo central, respectivamente (Figura 9C). Esto se puede interpretar como cambios globales en la traducción producto del estrés oxidativo inducido con paraquat que afectan un grupo central de codones, además de cambios que afectan de manera particular la traducción de glicina (GGA, GGC), leucina (CTC, CTT, TTG), prolina (CCA, CCT, CCC, CCG), arginina (AGG, AGC), serina (TCC) y treonina (ACT) (subrayados los codones que se alejan más de 2 desviación estándar).

Como se mencionó, la eficiencia traduccional disminuye para la mayor parte de los codones bajo estrés oxidativo. Sin embargo, algunos codones que mostraron una baja eficiencia traduccional en condición control, como TCC (serina) y GGA (glicina), mantuvieron sus valores bajo estrés oxidativo, equiparándose a los codones con mayor eficiencia (Figuras 7 y 10A). Por otra parte, algunos codones de prolina (CCT y CCC) y leucina (CTC) incrementaron su eficiencia traduccional bajo estrés oxidativo (Figuras 7 y 10A). Estos resultados sugieren que parte de la maquinaria traduccional encargada del reconocimiento de estos codones, está sufriendo alteraciones que compensan la disminución global de eficiencia traduccional observada para el resto de los codones.

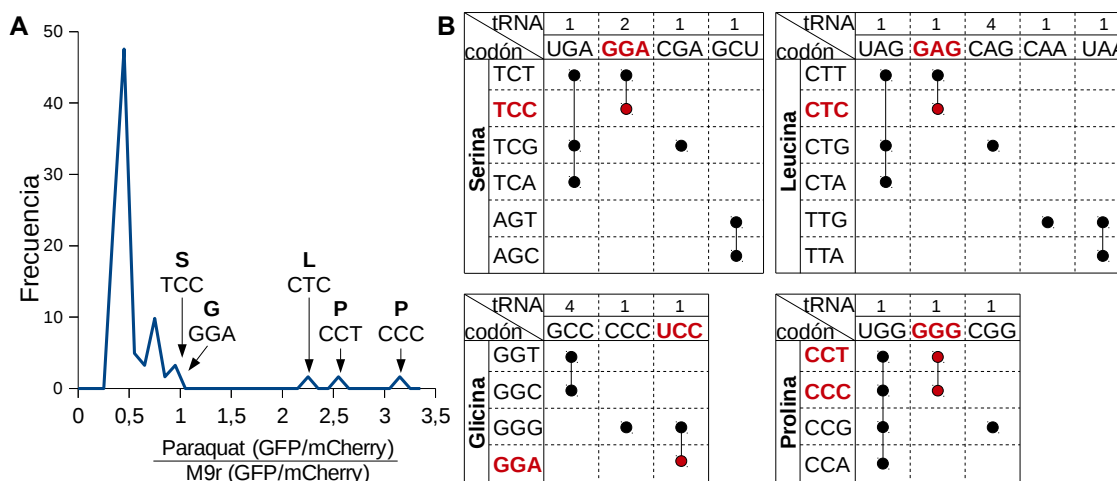


Figura 10. Codones implicados en cambios de la eficiencia traduccional bajo estrés oxidativo. A) Histograma de la razón GFP/mCherry de la condición de estrés oxidativo (paraquat) sobre GFP/mCherry de la condición control (M9r), para cada una de las 61 variantes de la genoteca. B) Esquema de codones y tRNA participantes en su decodificación, ya sea por interacción *Watson-Crick* y/o *wobble*. Cada cuadro indica el anticodón del tRNA involucrado y el número de copias en el genoma (Chan et al., 2009). En rojo se destacan los codones que conservan o incrementan su eficiencia traduccional bajo condición de estrés, y los anticodones implicados en su traducción.

Al buscar características comunes entre los codones GGA, TCC y CTC, podemos mencionar que todos ellos son decodificados únicamente por uno de los isoaceptores del respectivo aminoácido. Si bien estos tRNA a su vez pueden reconocer otros codones por *wobble*, tales blancos cuentan con otros tRNA que participan en su lectura, lo que minimizaría los efectos en su traducción (Figura 10B) (Näsvall *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2012). Esto sugiere que de existir alteraciones en los tRNA^{UCC}_{Gly}, tRNA^{GGA}_{Ser} y tRNA^{GAG}_{Leu}, los principales codones afectados serían GGA, TCC y CTC, respectivamente.

Una situación distinta ocurre para los codones de prolina CCT y CCC, los cuales son decodificados por más de un tRNA (Figura 10B). Dado que el tRNA^{Pro}_{UGG} reconoce por interacción *Watson-Crick* el codón CCA y por *wobble* todos los otros codones de prolina, se dificulta ponderar la real participación de este tRNA en el cambio traduccional de CCT y CCC. En cambio, el tRNA^{Pro}_{GGG} reconoce ambos codones cuya eficiencia traduccional incrementa bajo estrés oxidativo, sugiriendo que este tRNA sería el probable responsable de los cambios observados (Näsvall *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2012).

Este análisis nos sugiere que tRNA^{Gly}_{UCC}, tRNA^{Ser}_{GGA}, tRNA^{Leu}_{GAG} y tRNA^{Pro}_{GGG} son posibles blancos de sufrir alteraciones bajo estrés oxidativo, y que la especificidad de estos efectos traduccionales viene dada por la unión codón-anticodón.

4.1.3. Relación entre eficiencia traduccional y frecuencia de uso de codones

Al comparar los datos experimentales de eficiencia traduccional con la frecuencia de uso codogénico en *E. coli*, los datos muestran una linealidad con pendiente cero (Figura 11A). Esto nos indica que para la mayoría de los codones no existe una correlación entre frecuencia de uso y eficiencia traduccional, tanto en condición control como bajo estrés oxidativo. Un caso que ejemplifica esta observación es el de isocodificadores de leucina, donde a pesar de tener frecuencias de uso similares la eficiencia traduccional entre los codones CTC y TTG es muy distinta (Figura 11B).

Al realizar esta comparación en grupos de codones sinónimos, solo algunos aminoácidos muestran una correlación positiva entre frecuencia y eficiencia traduccional, como es el caso valina y glicina. Sin embargo, muchos aminoácidos no muestran ninguna correlación, o muestran una correlación distinta a la esperada, como en el caso de serina que presenta una correlación con pendiente negativa (datos no mostrados).

Además de la falta de correspondencia entre la frecuencia de uso de codones y la eficiencia traduccional tanto en condición control como bajo estrés oxidativo, podemos identificar importantes cambios en la distribución de eficiencias traduccionales en grupos de codones isocodificadores. Este dinamismo de las eficiencias traduccionales, como la observada para el codón CTC (leucina) (Figura 11B), se contrapone a la idea de vincular la eficiencia traduccional de un codón a un valor fijo como la frecuencia de uso. Esto reafirma la idea que el CAI (*Codon Adaptation Index*) no es un parámetro adecuado para evaluar el grado de adaptación

codogénica de un gen, codón por codón (Kudla *et al.*, 2009).

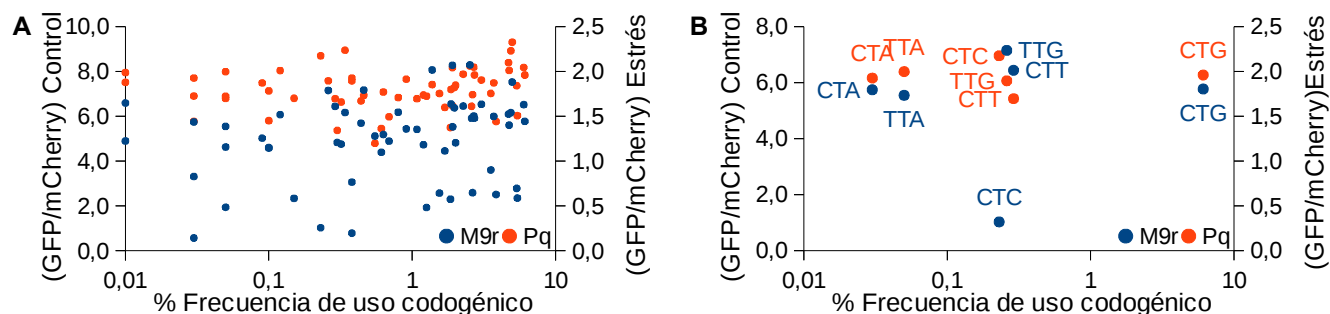


Figura 11. Relación entre los valores de GFP/mCherry obtenidos para cada codón en dos condiciones de cultivo versus frecuencia de uso codogénico en genes de alta expresión. **A)** Comparación de los valores de eficiencia traduccional (GFP/mCherry) obtenidos tras el análisis de la genoteca de GFP y mCherry, versus la frecuencia de uso de cada codón. **B)** Comparación de los valores de eficiencia traduccional para codones codificantes de leucina, versus la frecuencia de uso de cada codón. En ambas figuras las frecuencias de uso de codones provienen del análisis de los genes que codifican las proteínas más abundantes de *E. coli* (Thanaraj *et al.*, 1996).

4.1.4. Relación entre eficiencia traduccional y estructura del extremo 5' del mRNA

De forma adicional al efecto de cambios en la velocidad de elongación de la traducción, la variación en la velocidad de producción de GFP podría derivar de otros efectos de los nucleótidos agregados. Por ejemplo, dado que las diferencias entre las distintas variantes de *gfp* se encuentran cercanas al extremo 5' de la secuencia codificante, éstas pueden afectar la etapa de iniciación como consecuencia de alteraciones en el reconocimiento del transcrito por parte del ribosoma. Para evaluar esto, se realizaron predicciones de las estructuras secundarias para los primeros 148 nucleótidos de cada transcrito (42 nucleótidos de la región no codificante y 106 nucleótidos de la región codificante), para luego ser comparados entre si y agrupados de acuerdo a la semejanza de sus estructuras predichas más estables de cada RNA. Como resultado de esto, se definieron cuatro agrupaciones (Figura 12A). La estructura de consenso de dos de ellas (1 y 2) resulta ser muy parecida entre si, con el codón de inicio y la región variable de los transcritos de *gfp* expuestos en un bucle, y la región en que se encuentran las secuencias de consenso para la unión del ribosoma ocluidas en un tallo. Sin embargo, la estructura y entropía posicional (que discrimina regiones de mayor o menor confiabilidad de la predicción) difiere levemente entre ellas en la zona en que se encuentra el inicio de la secuencia codificante (Figura 12A). Aunque muy similar a las estructuras de los grupos 1 y 2, la estructura del grupo 3 ocluye parcialmente el acceso al codón de inicio de *gfp* y presenta una horquilla adicional río abajo de los codones insertados.

En el caso de la cuarta agrupación la predicción de la estructura secundaria resulta distinta, exponiendo la secuencia Shine-Dalgarno y la región variable de los transcritos de *gfp* dentro de un bucle, y el codón de inicio

ocluido en un tallo (Figura 12A). Al comparar la estabilidad de las estructuras secundarias predichas para los transcritos de cada agrupación, no se observan diferencias entre ellas (promedio de $-38,5 \pm 3,5$ kcal/mol) (Figura 12B).

Al comparar los valores de eficiencia traduccional de los transcritos pertenecientes a cada agrupación, vemos que no hay diferencias entre ellos tanto para las mediciones realizadas en condición control (medio M9r) como bajo estrés oxidativo (250 μ M de Paraquat) (Figura 12B). Esto nos sugiere que a pesar que podemos distinguir distintas estructuras entre los extremos 5' de los transcritos de la genoteca de variantes de *gfp*, estas diferencias no estarían implicadas en los cambios observados en la tasa de producción de GFP.

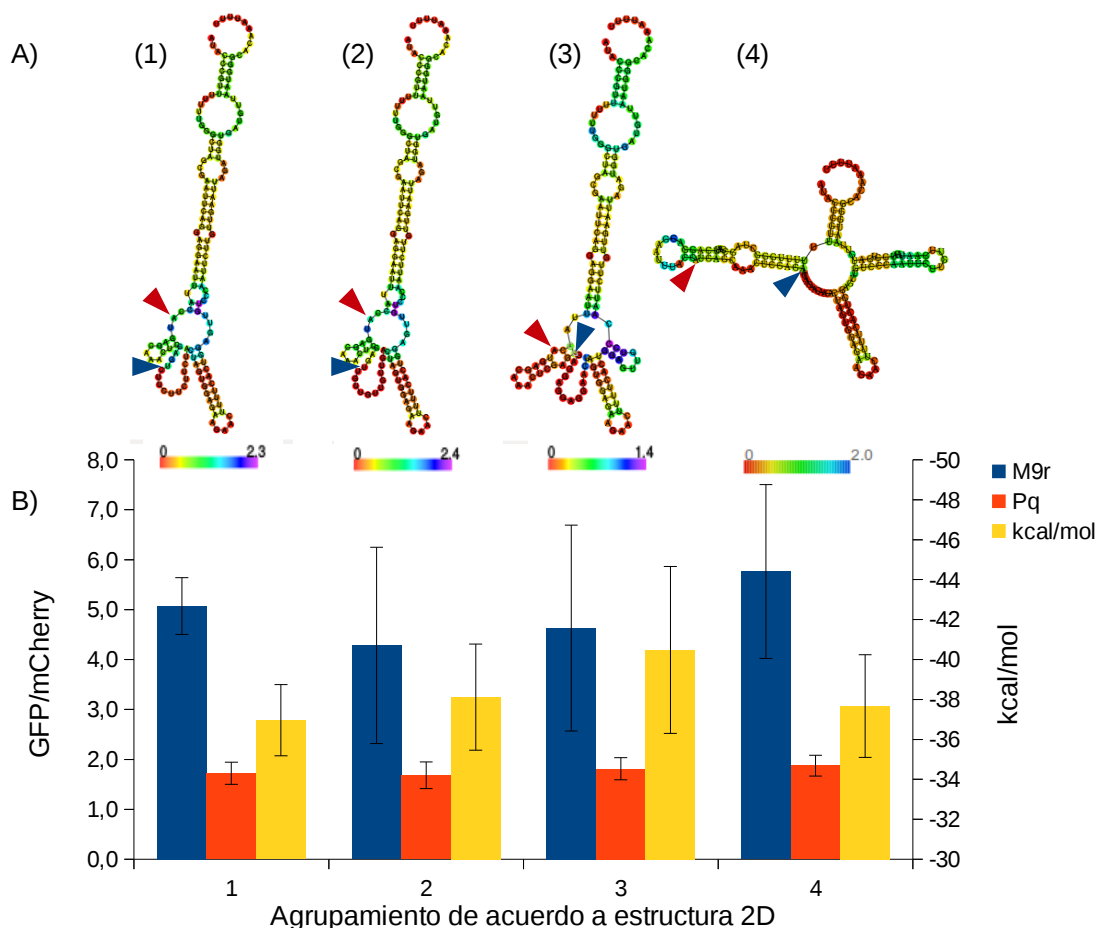


Figura 12. Relación entre eficiencia traduccional y estabilidad de las estructuras predichas para el extremo 5' del transcrito. **A)** Estructuras secundarias de consenso para cada agrupamiento, obtenidas a partir de las estructuras secundarias predichas para los primeros 148 nucleótidos de cada transcrito de la genoteca de variantes de GFP. El triángulo rojo indica el codón de inicio, mientras que el triángulo azul indica posición donde comienza la sucesión de cuatro codones idénticos. Las estructuras son coloreadas de acuerdo a su entropía posicional. **B)** Comparación de los valores de eficiencia traduccional (GFP/mCherry) obtenidos tras el análisis de la genoteca de GFP y mCherry entre las distintas agrupaciones de estructura secundaria predicha y su respectiva estabilidad (kcal/mol).

4.2. Análisis de cambios traduccionales en codones de glicina: búsqueda de posibles causas y consecuencias

4.2.1. Traducción de los codones de glicina en respuesta a las condiciones del medio de cultivo

Debido a que algunos análisis previos realizados en el laboratorio daban cuenta de una disminución en la fracción aminoacilada *in vivo* de los tRNA^{Gly} bajo estrés oxidativo (Figura 3), quisimos ahondar en el efecto traduccional de este tipo de estrés sobre la decodificación de los codones de glicina. Como se mencionó, al comparar la eficiencia traduccional de los cuatro codones de glicina en condición control versus estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat, observamos que el codón GGA no presentó la disminución observada para el resto de codones, igualando la eficiencia traduccional de los codones más eficientes (Figura 7). Es muy importante recalcar que este resultado no significa que la eficiencia traduccional de GGA está aumentando bajo estrés oxidativo, sino que la eficiencia traduccional de este codón no disminuye tanto como lo hacen los otros codones de glicina. Este fenómeno se hace más evidente al incrementar a 700 μ M la concentración de paraquat utilizada para inducir estrés oxidativo (Figuras 13A y B). Al observar la gráfica de fluorescencia de GFP normalizada por biomasa (GFP/DO600) bajo condición control, los codones GGT y GGC, codones de glicina con mayor frecuencia de uso en los genes de alta expresión en *E. coli*, muestran los mayores niveles de fluorescencia. En cambio para los codones GGG y GGA se observa una menor fluorescencia, en correspondencia con su menor frecuencia de uso. Esta relación se mantiene al normalizar los datos por la fluorescencia de mCherry, indicando que corresponde a diferencias en la traducción del transcrito y no a diferencias en su transcripción o estabilidad (Figura 13C). Adicionalmente, la relación GFP/DO600 incrementa para todos los codones al suplementar el medio de cultivo con el aminoácido glicina, conservando la relación entre codones rápidos (GGT y GGC) y codones lentos (GGA y GGG). Este incremento reproduce la correlación positiva entre suplementación de algunos aminoácidos y eficiencia traduccional, observada en algunos experimentos de *ribosome profiling* (Hu et al., 2015). Sin embargo, bajo estrés oxidativo la síntesis de GFP disminuye drásticamente para los codones de glicina (cerca de 8 veces), exceptuando el codón GGA cuya disminución es de 3 veces (Figura 13B).

Esta mayor tolerancia al estrés oxidativo por parte de la maquinaria encargada de la traducción de GGA, reflejada en sus valores de eficiencia traduccional, tiene como consecuencia que su eficiencia traduccional sea ~25% superior a la de los otros codones de glicina bajo estrés inducido con 700 μ M de paraquat, a pesar de ser un codón lento en condiciones control (Figura 13C). Esto puede significar una adaptación evolutiva que permita traducir de manera más eficiente ciertos codones bajo estrés oxidativo. Además, este efecto traduccional es atenuado al suplementar el medio de cultivo con glicina, sugiriendo que parte de los cambios pueden deberse a

competencias por la glicina disponible bajo estrés oxidativo (Figura 13C). Estos resultados concuerdan con algunas observaciones realizadas por *Subramaniam et al.*, (2013a), en que diferencias en la eficiencia traduccional de codones sinónimos dependía de las condiciones nutricionales del ambiente, desapareciendo cuando los aminoácidos se encontraban en exceso.

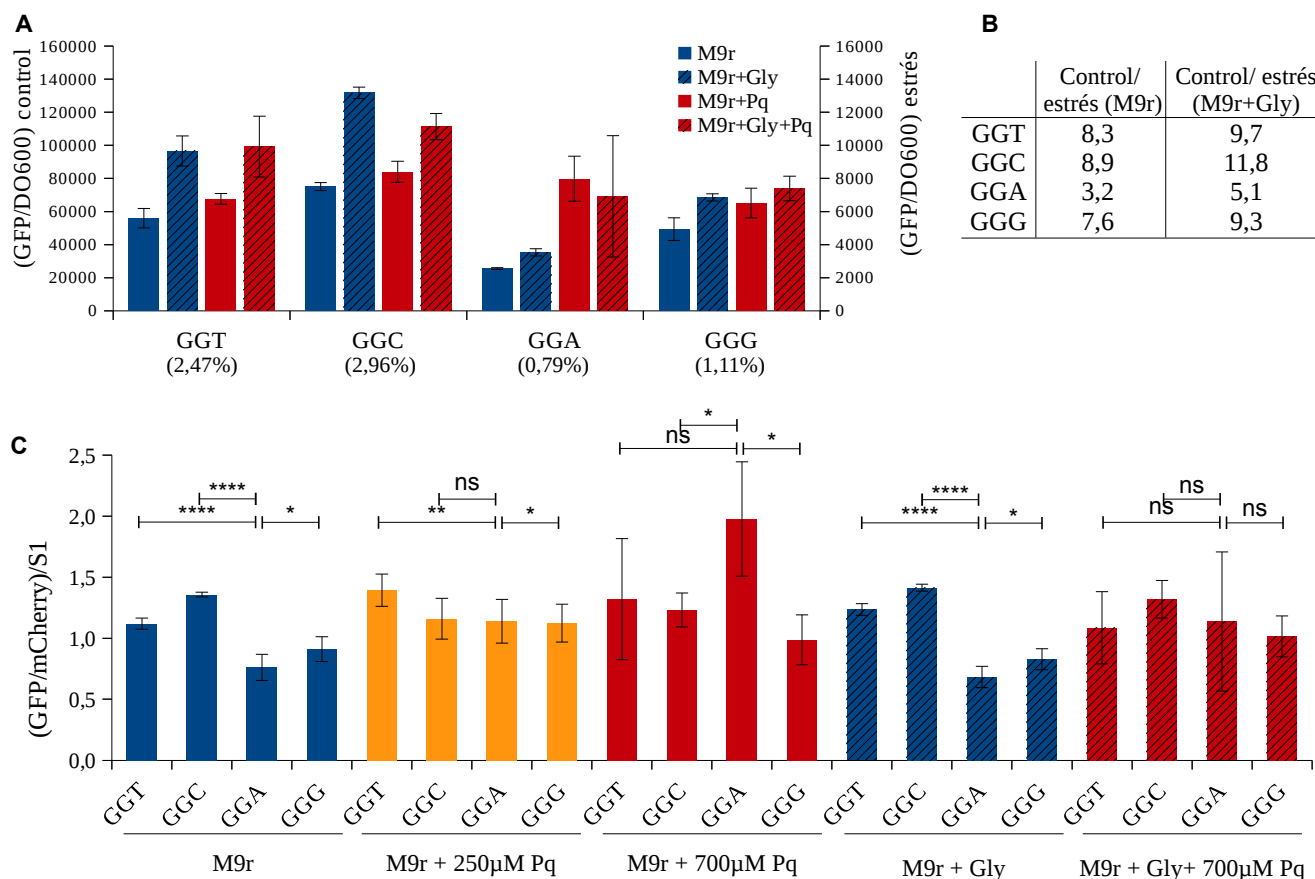


Figura 13. Disminución en los niveles de fluorescencia dependiente de los codones de glicina, bajo estrés oxidativo. A) Medición de la intensidad de fluorescencia de GFP normalizada por DO600 (GFP/DO600). Análisis realizados en medio mínimo M9r (M9r), M9r más 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glicina (M9r+Gly), M9r más 700 μM de paraquat (M9r+Pq) y M9r más 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glicina y 700 μM de paraquat (M9r+Gly+Pq). Cada cepa corresponde a una variante de *gfp* con cuatro codones idénticos de glicina según se indica en el gráfico. Bajo cada codón se indica su frecuencia de uso en genes de alta expresión en *E. coli*. **B)** Tabla que muestra las veces de cambio de GFP/DO600 entre condición control y estrés oxidativo inducido con 700 μM de paraquat. **C)** Valores de GFP/mCherry para cada construcción, normalizados por el control S1 (plasmidio parental). **** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $P < 0,05$, ANOVA de una vía con test de *Dunnett* versus GGA de cada condición ($n \geq 3$).

4.2.2. Regulación de la traducción de codones de glicina en el contexto de genes silvestres

Si bajo estrés oxidativo inducido con 700 μM de paraquat está disminuyendo menos la eficiencia

traduccional de los codones GGA respecto a la de los codones de glicina de uso más frecuente (GGT y GGC) (produciendo un aumento relativo), es posible que se vea afectada la velocidad de síntesis de proteínas codificadas en genes con un alto número de estos codones en el genoma de *E. coli*. Para verificar que este aumento relativo en la eficiencia traduccional de los codones GGA ocurre en un contexto genético silvestre y cumple un papel en la respuesta a estrés, se seleccionó un gen con alto contenido de codones GGA y que su transcrito pudiera ser detectado tanto en condición control como bajo estrés oxidativo, para realizar fusiones traduccionales y transcripcionales a los reporteros *gfp* y *mCherry*, a nivel cromosomal. El gen *insG* (con un 3,167% de GGA en su secuencia) codifica una transposasa que participa en la transposición del elemento móvil IS4. Al comparar la eficiencia traduccional de esta construcción entre una condición control y una condición de estrés, no se observó el aumento predicho para la traducción de *insG* (Figura 14). Esto puede deberse a que el efecto traduccional observado para GGA no dependa del porcentaje dentro de la secuencia completa, sino que dentro de una pequeña región del transcrito, similar al diseño de los genes reporteros utilizados anteriormente (Figura 14C y D).

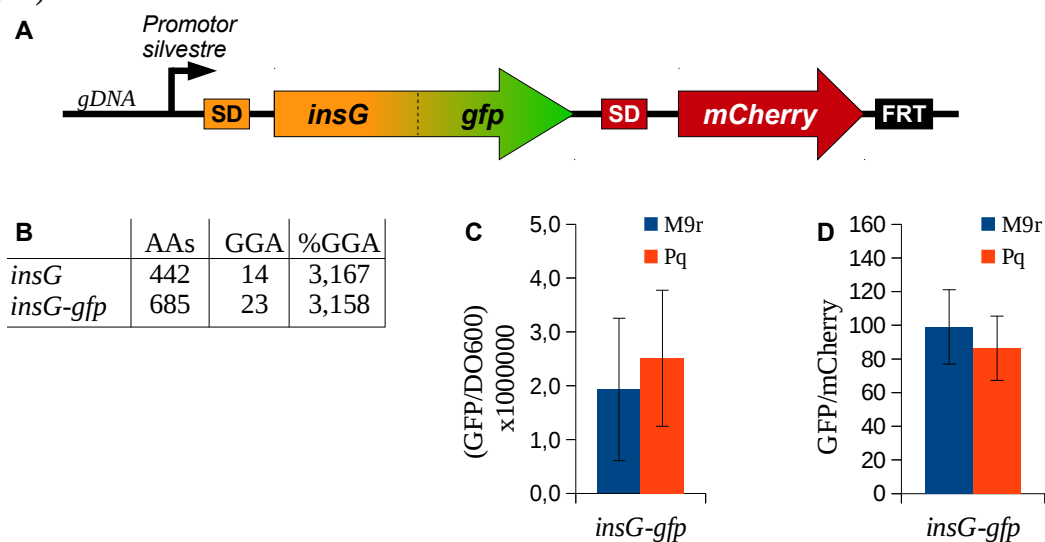


Figura 14. Análisis de la regulación traduccional de genes con alto contenido de GGA, con reporteros cromosomales.

A) Esquema del sistema de genes reporteros utilizados para el análisis de la razón GFP/mCherry de genes cromosomales. **B)** Tabla con el número y porcentaje de codones GGA para el gen silvestre (*insG*) y su fusión traduccional al gen reportero (*insG-gfp*). **C)** Medición de la intensidad de fluorescencia de GFP normalizada por DO600 (GFP/DO600). Análisis realizado a partir de extractos de *E. coli insG-gfp mCherry* (fusión cromosomal) en condición control y bajo estrés oxidativo inducido con paraquat 700 μ M. **D)** Razón GFP/mCherry de los mismos extractos.

Alternativamente, se realizó la búsqueda de genes de *E. coli* que contuvieran sucesiones del codón GGA. Es así que se seleccionó a *narJ*, gen que codifica una chaperona necesaria para la incorporación de molibdeno a la nitrato reductasa A (NRA), y que posee un duplete del codón GGA (Blasco *et al.*, 1998). Se ha descrito que la

NRA es utilizada para la respiración durante el crecimiento anaeróbico de *E. coli* en presencia de nitrato (Berks *et al.*, 1995). Si bien no existe una clara relación entre su actividad y la respuesta a estrés oxidativo se ha observado que NRA es una importante fuente de óxido nítrico y consecuente nitrosilación de proteínas, daño que es aminorado por la regulación de OxyR (Seth *et al.*, 2012). Por otra parte se ha observado que en condiciones de crecimiento aeróbico la NRA tendría una actividad telurito reductasa que contribuiría a la resistencia de este metaloide (Avazéri *et al.*, 1997). *narJ* se fusionó traduccionalmente a *gfp* en el sistema de genes reporteros utilizado anteriormente, para comparar la eficiencia traduccional entre *narJ-gfp(GGA)* y una construcción en que el duplete GGA fue reemplazado por GGC, *narJ-gfp(GGC)*. Sin embargo, al igual que para *insG-gfp*, no se observaron diferencias traduccionales bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M o 700 μ M de paraquat (datos no mostrados). Dado que los efectos traduccionales de glicina fueron observados en un reportero con cuatro sucesiones de GGA, y en el genoma de *E. coli* únicamente encontramos dupletes de GGA, se trabajó en la mejora de la sensibilidad del sistema de dobles reporteros fluorescentes.

Si parte de la iniciación de *mCherry* ocurre a través del mecanismo de resbalamiento de ribosomas, descrito en policistrones (Yamamoto *et al.*, 2016), su intensidad de fluorescencia dependerá de los niveles traduccionales de *gfp*, ocasionando una subestimación en las diferencias de eficiencia traduccional (GFP/mCherry). Para evitar la posible dependencia entre la traducción de *mCherry* y *gfp*, se incorporó una secuencia palindrómica entre *gfp* y *mCherry*, la cual genera una horquilla capaz de detener y promover el desacoplamiento de ribosomas al terminar la traducción de *gfp*, evitando su resbalamiento (Yamamoto *et al.*, 2016).

Para probar la efectividad de la horquilla, se introdujo en el vector parental S1 y en las variantes de GFP con sucesiones de codones de leucina (CTC y CTG, de alta y baja frecuencia de uso). Al comparar la razón GFP/mCherry de las construcciones, se observa un mayor rango dinámico que permite una mayor resolución entre construcciones (Figura 15B). Además, al comparar la fluorescencia de mCherry (reportero normalizador) entre las distintas construcciones (S1, Leu CTC y Leu CTG), se observan valores más homogéneos (Figura 15C). Estos resultados sugieren que los valores de mCherry se independizaron de la traducción del primer cistron, mejorando la sensibilidad del sistema de reporteros.

Haciendo uso del vector S1 modificado, se realizaron las fusiones *narJ-gfp(GGA)* y *narJ-gfp(GGC)*, para comparar sus eficiencias traduccionales bajo estrés oxidativo (Figura 15A). Al comparar la eficiencia traduccional del gen *narJ-gfp* respecto a una variante en la que los codones GGA fueron reemplazados por GGC (codón sinónimo con alta frecuencia de uso), no se observaron diferencia en condición control. Sin embargo, la eficiencia traduccional del vector con codones GGC disminuyó (51,5%) bajo estrés oxidativo en mayor medida que el gen con un duplete GGA (29%) (Figura 15D). Esto nos indica que el efecto traduccional visto previamente para el codón GGA de glicina, también es observable en el contexto de un gen silvestre, planteando la existencia de una regulación de la traducción a nivel de la elongación de los codones de glicina bajo estrés

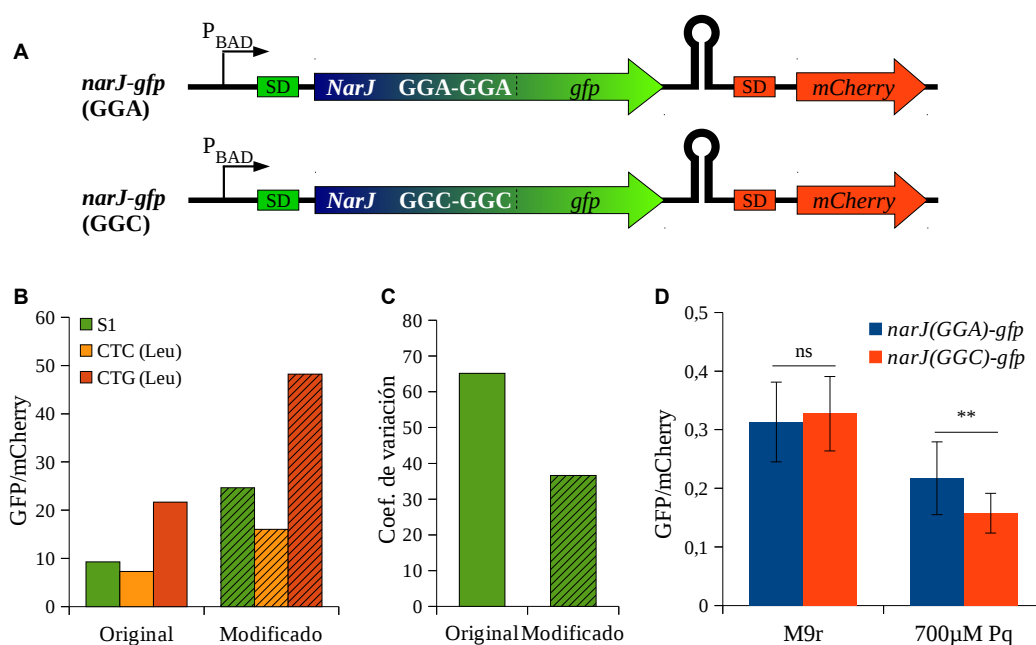


Figura 15. Alteración en la traducción de codones de glicina en un contexto silvestre. A) Esquema de los vectores modificados utilizados para el análisis de la razón GFP/mCherry de fusiones a *narJ*. B) Comparación de la razón GFP/mCherry entre vector pS1 y pS1 modificado, con distintos insertos. C) Coeficiente de variación de la fluorescencia de mCherry, entre los vectores pS1 y pS1 modificado, con distintos insertos. D) Análisis de la razón GFP/mCherry de las fusiones *narJ-gfp(GGA)* y *narJ-gfp(GGC)*, bajo condición control y bajo estrés oxidativo inducido con 700 μ M de paraquat.

4.3. Consecuencias de las alteraciones en los niveles de tRNA^{Gly}

4.3.1. Cambios en la eficiencia traduccional de los codones de glicina producto de la reducción de tRNA^{Gly}

Previo al desarrollo de esta tesis, antecedentes de nuestro laboratorio indicaban la existencia de una disminución de los niveles de tRNA^{Gly} aminoacilable, en *E. coli* tras inducir estrés oxidativo con paraquat. Esto hace suponer que los cambios en la eficiencia traduccional observada para los codones de glicina bajo estrés oxidativo pueden deberse a una disminución diferencial en los niveles de tRNA aminoacilable de los distintos isoaceptores de glicina. Para generar una disminución en los niveles de tRNA^{Gly} independiente del estrés oxidativo, se generó una mutante en la que se reduce la dosificación del tRNA^{Gly}_{GCC}. *E. coli* cuenta con cuatro copias del gen que codifica este tRNA: tres de ellas en un operón (*glyVXY*), y otra copia (*glyW*) en un operón junto a los tRNA de cisteína (*cysT*) y leucina (*leuZ*). Mediante recombinación homóloga de productos de PCR (Datsenko *et al.*, 2000), se construyó la mutante *E. coli* Δ *glyVX::FRT*, para reducir los niveles basales de tRNA^{Gly} (Figura 16A). Esta estrategia no puede ser utilizada con los otros isoaceptores de tRNA^{Gly} ya que se

encuentran codificados por una sola copia del respectivo gen.

Al comparar el crecimiento de la mutante en medio mínimo M9r y medio M9r suplementado con glicina se observamos un retardo en la curva de crecimiento (Figura 16B). Resulta difícil explicar esta disminución en la tasa de crecimiento, ya que la suplementación de glicina promueve el crecimiento de la cepa parental (datos no mostrados). Sin embargo, dado que glicina es un aminoácido que participa en distintas rutas del metabolismo bacteriano, la disminución en los requerimientos del aminoácido para aminoacilación de $tRNA^{Gly}$ podrían promover la acumulación de otros metabolitos que resulten tóxicos para la bacteria. Paralelamente a los defectos en la tasa de crecimiento, se observa una disminución en la traducción de GFP, mayormente en los codones GGT y GGC (Figura 16C). Cuando comparamos la síntesis de los reporteros de codones de glicina podemos observar una fuerte disminución en la traducción de los codones GGT y GGC (ambos decodificados por $tRNA^{Gly_{GCC}}$), alcanzando niveles de traducción cercanos a los codones GGA y GGG, respectivamente (Figura 16C y D). Esto sustenta la propuesta que cambios diferenciales en los niveles y/o actividad de los $tRNA^{Gly}$ pueden ser responsables de cambios en la eficiencia traduccional de los codones de glicina bajo estrés oxidativo.

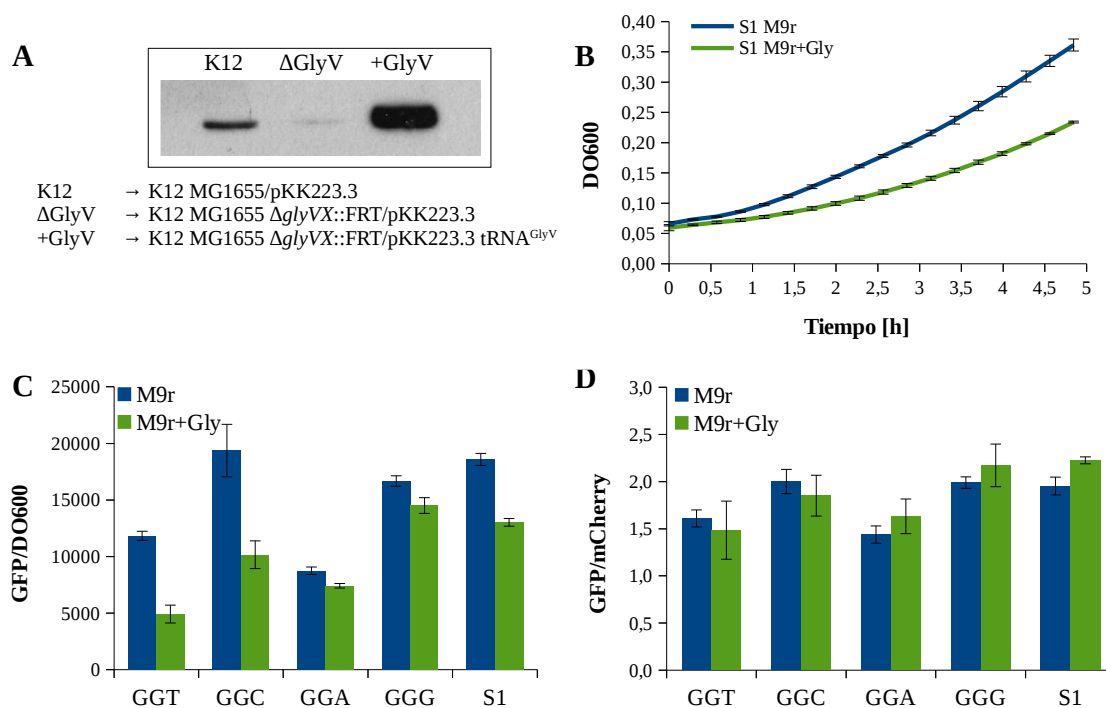


Figura 16. Eficiencia traduccional de codones de glicina en una mutante con menos $tRNA^{Gly_{GCC}}$. **A)** Niveles de $tRNA^{Gly_{GCC}}$ determinado mediante *Northern blot* en la cepa *E. coli* $\Delta glyVX::FRT$. **B)** Curva de crecimiento de la cepa parental con el plásmido sin la adición de ningún codón (*E. coli* $\Delta glyVX::FRT$ /pS1) en presencia y ausencia de glicina. **C)** Medición de intensidad de fluorescencia de GFP normalizada por el número de células (GFP/DO600). **D)** Relación GFP/mCherry entre las distintas construcciones génicas de *gfp* en la mutante *E. coli* $\Delta glyVX::FRT$, en condición control luego de 2 horas de la inducción transcripcional del reportero.

4.3.2. Estudio fenotípico de la sobreexpresión de tRNA^{Gly}

Dado que dos de los tres tRNA isoaceptores de glicina son de copia única, no pudimos desarrollar una estrategia genética que permitiera disectar la contribución de cada uno en el proceso traduccional. Es por esto que optamos por clonar los genes que codifican tRNA^{Gly} (*glyV*, *glyT* y *glyU*) en el plasmidio pKK223-3 (inducible por IPTG), y hacer una caracterización fenotípica de las cepas que los sobreexpresan. Para evitar que los efectos fenotípicos surgieran producto de un exceso de tRNA^{Gly}, los análisis fueron realizados con la mínima concentración de IPTG recomendada (100 μ M) para este vector. Para la mayoría de éstas no detectamos grandes diferencias al comparar sus tasas de crecimiento (Figura 17A y B).

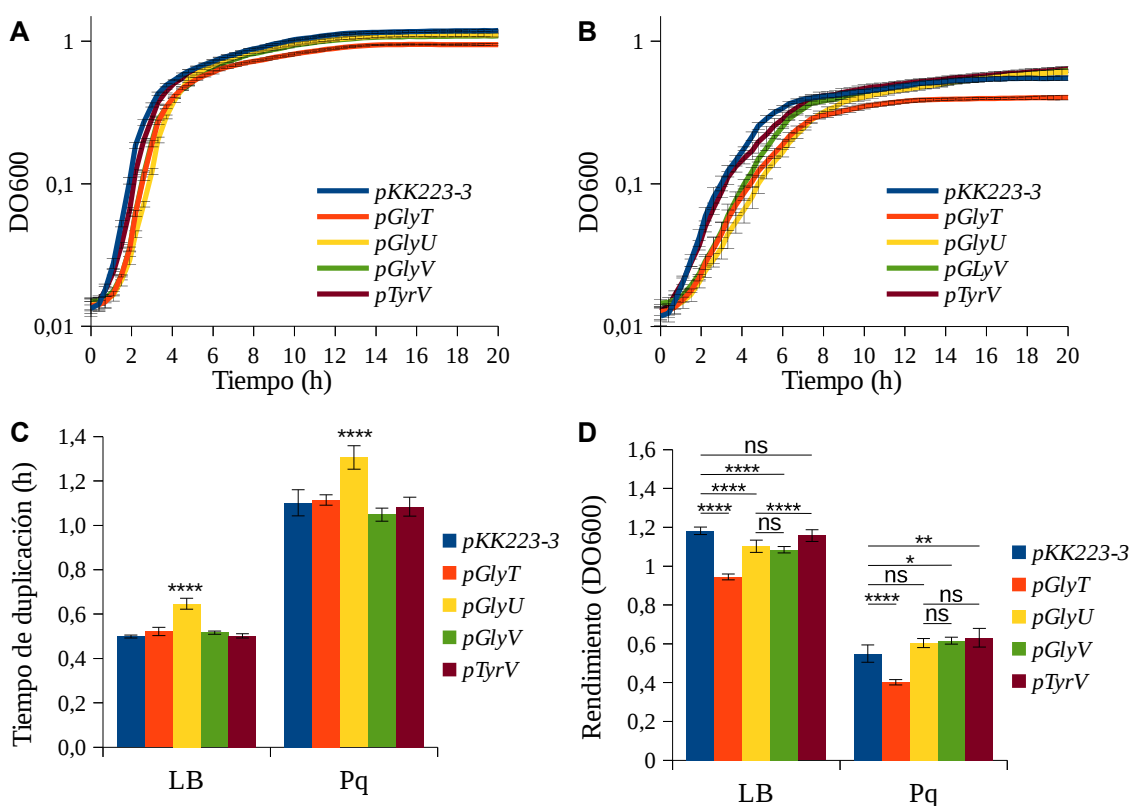


Figura 17. Curvas de crecimiento de cepas sobreproductoras de tRNA, bajo estrés oxidativo. Curvas de crecimiento de las cepas sobreproductoras de tRNA^{Gly_{UCC}} (*pGlyT*), tRNA^{Gly_{GCC}} (*pGlyU*), tRNA^{Gly_{GCC}} (*pGlyV*), tRNA^{Tyr_{GUA}} (*pTyrV*), y la cepa transformada con el plasmidio parental (*pKK223-3*), en medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y 100 μ M de IPTG (A), y bajo estrés oxidativo inducido con 1 mM de paraquat en el mismo medio de cultivo (B). C) Tiempo de duplicación calculado en el intervalo de crecimiento exponencial (1-3 horas para condición control y 2-4 horas para condición de estrés). Se muestra la significancia estadística entre *pGlyU* y todas las otras cepas analizadas. D) Rendimiento de las curvas luego de 20 horas de cultivo. **** $P \leq 0,0001$, ** $P \leq 0,01$, * $P < 0,05$, ANOVA de una vía con test de *Dunnett*.

En aquella cepa en que indujimos una mayor producción del tRNA^{Gly}_{GCC} (*pGlyU*), se observa un retardo en el crecimiento tanto en condición control (LB) como bajo estrés oxidativo inducido con 1 mM de paraquat (Figura 17C). Resulta interesante observar que este retardo no se correlaciona con el *plateau* (rendimiento) de las curvas, donde este último es idéntico para la cepa *pGlyU* y aquella con una sobreproducción del tRNA^{Gly}_{GCC} (*pGlyV*) (Figura 17D). Similar contradicción podemos observar para aquella cepa con una sobreproducción del tRNA^{Gly}_{UCC} (*pGlyT*), la cual tiene la misma tasa de crecimiento que *pGlyV*, que el control con el plasmidio parental (*pKK223-3*), y que una cepa control que sobreproduce un tRNA que no es aceptor de glicina (tRNA^{Tyr}_{GUA}; *pTyrV*), pero que tiene un rendimiento en la curva de cultivo menor al de las otras cepas tanto en condición control como bajo estrés oxidativo (Figura 17C y D).

Al contrario de lo observado al analizar las curvas de crecimiento, en que las diferencias fenotípicas entre las cepas sobreproductoras de tRNA son independientes del estrés oxidativo, cuando analizamos la capacidad de nado (*swimming*) de las mismas, la cepa *pGlyV* muestra una mayor capacidad de nado únicamente bajo estrés oxidativo (Figura 18B). Considerando que algunos reportes describen que bajo esta condición de estrés se reduce la movilidad e incrementa la formación de biopelículas (Gambino *et al.*, 2016), el incremento de tRNA^{Gly}_{GCC} bajo estrés oxidativo parece evitar que la cepa *pGlyV* regule dicho cambio de fenotipo. Sin embargo, desconocemos si esta regulación es ejercida por el tRNA a través de cambios en la traducción u otros mecanismos.

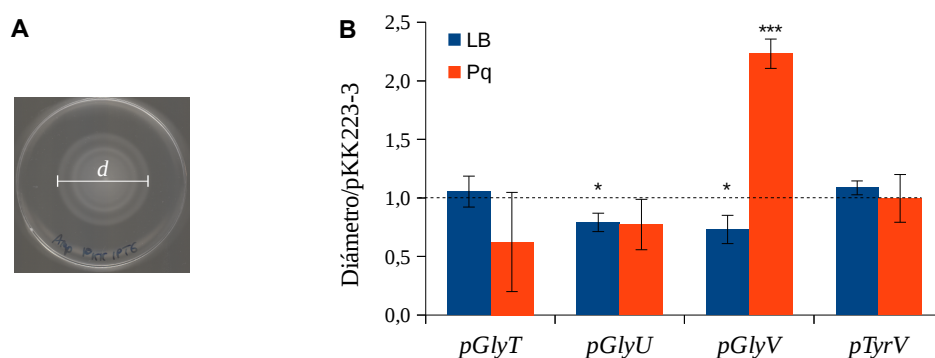


Figura 18. Movilidad de cepas sobreproductoras de tRNA^{Gly}, bajo estrés oxidativo. Efecto de la sobreproducción de tRNA^{Gly} en la movilidad sobre medio semisólido (LB agar 0,3%), bajo estrés oxidativo inducido con 500 μ M de paraquat. **A)** Diámetro del halo de nado de las cepas estudiadas. **B)** Se muestra el diámetro de cada cepa, normalizado por el diámetro de la cepa transformada con el plasmidio parental (*pKK223-3*). *** $P \leq 0,001$, * $P < 0,05$, ANOVA de una vía con test de *Dunnnett* versus GGA de cada condición ($n \geq 4$).

Uno de los mecanismos alternativos a la regulación de la traducción que podría explicar lo observado en *pGlyV*, es la formación de 5',5''-P1, P4 diadenosin tetrafosfato (Ap4A) por parte de la glicil-tRNA sintetasa. La síntesis de Ap4A ocurre como una reacción lateral a la aminoacilación de tRNA por las aminoacil tRNA sintetasas (aaRS) (Figura 19A). En una primera etapa (reversible) las aaRSs activan al aminoácido (aa) por la

formación del intermediario aaRS•aa~AMP (donde • indica la formación de un complejo y ~ la formación de un enlace covalente) y liberación de pirofosfato (PPi). Luego el OH del extremo 3' del tRNA ataca al aminoacil adenilato para formar el aminoacil tRNA. Sin embargo, debido a la elevada concentración de ATP en la célula (aproximadamente 3 mM en condiciones normales), puede ingresar al sitio activo una segunda molécula de ATP en reemplazo del PPi. En éste, el fosfato *gamma* será atacado por el intermediario aaRS•aa~AMP, formando así el Ap4A en vez del ATP que se formaría al entrar PPi (Goerlich *et al.*, 1982; Wright *et al.*, 2006).

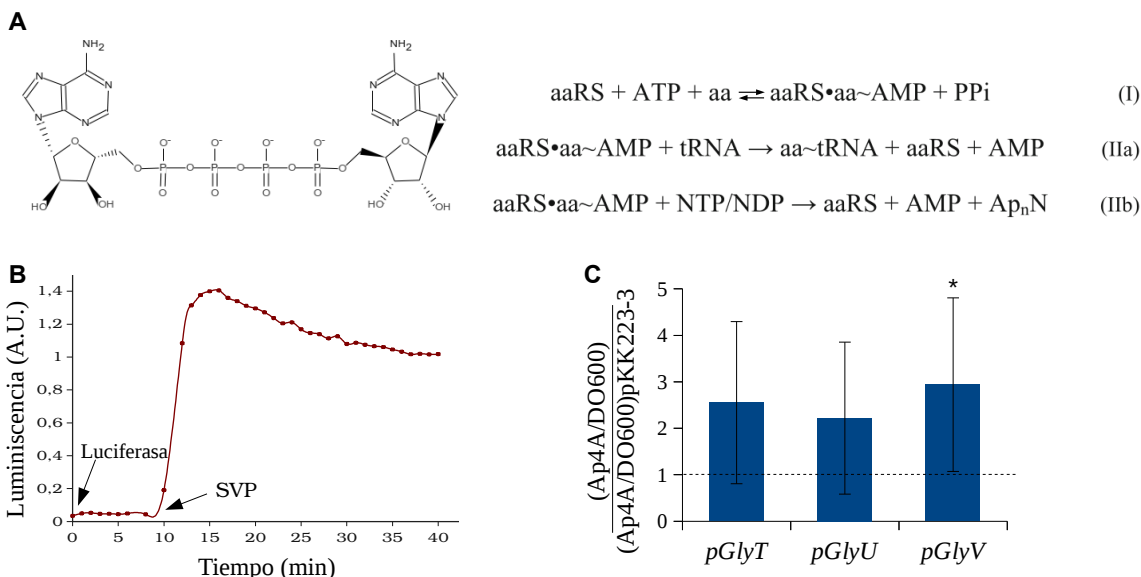


Figura 19. Sobreproducción de tRNA^{Gly} altera los niveles de Ap4A *in vivo*, bajo estrés oxidativo. A) Estructura del 5',5''-P1, P4 diadenosin tetrafosfato (Ap4A) y su mecanismo de síntesis como reacción lateral a la aminoacilación de aminoácidos mediada por aminoacil-tRNA sintetetas. **B)** Perfil representativo del ensayo enzimático para la cuantificación de Ap4A a partir de extractos de *E. coli* sometida a estrés oxidativo inducido con 700 μM de paraquat. Se indica el tiempo de adición de luciferasa y SVP (*Snake Venom Phosphodiesterase*), para consumir el ATP remanente e iniciar la formación de ATP a partir de AP4A, respectivamente. **C)** Concentración de Ap4A normalizada por DO600 de cada extracto, normalizado por la producción de Ap4A de la cepa transformada con el plasmidio *pKK223-3*. * $P \leq 0,05$, test de los rangos con signo de *Wilcoxon*, valor hipotético=1,0.

Algunos reportes indican que en condiciones de estrés térmico y oxidativo, hay un aumento significativo en los niveles de Ap4A en *E. coli* (Lee *et al.*, 1983). Además, se ha observado que mutantes de *apaH*, gen que codifica una hidrolasa encargada de mantener bajos niveles de Ap4A en condición control, pierden su capacidad motriz dependiente del flagelo (Farr *et al.*, 1989). Es por esto que una disminución de tRNA^{Gly}_{GCC} activo podría facilitar la reacción lateral de la glicil-tRNA sintetasa, y a través del Ap4A modular la movilidad bacteriana.

Para analizar esta hipótesis, se midieron los niveles de Ap4A en las distintas cepas sobreproductoras de

tRNA^{Gly}, mediante un ensayo enzimático que degrada el Ap4A a ATP por acción de fosfodiesterasas presentes en el veneno de serpiente (SVP, del inglés *Snake Venom Phosphodiesterase*), para luego ser cuantificado con una reacción de luminiscencia catalizada por luciferasa (Figura 19B).

Bajo condición control los niveles de Ap4A fueron menores al límite de detección de la técnica en todas las cepas. Cuando observamos el efecto de la sobreproducción de cualquier tRNA^{Gly}, vemos que se induce una mayor producción de Ap4A bajo estrés oxidativo inducido con 700 μ M de paraquat, respecto a la cepa *pKK223-3* (Figura 19C). Esto indica que las variaciones en los niveles de Ap4A no responden de manera específica a un tRNA en particular. Además, este resultado es contradictorio a lo esperado, pues nuestra hipótesis implicaba que al sobreexpresar los tRNA^{Gly} disminuiría la velocidad de reacciones laterales por parte de la glicil-tRNA sintetasa, reduciendo así los niveles de Ap4A bajo estrés oxidativo. Estudios cinéticos muestran que la síntesis de Ap4A por fenil y lisil-tRNA sintetasa es inhibida por sus respectivos tRNA. Sin embargo, esta inhibición no ocurre para la arginil-tRNA sintetasa, y contrario a lo anterior, tRNA^{Val} induce un aumento en la síntesis de Ap4A por parte de su aaRS (Goerlich *et al.*, 1982). Esto nos indica que se requieren mayores análisis de la glicil-tRNA sintetasa para entender su papel dentro de la regulación del Ap4A.

4.3.3. Cambios en los niveles de aminoacilación al sobreexpresar tRNA^{Gly}

Dada la diversidad de fenotipos que se observan al sobreexpresar los genes codificantes de tRNA^{Gly}, decidimos comparar los niveles de aminoacilación *in vivo* de cada uno, para tratar de explicar estas diferencias. Brevemente, se realizó una extracción de RNA en condiciones ácidas (para evitar la desaminoacilación de los tRNA), y luego de una oxidación con periodato del extremo 3' del tRNA y posterior β -eliminación del último nucleótido, se cuantificó la fracción de tRNA aminoacilado (protegida por el aminoácido) y desaminoacilado (expuesta a la sustracción de un nucleótido) mediante *Northern blot*, luego de su separación por tamaño en geles de secuenciación.

De manera similar a lo observado previamente en el laboratorio para la cepa *E. coli* K12 silvestre, la cepa transformada con el plasmidio *pKK223-3* muestra una disminución cercana al 40% en el nivel de aminoacilación de todos sus tRNA^{Gly}, bajo estrés oxidativo inducido con 1 mM de paraquat (Figura 20A). Sin embargo, ante la sobreproducción de cualquier tRNA^{Gly}, la disminución en el nivel de aminoacilación *in vivo* es menor (cercana al 20%), y varía según el tRNA analizado. Adicionalmente, a partir del total de tRNA (aminoacilado y desaminoacilado), se estimaron las veces de cambio en la concentración del tRNA respecto a la cepa con el plasmidio *pKK223-3* (Figura 20B). A través de este análisis, observamos que los tRNA que muestran un mayor incremento en la concentración del tRNA son aquellos que tienen una menor abundancia: cepa *pGlyT* (tRNA^{Gly_{UCC}}) y cepa *pGlyU* (tRNA^{Gly_{CCC}}). Sumado a la sobreproducción de los tRNA^{Gly}, observamos una tendencia a la disminución en la concentración de los tRNA que no son sobreexpresados. Estos resultados nos

sugieren que la sobreproducción de tRNA^{Gly} no está saturando la capacidad de aminoacilación de la sintetasa. Si este fuera el caso, por competencia, observaríamos una fuerte disminución en los niveles de aminoacilación de los isocodificadores no sobreexpresados.

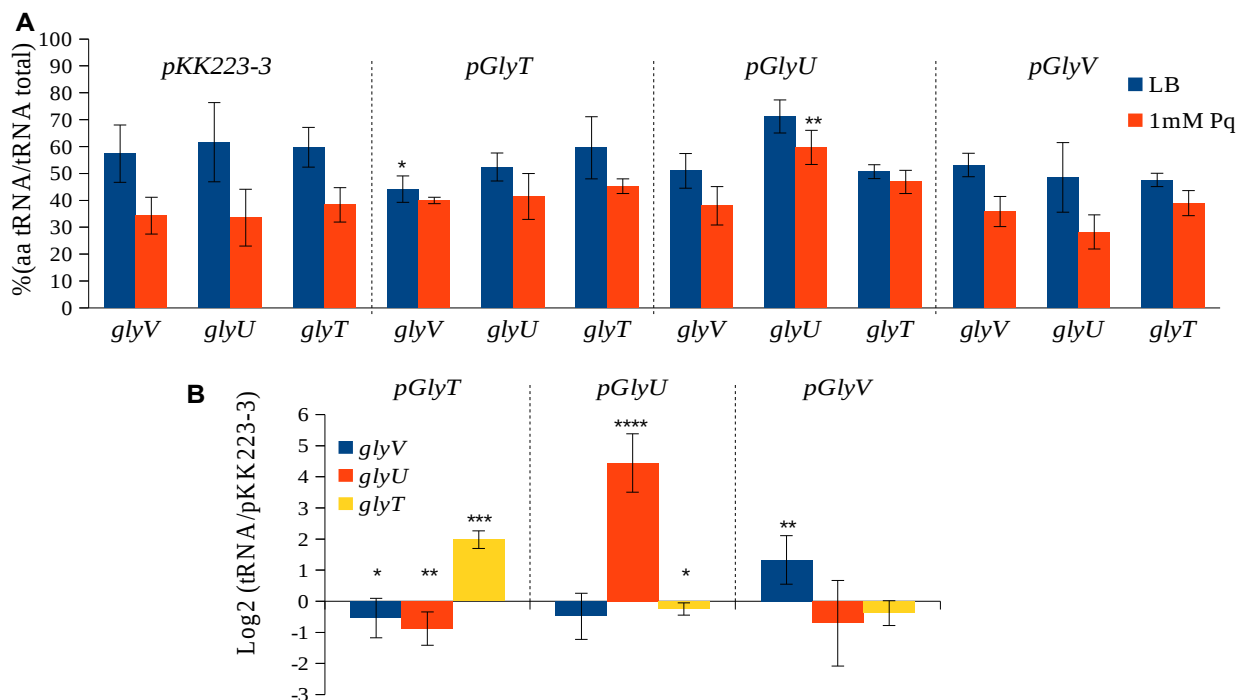


Figura 20. Aminoacilación *in vivo* de aceptores de glicina en cepas sobreproductoras de tRNA^{Gly}. **A)** Se estudió el efecto de la sobreproducción de los isoaceptores de glicina en el cambio del porcentaje de aminoacilación bajo estrés oxidativo, inducido durante 30 minutos con 1 mM de paraquat. Las cepas fueron denominadas con el nombre del plasmidio con que fueron transformadas: *pKK223-3*, *pGlyT*, *pGlyU* y *pGlyV*. Se indica el tRNA bajo análisis, con el nombre del gen que lo codifica: *glyV* → tRNA^{Gly_{GCC}}, *glyU* → tRNA^{Gly_{CCC}}, *glyT* → tRNA^{Gly_{UCC}}. ** $P \leq 0,01$, * $p < 0,05$, ANOVA de una vía con test de *Dunnnett* versus *pKK223-3* de cada tRNA ($n \geq 3$). **B)** Estimación del nivel del total de tRNA^{Gly}, en las distintas cepas analizadas. Se muestran los niveles de cambio respecto a la cepa transformada con el plasmidio *pKK223-3*. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$, *t-student* para una muestra, valor hipotético=0,0.

Si comparamos los cambios a nivel de aminoacilación con los fenotipos observados previamente, vemos que en la cepa *pGlyT* ocurre una disminución en el total de tRNA^{Gly_{GCC}} y su nivel de aminoacilación, el cual decodifica los codones con mayor frecuencia de uso. Esto puede estar relacionado con la disminución en la síntesis de las proteínas más abundantes de *E. coli*, lo que podría tener como consecuencia un menor rendimiento en las curvas de cultivo (Figura 17D). Por otra parte, el tRNA^{Gly_{CCC}} en la cepa *pGlyU* mostró el mayor incremento respecto al control, tanto en sus niveles de aminoacilación como en los niveles de tRNA total. Dado que la eficiencia traduccional de los codones de glicina es bastante más lenta que el resto de los codones del

código genético (Figura 7), este drástico cambio en el tRNA^{Gly}_{CCC} podría generar cambios en la eficiencia traduccional del codón GGG. Considerando que glicina y prolina son aminoácidos que comandan gran parte del plegamiento de las proteínas, un cambio muy drástico en la traducción de GGG puede afectar negativamente la síntesis de las proteínas, e incidir en la tasa de replicación de la cepa *pGlyU* (Figura 17C). Finalmente, no se observan cambios en la concentración de los tRNA no sobreproducidos en la cepa *pGlyV*, ni en su nivel de aminoacilación bajo estrés oxidativo que se puedan correlacionar con las alteraciones en la movilidad bacteriana.

4.4. Traducción de mRNA carentes de líder (lmRNA) bajo estrés oxidativo

4.4.1. Análisis de la traducción de mRNA carentes de región líder, bajo estrés oxidativo

Cuando analizamos los cambios en la eficiencia traduccional de los codones de *E. coli* bajo estrés oxidativo, un aspecto que llama la atención es la drástica disminución que afecta de manera transversal a la mayoría de los codones (Figura 7 y 21). A partir de estos datos no es posible determinar cuál de las etapas del proceso traduccional es la principal responsable de este cambio. Sin embargo, la mayoría de los autores plantean que la etapa que tiene mayor impacto en el nivel de traducción, es la iniciación (*Dai et al., 2016*). Hasta la fecha, se han descrito tres mecanismos de iniciación de la traducción en bacterias: iniciación canónica, iniciación de mRNA carentes de región líder (*Leaderless mRNA* o *lmRNA*), e iniciación por resbalamiento de ribosomas sobre transcritos policistrónicos (*Yamamoto et al., 2016*). Sin embargo, aunque la regulación de la iniciación a través de factores que regulan el inicio canónico de mRNA ha sido descrita en detalle, son escasos los trabajos que han abordado el estudio de la regulación de los otros mecanismos de iniciación.

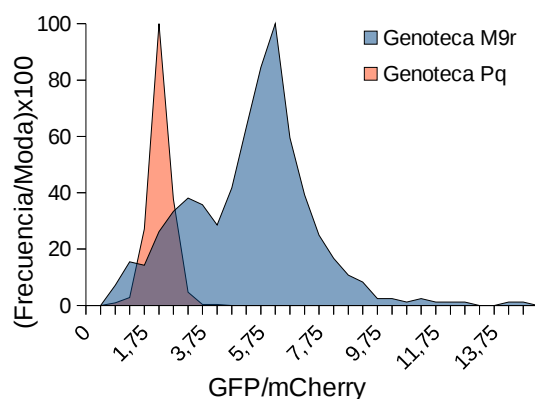


Figura 21. Distribución de las eficiencias de traducción de la genoteca de variantes de GFP en condiciones control y bajo estrés oxidativo. Histograma de eficiencias traduccionales obtenidas del análisis de una genoteca de insertos en *gfp*. Todas las mediciones fueron realizadas en medio M9r con ampicilina, tras la inducción de la producción del transcrito con 0,4% arabinosa, a 37 °C con agitación.

De acuerdo al modelo canónico de inicio de la traducción bacteriana, la región 3' del rRNA 16S resulta de gran importancia, pues en ella se encuentra la secuencia *anti-Shine-Dalgarno* (aSD). Esta secuencia facilita el reconocimiento del extremo 5' del mRNA (secuencia líder), donde se encuentra la secuencia *Shine-Dalgarno* (SD) que es complementaria a ésta. Este reconocimiento ayudaría al correcto posicionamiento del codón de inicio del mRNA en el sitio del peptidil-tRNA (sitio P) de la subunidad menor del ribosoma (*Schmeing., et al., 2009*). En el caso de lmrna, al carecer de secuencia líder el codón de inicio queda sobre o muy próximo al extremo 5' del mRNA (*Ptashne et al., 1976; Vesper et al., 2011; Sauert et al., 2016*). Si bien se desconoce el mecanismo que permite el inicio de la traducción de estos transcritos, algunos investigadores han logrado determinar que los lmrna forman complejos de iniciación con ribosomas completos (70S), en lugar de la subunidad 30S (*Udagawa et al., 2004; Moll et al., 2004; Vesper et al., 2011*). De manera similar, la iniciación por resbalamiento dependería de la formación de complejos de iniciación con ribosomas 70S. Sin embargo, éstos provendrían de genes localizados río arriba en el transcrito, puesto que este mecanismo es propio de la traducción de policistrones (*Yamamoto et al., 2016*).

Dado que la iniciación canónica y la iniciación de lmrna serían las principales formas de iniciar la traducción al comienzo de un transcrito, quisimos estudiar ambos mecanismos de iniciación en condición control y bajo estrés oxidativo. Para realizar esto, se comparó la eficiencia de traducción de los reporteros GFP y mCherry codificados en un transcrito bicistrónico que posee sitios canónicos de unión al ribosoma para ambos genes reporteros (pSD GFP), versus uno que carece de región líder en su extremo 5' (plmrna GFP), y por lo tanto no tiene el sitio de unión al ribosoma en el primer gen (*gfp*), pero conserva un sitio canónico para el inicio de la traducción del segundo gen (*mCherry*) (Figura 22A). Por lo tanto, en ambos plasmidios *mCherry* inicia su traducción por el mecanismo canónico, pero *gfp* inicia mediante mecanismos diferentes: canónico en pSD GFP y tipo carente de líder en plmrna GFP.

Al realizar la cinética de producción de proteínas fluorescentes en condición control (M9r) observamos que aquellos reporteros carentes de región líder (plmrna GFP) muestran una eficiencia de traducción mucho menor a la de un transcrito con líder (Figura 22). Esto resulta acorde a lo esperado, pues algunos trabajos en que mutan esta zona de interacción entre rRNA y mRNA (transcritos con líder), obtienen un menor nivel de traducción (*Velázquez et al., 1991*). Esto sugiere que bajo condición control el inicio canónico es mucho más eficiente que el inicio de lmrna. Otro aspecto que se puede observar en el reportero plmrna, es que cuando caen los niveles traduccionales de GFP, también lo hacen los niveles de mCherry (Figura 22C). Esto nos sugiere que aquellos fenómenos regulatorios que afecten la densidad de ribosomas sobre un gen, pueden tener efecto en la traducción de genes río abajo en el mismo transcrito, producto de cambios en su estabilidad y/o el inicio de su traducción por resbalamiento. Distinto es lo observado bajo estrés oxidativo (M9r más 250 μ M de paraquat), donde la eficiencia traduccional de los mensajeros sin líder aumenta cerca de 10 veces, incluso superando la eficiencia

traduccional de los mensajeros con líder (Figura 22E).

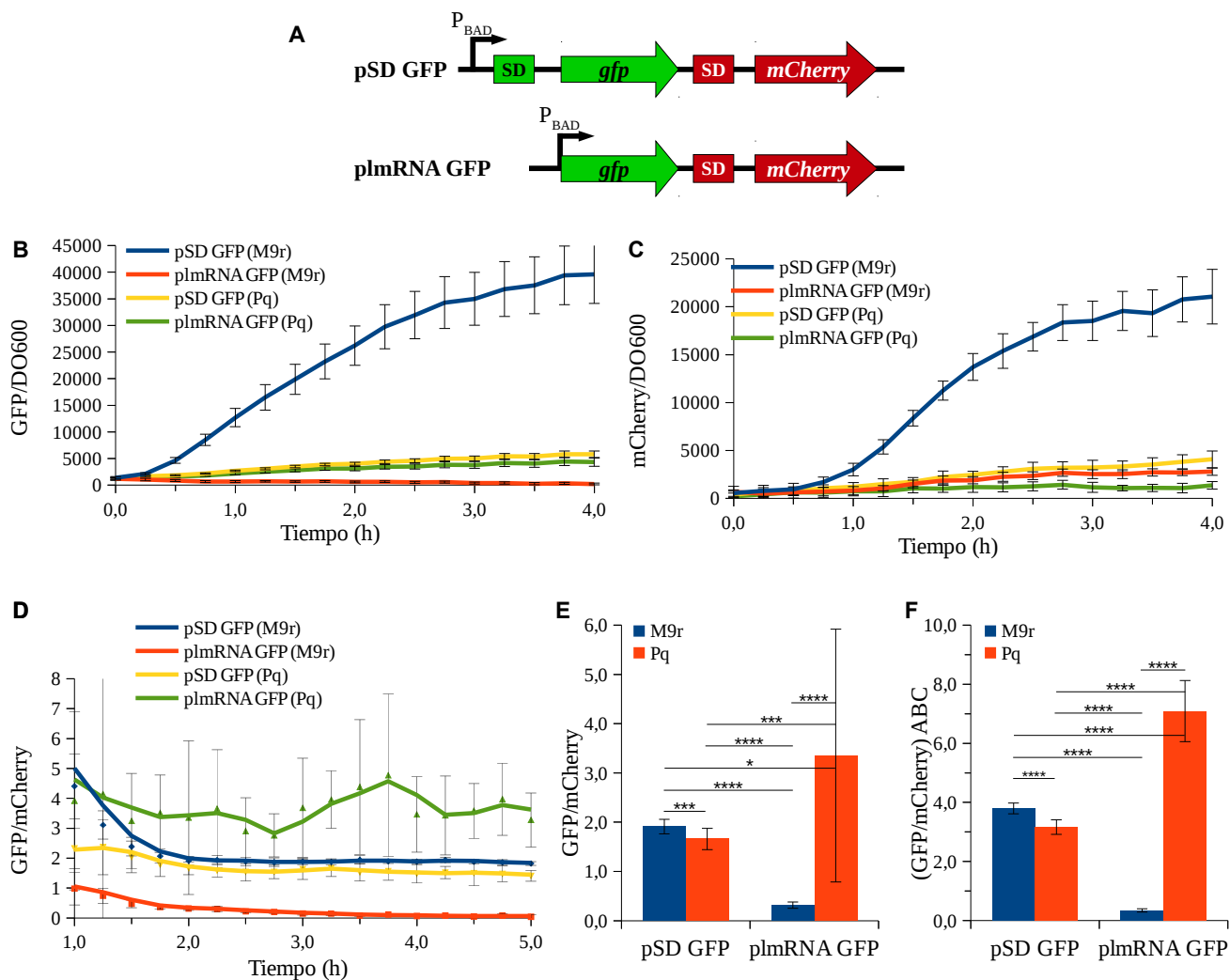


Figura 22. lmrRNA se traduce de manera más eficiente bajo estrés oxidativo. A) Representación esquemática de los reporteros con región líder (pSD GFP) y sin región líder (plmRNA GFP). La inducción de los transcritos se efectuó con 0,4% arabinosa en medio M9r o M9r con 250 μ M de paraquat (Pq), y los cultivos se realizaron a 37 $^{\circ}$ C con agitación. Se obtuvieron las cinéticas de aparición de fluorescencia para GFP (**B**) y mCherry (**C**). **D**) Cinética de la eficiencia traduccional (GFP/mCherry) de cada reportero. **E**) Razón GFP/mCherry en condición control y bajo estrés oxidativo, a las 2 horas de inducción. **F**) Área bajo la curva (ABC) de cada reportero en condición control y bajo estrés oxidativo, en el período de 2 a 4 horas post inducción. **** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$, test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Dado que los valores de mCherry obtenidos bajo estrés oxidativo son muy bajos para el reportero plmRNA, el análisis de los cocientes GFP/mCherry tiene una dispersión mayor a la observada en experimentos previos. Teniendo esto en consideración, realizar un análisis a partir de la eficiencia traduccional (GFP/mCherry)

observada a las 2 horas puede parecer arbitrario. Para solucionar esto, se realizó la comparación completa de las curvas GFP/mCherry en el tiempo en el período de 2 a 4 horas a través del análisis de sus áreas bajo la curva (ABC). Esto se sustenta en que las gráficas GFP/mCherry tienen un comportamiento asintótico que tiende a la razón de las tasas de síntesis de GFP y mCherry, brindándonos una ventana de análisis mayor (2 a 4 horas post inducción de la transcripción y del estrés oxidativo, con arabinosa y paraquat respectivamente) Los resultados obtenidos muestran el mismo incremento en la eficiencia traduccional de lmrRNA bajo estrés (Figura 22F).

Dado que para la construcción de los reporteros pSD GFP y plmrRNA GFP se modificó el promotor del plasmidio parental, introduciendo en él un sitio de restricción, fue necesario secuenciar el extremo 5' de los transcritos de cada reportero, y verificar los sitios de inicio de la transcripción tanto en condición control como bajo estrés oxidativo. Para esto se utilizó el método *SMART (Switching Mechanism At the 5' end of RNA Template)*, el cual se basa en el cambio de templado que realiza la retrotranscriptasa de MMLV, permitiendo la incorporación de una secuencia conocida en el extremo 3' (correspondiente al extremo 5' del transcrito) del cDNA durante la transcripción inversa. Esto permite secuenciar y determinar con exactitud el extremo 5' del transcrito original (*Zhu et al., 2001*). De esta manera comparamos los extremos 3' del mRNA de los reporteros, extraídos de medio mínimo M9r en condición control y bajo estrés oxidativo inducido con paraquat 250 μ M. Dado que los vectores pSD GFP y plmrRNA GFP son variantes del vector pS1 en que incorporamos un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NotI* entre las cajas -10 y -35 del promotor BAD (para facilitar los clonamientos cercanos al sitio de inicio de la transcripción), éste también fue incorporado al análisis (Tabla 15). La secuenciación de 4 clones de cada cepa mostró una diversidad de extremos 5' de los RNA (producto de la degradación *in vivo* o durante la extracción), por lo que definimos el sitio de inicio de la transcripción más probable basándonos en el transcrito más largo. Al comparar el inicio de transcripción entre el vector original (pS1) y el vector pSD GFP, no se observaron cambios entre los transcritos en condición de estrés y el transcrito de pS1 en condición control. Lamentablemente, el bajo número de clones analizados no fue suficiente para verificar el extremo 5' del transcrito de pSD GFP en condición control. Sin embargo, ya que éste no presentó diferencias bajo estrés oxidativo, asumimos que en condición control tampoco sufrió cambios. Además, la construcción sin región líder (lmrRNA) mostró el mismo inicio de transcripción tanto en condición control como bajo estrés oxidativo. Esto indica que bajo estrés oxidativo no se genera un inicio alternativo de la transcripción, el cual pudiera agregar una secuencia que facilite el reconocimiento del transcrito.

Por otra parte, observamos una diferencia entre el +1 de transcripción descrito en la literatura para el promotor de nuestro vector parental (P_{BAD}) y el +1 experimental, diferencia que llevó a que todas nuestras construcciones incorporaron la secuencia ATA en el extremo 5'. Si bien el sitio de inicio de la traducción (ATG) del transcrito sin líder (lmrRNA) no está exactamente en el extremo 5' del mRNA como fue originalmente diseñado, de todos modos corresponde a un lmrRNA, dada la cercanía del ATG al extremo 5' y a la carencia de la

secuencia de consenso *Shine-Dalgarno* descrita para mRNA canónicos.

Reportero y condición	Secuencia
<i>pS1</i> - ctrl	5'- ATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCAGGAGGAATTTACC ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...
<i>pS1</i> - pq	5'- ATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCAGGAGGAATTTACC ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...
<i>pSD GFP</i> - ctrl	5'- ATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGA ATTCAGGAGGAATTTACC ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...
<i>pSD GFP</i> - pq	5'- ATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCAGGAGGAATTTACC ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...
<i>plmRNA GFP</i> - ctrl	5'- ATA ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...
<i>plmRNA GFP</i> - pq	5'- ATA ATG GAGCAAACCTCGAGGGC...

Tabla 15. Resultados de la secuenciación de los extremos 5' de los genes reporteros. Secuencia obtenida a partir de RNA de cultivos en medio M9r, en condiciones control (ctrl) y bajo estrés oxidativo inducido con paraquat 250 μ M (pq). En achurado se indican la región que no fue detectada mediante secuenciación debido al bajo número de clones analizados.

Dado que bajo estrés oxidativo observamos un aumento en la eficiencia traduccional de los reporteros sin región líder, y que no observamos cambios en el largo del extremo 5' de los transcritos bajo estrés, nuestros datos sugieren que hay cambios en la maquinaria traduccional que reducen la eficiencia del inicio canónico de traducción y permiten que el inicio de mRNA sin líder sea más eficiente bajo esta condición.

4.4.2. Análisis de la traducción de mRNA carentes de región líder silvestres, bajo estrés oxidativo

Para evaluar la eficiencia traduccional de los lmrNA, hemos utilizado el vector plmRNA GFP, el cual genera un mRNA que codifica *gfp* y *mCherry*, en un transcrito sin líder. Sin embargo, este tipo de transcritos también se pueden encontrar de manera silvestre en la naturaleza. Por ejemplo, como producto de promotores alternativos en genes reguladores de los fagos λ y P2, el transposón Tn1721, o *virF* en *Shigella* spp. (Resch et al., 1995; Cortes et al., 2013; Di Martino et al., 2016). Los primeros trabajos que intentaron entender el mecanismo por el cual son traducidos los lmrNA, fueron realizados con el gen *cI* del fago λ . Este gen posee dos promotores descritos, denominados P_{RE} (*promoter for repressor establishment*) y P_{RM} (*promoter for repressor maintenance*), los cuales generan un transcrito con una región 5' no codificante de 403 nucleótidos y un lmrNA cuyo extremo 5' corresponde al codón de inicio AUG, respectivamente. Para evaluar los cambios en la eficiencia traduccional de *cI* bajo estrés oxidativo, se construyó una fusión traduccional de los primeros 100 codones de *cI* a *gfp*, en el vector plmRNA GFP. De esta manera generamos un lmrNA de similares características al generado por el promotor P_{RM} (Figura 23A).

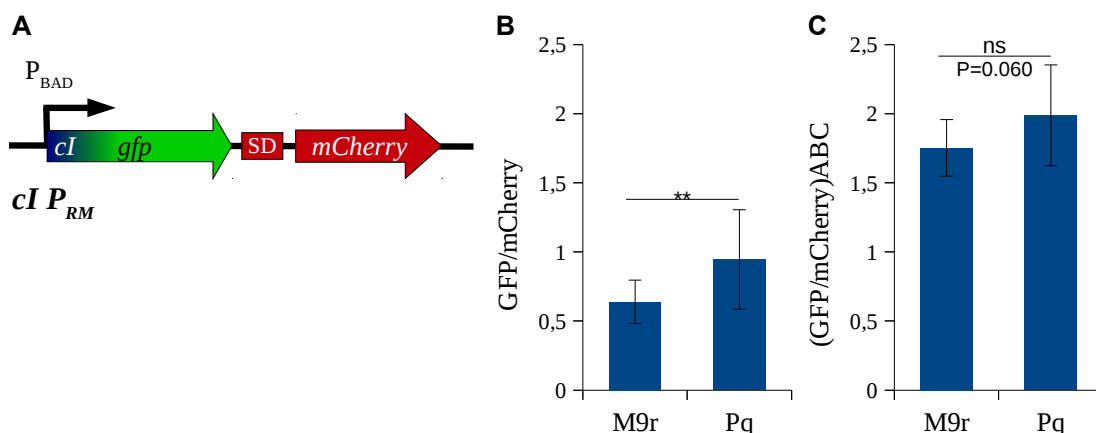


Figura 23. lmrNA silvestres se traducen de manera más eficiente bajo estrés oxidativo. A) Representación esquemática de la fusión traduccional y transcripcional *cI-gfp* y *mCherry*, respectivamente. El reportero genera un transcrito sin líder, con los 100 primeros codones del gen *cI* fusionados a *gfp*. La inducción de los transcritos se efectuó con 0,4% arabinosa en medio M9r o M9r con 250 μ M de paraquat (Pq), y los cultivos se realizaron a 37 °C con agitación. A partir de las cinéticas de aparición de fluorescencia, se calculó la eficiencia traduccional (GFP/mCherry) a las 2 horas (B) y el área bajo la curva de las mismas (C), en el período de 2 a 4 horas post inducción del reportero. ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$, test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Al hacer la comparación de la eficiencia traduccional del lmrNA de *cI-gfp*, observamos que bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat hay un aumento en su eficiencia luego de dos horas de inducción, respecto a la condición control (Figura 23 B). Sin embargo, llama la atención que la diferencia observada a las 2 horas no sea cercana a 10 veces, como había sido observada previamente, y que ésta pierda significancia estadística al extender el análisis entre 2 y 4 horas post inducción (Figura 23C). Cuando secuenciamos el extremo 5' del transcrito, observamos que este vector también incluyó la secuencia ATA en su extremo, y no sabemos si esto puede afectar de alguna manera la traducción de *cI*.

4.5. Evaluación del papel de MazF en la traducción de lmrNA

4.5.1. Dependencia de MazF en los cambios traduccionales de lmrNA bajo estrés oxidativo

Como se mencionó, existe una controversia sobre el papel de los sistemas toxina-antitoxina en la traducción de lmrNA, particularmente respecto al sistema MazEF. Por una parte, un grupo de investigadores ha planteado que este sistema actúa como regulador traduccional, inactivando parcialmente la maquinaria ribosomal en una condición de estrés, como consecuencia de la digestión de las secuencias aSD presente en rRNA 16S. Adicionalmente degradaría gran parte de los mRNA, pero en algunos casos la digestión de MazF produciría

lmRNA. En conjunto, esto generaría una población de ribosomas de estrés ($70S^{\Delta 43}$), cuya subunidad menor perdería afinidad por los mRNA con región líder, traduciendo preferentemente lmRNA también producidos por MazF (Vesper *et al.*, 2011; Temmel *et al.*, 2017). En contraste, otros investigadores han planteado que la endoribonucleasa MazF no generaría ribosomas $70S^{\Delta 43}$, y su activación bajo condiciones de estrés degradaría de manera no selectiva rRNA inmaduros y mRNA (Luidalepp *et al.*, 2016; Culviner *et al.*, 2018).

Para evaluar si los cambios traduccionales observados bajo estrés oxidativo con nuestro reportero plmRNA GFP son dependientes de la acción de MazF, se construyó una mutante del operón *mazEF* por recombinación homóloga con productos de PCR (Datsenko *et al.*, 2000). A partir del análisis de las cinéticas traduccionales en las cepas *E. coli* K12 silvestre (K12) y *E. coli* K12 $\Delta mazEF::FRT$ ($\Delta mazEF$), pudimos observar que la delección del sistema toxina-antitoxina MazEF no evita el incremento cercano a 10 veces en la traducción del reportero plmRNA GFP bajo estrés oxidativo (Figura 24). Si bien se observa una ligera disminución en la eficiencia traduccional de plmRNA GFP en la cepa $\Delta mazEF$, esta disminución también se ocurre para el reportero pSD GFP.

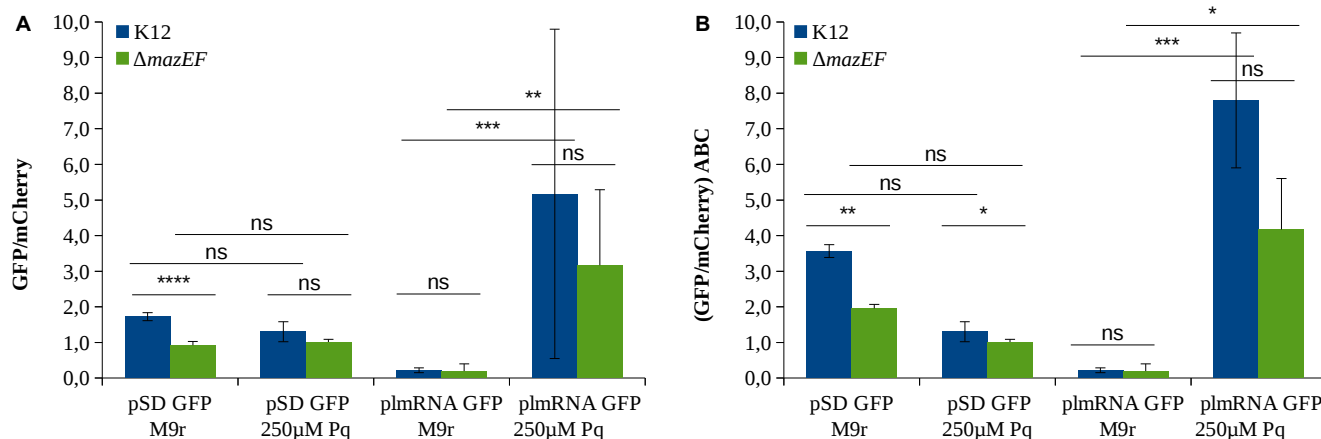


Figura 24. *mazEF* no es esencial para el aumento de eficiencia traduccional de los lmRNA bajo estrés oxidativo.

Eficiencia traduccional (GFP/mCherry) a las 2 horas (A) y área bajo la curva (ABC) de GFP/mCherry en el tiempo (B), en el período de 2 a 4 horas post inducción, de los reporteros pSD GFP y plmRNA GFP en las cepas *E. coli* K12 MG1655 silvestre (K12) y *E. coli* K12 $\Delta mazEF::FRT$ ($\Delta mazEF$). Todas las mediciones fueron realizadas en medio M9r con ampicilina, tras la inducción de la producción del transcrito con 0,4% arabinosa, a 37 °C con agitación. La inducción de estrés oxidativo se efectuó con 250 μ M de paraquat. **** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$. Análisis por test de *Kruskal-Wallis* y posterior comparación múltiple con test de *Dunn*.

Es importante considerar que entre los sistemas toxina-antitoxina existe una gran redundancia funcional. Particularmente en el caso de MazEF, se ha descrito que el operón *chpBK* codifica una endoribonucleasa similar a MazF, cuya secuencia de reconocimiento ACY (Y=G, A o U) es similar a la secuencia reconocida por MazF

(ACA). De forma similar a MazF, la producción de la toxina ChpB disminuye la traducción, aunque a un 60% de los niveles normales (Masuda et al., 2017). Si ambas endoribonucleasas mostraran redundancia funcional en la generación de ribosomas de estrés ($70S^{\Delta 43}$), tal vez se requeriría la mutación de ambas para observar diferencias a nivel de la traducción de lmRNA bajo estrés oxidativo. Además, prácticamente todos los modelos que han sido utilizados para la caracterización de MazF como regulador traduccional corresponden a cepas de *E. coli* que sobreexpresan dicha proteína. Esto puede ser causante del enmascaramiento del efecto de otras ribonucleasas en tales estudios (Vesper et al., 2011; Sauert et al., 2016; Temmel et al., 2017). Por estas razones, los resultados no nos permiten descartar que MazF tenga alguna incidencia en incremento de la eficiencia traduccional de lmRNA bajo estrés oxidativo. Sin embargo, si podemos descartar a MazF como único y/o principal factor responsable del procesamiento necesario para que aumente la traducción de lmRNA bajo estrés oxidativo.

4.5.2. Determinación del papel de MazF en la producción de nuevos lmRNA bajo estrés oxidativo

Debido al diseño de las construcciones génicas utilizadas anteriormente, la totalidad de los transcritos corresponderá a un mRNA con región líder (pSD GFP) o a un lmRNA (plmRNA GFP). Sin embargo, algunos autores han propuesto que la endonucleasa MazF participaría en la generación de nuevos mRNA carentes de líder a partir de transcritos con líder (Vesper et al., 2011). Para evaluar esta posibilidad, quisimos comparar cambios en la eficiencia traduccional de mRNA que han sido descritos como blancos de procesamiento por MazF (Sauert et al., 2016).

Recientemente se describieron probables blancos de MazF, con sus respectivos sitios de corte ACA, en cepas de *E. coli* que sobreexpresan *mazF*. Entre éstos, se encuentran 4 genes pertenecientes a los regulones SoxRS y OxyR: *fpr*, *katG*, *nepI* y *zwf* (Sauert et al., 2016). Debido a que en la literatura hay datos experimentales sobre el inicio de transcripción de *katG* (Tartaglia et al., 1989), se escogió este gen para realizar una fusión entre su transcrito y la región codificante de *gfp*, construcción que incluye la región 5' no codificante de *katG* y los primeros 100 codones del gen. Además, se generó una mutación puntual en el sitio de corte ACA (reemplazándolo por AGA), para obtener un transcrito no procesable por MazF (Figura 25A). Al analizar la razón de las fluorescencias GFP/mCherry a las 2 horas, observamos que no hay diferencias evidentes en condición control (M9r) entre los reporteros *katG-gfp(ACA)* y *katG-gfp(AGA)*, en la cepa silvestre. Sin embargo, bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat observamos que aquel reportero con un sitio de procesamiento reconocible por MazF (*katG-gfp(ACA)*) cuenta con una mayor eficiencia traduccional que aquel en que fue mutado el sitio de reconocimiento de la endoribonucleasa (Figura 25B). Esto significaría que la presencia de la secuencia ACA en la región 5' no codificante del transcrito estaría relacionado con la eficiencia de traducción de dicho transcrito. Para evaluar si MazF es responsable de esta diferencia, analizamos ambos reporteros en una cepa carente del sistema toxina-antitoxina, y no observamos diferencias entre los reporteros

tanto en condición control como bajo estrés oxidativo (Figura 25B).

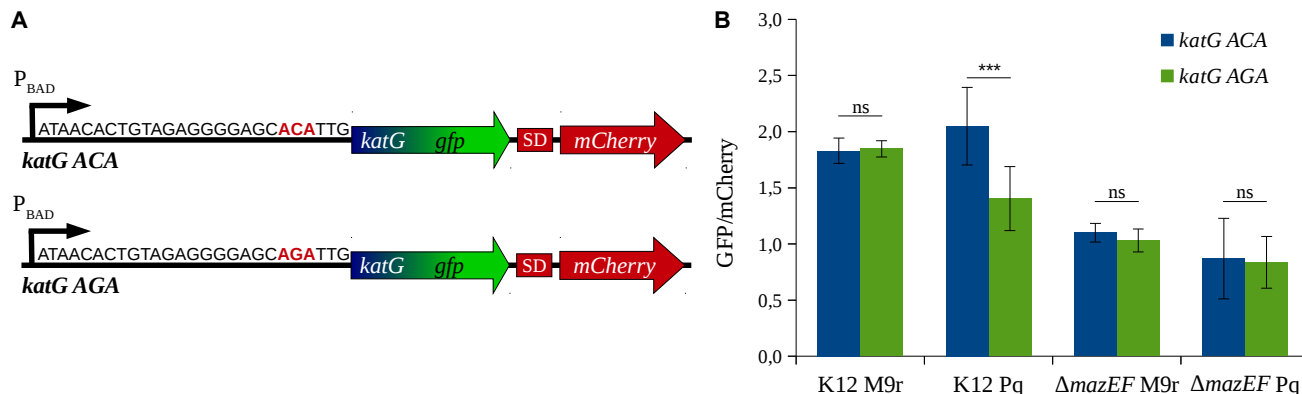


Figura 25. Análisis de la eficiencia traduccional de *katG-gfp* bajo estrés oxidativo inducido con paraquat. En la figura se muestra la relación entre la intensidad de fluorescencia de los reporteros fluorescentes de la fusión traduccional *katG-gfp*, y sus respectivas fusiones transcripcionales a *mCherry*. Todas las mediciones fueron realizadas en medio M9r con ampicilina, tras la inducción de la producción del transcrito con 0,4% arabinosa, a 37 °C con agitación. **A)** Las fusiones *katG-gfp* poseen la región 5' no codificante del transcrito de *katG*, más los primeros 100 codones de la región codificante. Las construcciones varían únicamente en la región líder, al contar con la secuencia ACA (*katG ACA*) o tener dicho sitio mutado con AGA en su lugar (*katG AGA*). **B)** Relación GFP/mCherry entre las distintas construcciones génicas de *katG-gfp* en la cepa silvestre y en la mutante del operón *mazEF*, en condición control y bajo estrés oxidativo inducido 250 μM de paraquat, durante 2 horas. ***P<0,001. Análisis por *t-student* con corrección de *Welch*.

Dado que previamente observamos que MazF no tiene un papel relevante en los cambios de la maquinaria traduccional vinculados al incremento en la eficiencia traduccional de lmrna bajo estrés oxidativo (Figura 24), estos últimos datos sugieren que MazF participaría en algún tipo de procesamiento del transcrito de *katG*, incrementando su eficiencia traduccional bajo estrés oxidativo. Considerando que los reporteros difieren únicamente en la secuencia correspondiente al sitio de corte descrito para MazF, a partir del cual se daría origen al lmrna de *katG*, se puede proponer que el aumento en la traducción de *katG-gfp(ACA)* se debe a que al menos una fracción del mRNA se procesa a lmrna y este se traduce más eficientemente. Este resultado es similar al descrito recientemente para el mRNA de *grcA* (blanco de MazF), cuya traducción aumenta en una parte de la población bacteriana al sobreexpresar MazF (Nikolic et al., 2017).

Si bajo estrés oxidativo está ocurriendo un procesamiento del transcrito de *katG-gfp(ACA)*, *in vivo* debiésemos encontrar ambas poblaciones de transcrito (mRNA y lmrna) compitiendo por la maquinaria traduccional. Para verificar esto se utilizó el método *SMART*, para el análisis del extremo 5' de transcritos purificados de una condición de estrés. La población de cDNA obtenidos fue clonada en el vector pGEM-T y se analizaron 12 clones para cada uno de los reporteros. Dado que las diferencias en la eficiencia traduccional de *katG-gfp* observadas bajo estrés oxidativo fueron dependientes de MazF, esperábamos encontrar transcritos de

katG-gfp(ACA) cuyo inicio coincidiera con el sitio de corte de tal endonucleasa. Sin embargo, de los 12 clones secuenciados para cada reportero se obtuvo un grupo que coincidía con el inicio de transcripción diseñado por nosotros, un grupo distribuido de manera aleatoria entre el extremo 5' y los primeros codones (posiblemente producto de la degradación del RNA), pero ningún clon que diera cuenta del sitio de corte ACA. Considerando que bajo estrés oxidativo se han descrito defectos a nivel transcripcional además de la degradación masiva de mRNA, y que las diferencias a nivel traduccional son cercanas al 20% (Figura 24), es posible que la población de mRNA procesados en el sitio ACA sea muy pequeña, y se requiera analizar un mayor número de clones para la pesquisa de tal procesamiento. Para realizar un mejor análisis de este tipo de cambios en el extremo 5' de los transcritos, es preferible utilizar técnicas de secuenciación masiva del transcriptoma bajo estrés oxidativo, ya que secuenciarían toda la población de cDNA generados, indicando con mayor exactitud y precisión los inicios de cada transcrito.

4.5.3 Formación de ribosomas de estrés 70S^{Δ43} bajo estrés oxidativo

Nuestros experimentos usando reporteros codificados en l-mRNA sugieren que MazF no participa en la activación de la traducción bajo estrés oxidativo, confirmando lo que otros autores han observado al sobreexpresar MazF. Sin embargo, existe una importante controversia respecto a este punto. Como se mencionó, se ha propuesto que la endoribonucleasa MazF escindiría los últimos 43 nucleótidos del extremo 3' del rRNA 16S de la subunidad menor del ribosoma (30S) y/o de ribosomas completos (70S), generando una subpoblación de ribosomas que fue denominada por el grupo de la Dra. *Isabella Moll* "ribosomas de estrés" (70S^{Δ43}) (*Vesper et al., 2011; Temmel et al., 2017*). Para determinar si MazF procesa el rRNA 16S bajo estrés oxidativo inducido con paraquat, se analizó mediante RT-PCR en tiempo real la integridad del extremo 3' de este rRNA, utilizando partidores que flanquean a la secuencia ACA que ha sido propuesta en la literatura como blanco de MazF (Figura 26) (*Vesper et al., 2011*).

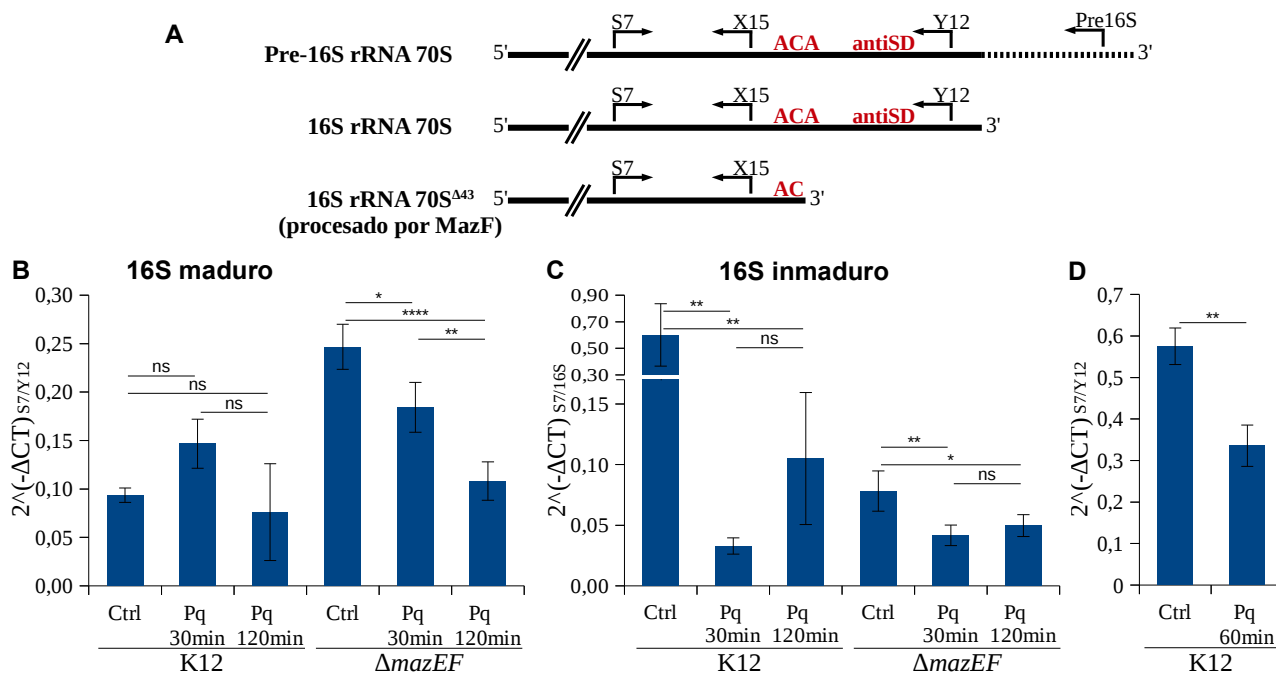


Figura 26. Análisis de la integridad del extremo 3' del rRNA 16S de *E. coli* bajo estrés oxidativo. A partir de RNA extraído de las cepas *E. coli* K12 silvestre (K12) y *E. coli* K12 $\Delta mazEF$ ($\Delta mazEF$) en condición control o sometidas a estrés oxidativo con paraquat, se generó cDNA con partidores al azar. Posteriormente se realizó PCR en tiempo real para determinar los niveles de distintas secciones en el extremo 3' del rRNA 16S. **A)** Esquema de partidores utilizados. Los partidores S7 y X15 fueron utilizados para generar un producto río arriba del sitio de procesamiento, utilizado como control interno. Los partidores S7 e Y12 se usaron para generar un producto que incluye sitio de corte de MazF. Los partidores S7 y pre16S se utilizaron para determinar los niveles de rRNA 16S inmaduro. **B)** Gráfica de los niveles del producto de PCR S7/Y12, utilizando como control interno el producto de PCR S7/X15. Las cepas fueron crecidas en medio M9r y luego sometidas a estrés con 250 μ M de paraquat durante 30 o 120 minutos. **** $P \leq 0,0001$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$. ANOVA de una vía con test de *Dunnet* para comparaciones múltiples. **C)** Gráfica de los niveles del producto de PCR S7/pre16S, utilizando como control interno el producto de PCR S7/X15. Las cepas fueron crecidas en medio M9r y luego sometidas a estrés con 250 μ M de paraquat durante 30 o 120 minutos. ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$. ANOVA de una vía con test de *Dunnet* para comparaciones múltiples. **D)** Gráfica de los niveles del producto de PCR S7/Y12, utilizando como control interno el producto de PCR S7/X15. Las cepas fueron crecidas en medio LB y luego sometidas a estrés con 1 mM de paraquat durante 60 minutos. ** $P \leq 0,01$. Análisis por *t-student*.

Mediante el análisis de RT-PCR en tiempo real, se buscó detectar cambios en los niveles de la sección que abarca del partidor S7 al Y12, la cual corresponde al extremo 3' completo del rRNA 16S, respecto a un control interno dentro del mismo rRNA 16S (sección entre S7 y X15). De acuerdo a este análisis realizado en la cepa

silvestre, no se observaron cambios en los niveles del extremo 3' completo del rRNA 16S, luego de la inducción del estrés oxidativo con 250 μ M de paraquat en medio M9r con ampicilina. Esto nos sugiere la ausencia de una digestión en el extremo 3' del rRNA 16S, gatillada por el estrés oxidativo. Extrañamente, cuando realizamos el mismo análisis en la cepa carente del sistema toxina-antitoxina MazEF, observamos mayores niveles iniciales del rRNA 16S íntegro respecto a la cepa silvestre, y luego del estrés oxidativo una disminución progresiva en sus niveles (Figura 26B). Esta diferencia inicial podría corresponder a una condición de estrés por carencia de nutrientes (dado que los ensayos son realizados en medio mínimo M9r), donde el sistema MazEF contribuye con su acción endonucleasa en la reducción de los niveles de ribosomas, en la cepa silvestre. Sin embargo, cuando comparamos los niveles del precursor del rRNA 16S (el cual tiene una mayor longitud) utilizando un partidador que hibrida en una región del rRNA inmaduro, observamos que los niveles iniciales son mayores en la cepa silvestre (Figura 26C). Esto nos indica que en la cepa silvestre la transcripción de rRNA y síntesis de ribosomas se encuentra más activa que en la mutante. Además, durante la realización de los cultivos para la extracción de RNA, nos percatamos que la cepa *E. coli* Δ mazEF tardó cerca del doble del tiempo en alcanzar la DO600 requerida. Tomando esto en consideración, es probable que al poseer una tasa de duplicación menor, la tasa de síntesis de ribosomas también sea menor, lo que se ve reflejado en los bajos niveles de pre rRNA 16S (Figura 26B y C).

También observamos que los niveles de pre rRNA 16S disminuyen inmediatamente después de la inducción de estrés oxidativo. Sin embargo, esta disminución no es proporcional entre *E. coli* silvestre y *E. coli* Δ mazEF (Figura 26B). Esta drástica disminución en la cepa silvestre representa de una rápida detención de la transcripción y degradación del pre rRNA 16S restante, en que a los 30 minutos ya no detectamos intermediarios de la digestión que alteren el análisis de la sección entre S7 e Y12. De manera análoga a esta idea, una modesta degradación o procesamiento de pre rRNA 16S en la cepa *E. coli* Δ mazEF puede representar una degradación más lenta, causando la detección de intermediarios de la digestión que afectan el análisis de la sección entre S7 e Y12 en dicha cepa (Figura 26B).

De manera adicional, analizamos si la digestión del rRNA 16S mediada por MazF no era detectada en nuestros experimentos debido a diferencias en el medio de cultivo utilizado. Por esta razón, repetimos el análisis realizado con RT-PCR en tiempo real, a partir de RNA extraído de la cepa silvestre cultivada en medio LB. Para inducir estrés oxidativo en este medio de cultivo, la concentración de paraquat fue incrementada a 1 mM. A partir de este análisis, observamos una disminución cercana a un 40% de la región comprendida entre la zona de hibridación de los partidores X15 e Y12 (Figura 26D). Este resultado nos sugiere que estaría ocurriendo algún tipo de procesamiento en el extremo 3' del rRNA 16S, mediado por MazF o alguna otra ribonucleasa.

Dado que los resultados obtenidos a partir de medio LB discrepan con los obtenidos en medio mínimo y

que el análisis mediante RT-PCR nos entrega evidencia indirecta de posibles procesamientos en el extremo 3' del rRNA 16S, decidimos utilizar un nuevo enfoque en este análisis. Para ésto se realizaron *Norther blot* utilizando la sonda V7 (previamente utilizada por *Vesper et al., 2011*), que hibrida con el fragmento de 43 nucleótidos supuestamente escindido luego de la digestión del extremo 3' del rRNA 16S mediado por la endoribonucleasa MazF (Figura 27) (*Vesper et al., 2011*).

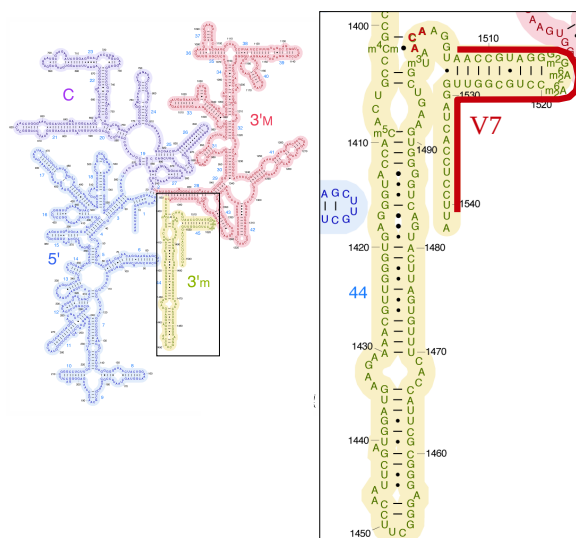


Figura 27. Región del rRNA 16S procesada por MazF. Estructura secundaria del rRNA 16S de *Escherichia coli*. La imagen ampliada muestra el extremo 3' del rRNA. La línea roja indica la zona de hibridación de la sonda V7, utilizada para detectar el procesamiento del rRNA 16S. En letras rojas de fondo amarillo se indica la secuencia ACA reconocida por la endoribonucleasa MazF.

Luego de múltiples intentos no fue posible detectar mediante *Northern blot* el fragmento de 43 nucleótidos. Así mismo, tampoco se pudo detectar el fragmento en muestras obtenidas bajo estrés inducido por cloranfenicol 25 $\mu\text{g/mL}$ o serinahidroxamato 100 $\mu\text{g/mL}$, condiciones en las que anteriormente el grupo de la Dra. *Moll* había detectado dicho fragmento durante el procesamiento de los ribosomas de estrés 70S ^{$\Delta 43$} (*Vesper et al., 2011*). Todo esto nos sugiere que en concordancia a lo publicado por *Luidalepp et al. (2016)* y *Culviner et al. (2018)*, en nuestra cepa de estudio no se generan ribosomas de estrés 70S ^{$\Delta 43$} bajo estrés oxidativo, y que los principales cambios a nivel de rRNA corresponderían a cambios en la biogénesis de ribosomas. De algún modo, MazF sería necesario para esta respuesta, ya que en la cepa $\Delta mazEF::FRT$ los niveles del precursor son muy bajos, independientemente de si se induce o no estrés oxidativo.

4.6. Cambios globales en los ribosomas bajo estrés oxidativo

Si bien, la hipótesis de la formación de ribosomas de estrés 70S^{Δ43} bajo estrés oxidativo cada vez tiene menos sustento, los resultados de las secciones previas muestran que la traducción de los lmrna es estimulada bajo estrés oxidativo. Para tener una mirada más global sobre qué alteraciones ocurren en los ribosomas bajo estrés oxidativo, se realizó un análisis del perfil de sedimentación de los componentes de la maquinaria traduccional mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (10-40%), con el objetivo de identificar posibles cambios que se relacionen con la traducción de lmrna bajo estrés oxidativo (Qin et al., 2013). De acuerdo a datos descritos en la literatura, en los perfiles de lisados provenientes de cultivos en medio mínimo M9r se pueden observar subunidades 30S y 50S libres, un pico mayoritario correspondiente a monosomas (70S), y una fracción de polisomas corresponden a los mRNA con mayor actividad traduccional que los mRNA de monosomas (Figura 28, perfiles rojos) (Qin et al., 2013). Estos picos también fueron observados en extractos de cultivos inducidos a estrés oxidativo con paraquat 250 μM durante 30 minutos o 60 minutos (Figura 28, perfiles azules). Sin embargo, entre los picos correspondientes para la subunidad 50S libre y ribosomas completos (70S), se observa la aparición de una partícula de tamaño intermedio, cuya abundancia varía en el tiempo. Proponemos que la presencia de esta partícula puede explicarse de dos maneras: 1) ribosomas completos (70S) que están perdiendo proteínas o fragmentos de rRNA producto del estrés oxidativo, generando partículas de un coeficiente de sedimentación menor. 2) Alteraciones en la biogénesis ribosomal, generando subunidades ribosomales que presentan tamaño alterado, por ejemplo por problemas en el procesamiento de los rRNA. Algunos análisis sobre los efectos del antibiótico kasugamicina (que estimula la traducción de lmrna) han mostrado que éste reduce los niveles de al menos 6 proteínas ribosomales de la subunidad menor (algunas de ellas muy relevantes para la traducción, como S1 y S12), generando un pico de 61S en los perfiles de ribosomas (Delvillani et al., 2011; Kaberdina et al., 2009). Por otra parte, otros autores han mostrado que cambios en el procesamiento del extremo 5' del rRNA 16S puede alterar la incorporación de la proteína 20S, y que estos ribosomas inmaduros pueden llegar a estar presentes en polisomas (Dahlberg et al., 1978). Esto plantea que ambas posibilidades pueden tener un rol regulatorio en la traducción, el cuál se vea reflejado en el aumento de la eficiencia traduccional de lmrna bajo estrés oxidativo. Al comparar mediante electroforesis en gel (Tricina-SDS-PAGE) los perfiles de proteínas del nuevo pico observado bajo estrés oxidativo versus el pico correspondiente al 70S, no se pudieron observar diferencias. Esto pudo deberse a la poca resolución de los geles utilizados, y a que gran parte de las proteínas ribosomales son de tamaños similares. Para realizar un análisis de los cambios estequiométricos entre las proteínas ribosomales, los trabajos más recientes en el tema realizan identificación y cuantificación mediante espectrometría de masa (Gibbs et al., 2017).

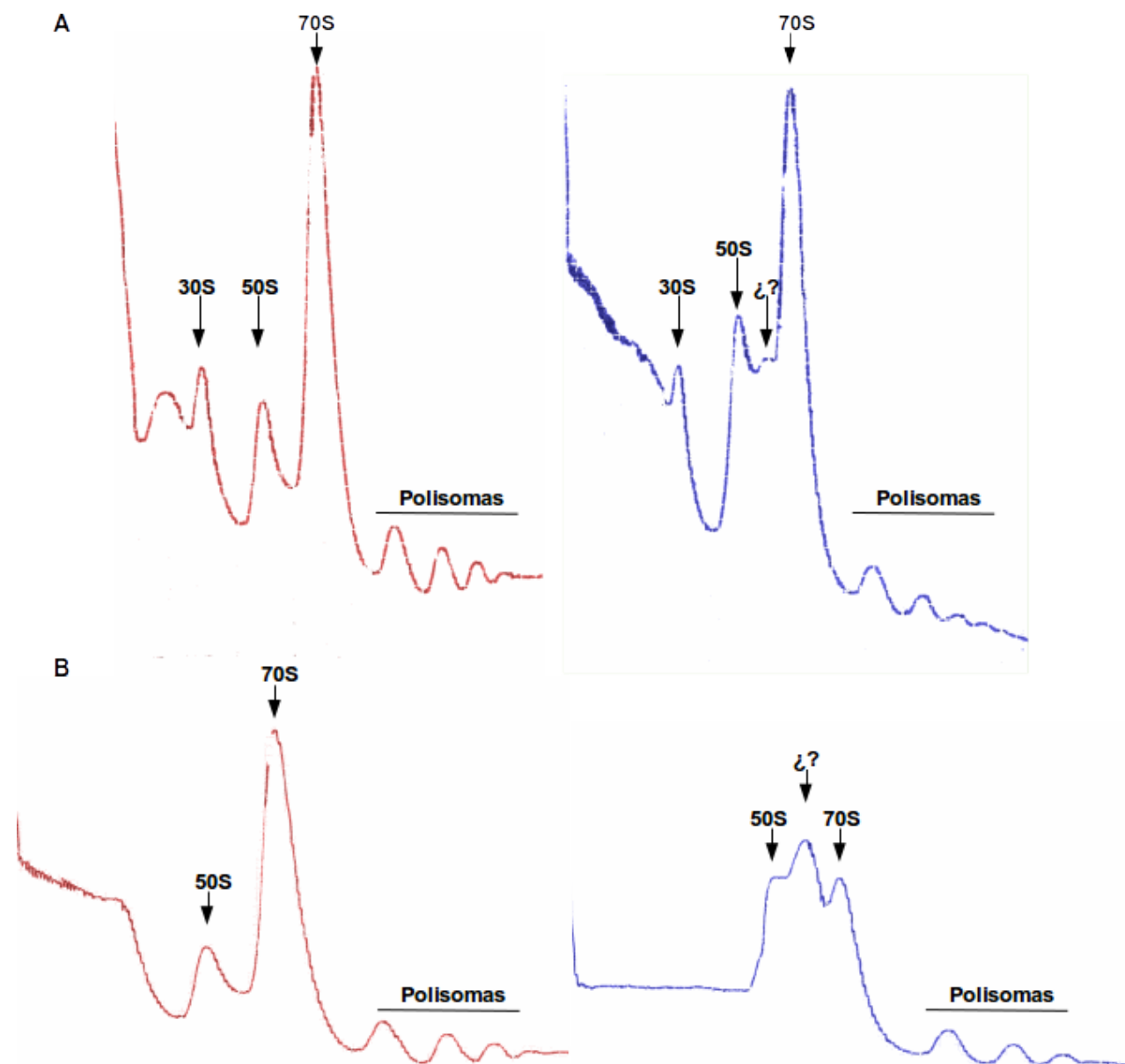


Figura 28. Perfil de ribosomas de *E. coli* bajo estrés oxidativo. Perfiles de sedimentación de extractos cargados en gradientes de 10 a 40% de sacarosa. A la izquierda se muestran en rojo los perfiles correspondientes a extractos de cultivos realizados bajo condición control y a la derecha se muestra en azul los correspondientes a cultivos bajo estrés oxidativo (250 μ M paraquat). Se muestran los resultados luego de (A) 30 (flujo de 0,75 mL/min) o (B) 60 minutos (flujo de 0,375 mL/min) post inducción de estrés.

4.7. Evaluación del papel de (p)ppGpp en la traducción de lmrRNA y mRNA canónicos

Se ha observado que frente a la carencia de aminoácidos en el medio de cultivo, las bacterias montan una

respuesta que involucra una serie de cambios en la fisiología bacteriana, muchos de los cuales son atribuibles a la acumulación de la alarmona guanosina tetrafosfato o pentafosfato ((p)ppGpp). En *E. coli* esta molécula es capaz de interactuar con alrededor de 30 proteínas implicadas en distintos procesos como: biosíntesis de purinas, homeostasis de (p)ppGpp, replicación del DNA, transcripción, biogénesis de ribosomas y traducción (Zhang *et al.*, 2018).

4.7.1. Inhibición en la traducción de mRNA canónicos dependiente de RelA

Algunos autores han determinado que bajo estrés oxidativo inducido con H₂O₂ también se activa la producción de (p)ppGpp en *E. coli* (Chang *et al.*, 2002). Para determinar si este metabolito cumple algún papel en la regulación de la traducción observada en nuestros reporteros, analizamos la eficiencia traduccional de los reporteros pSD GFP y plmRNA GFP en una mutante carente del gen *relA* ($\Delta relA::FRT$). Dado que la síntesis de (p)ppGpp es catalizada principalmente por la enzima RelA, con su eliminación buscamos reducir los niveles de este metabolito en condiciones de estrés. Al comparar el área bajo la curva de las curvas de GFP/mCherry entre las distintas construcciones, observamos que la mutación afecta la traducción del reportero SD GFP, y no así el reportero lmRNA GFP (Figura 29A).

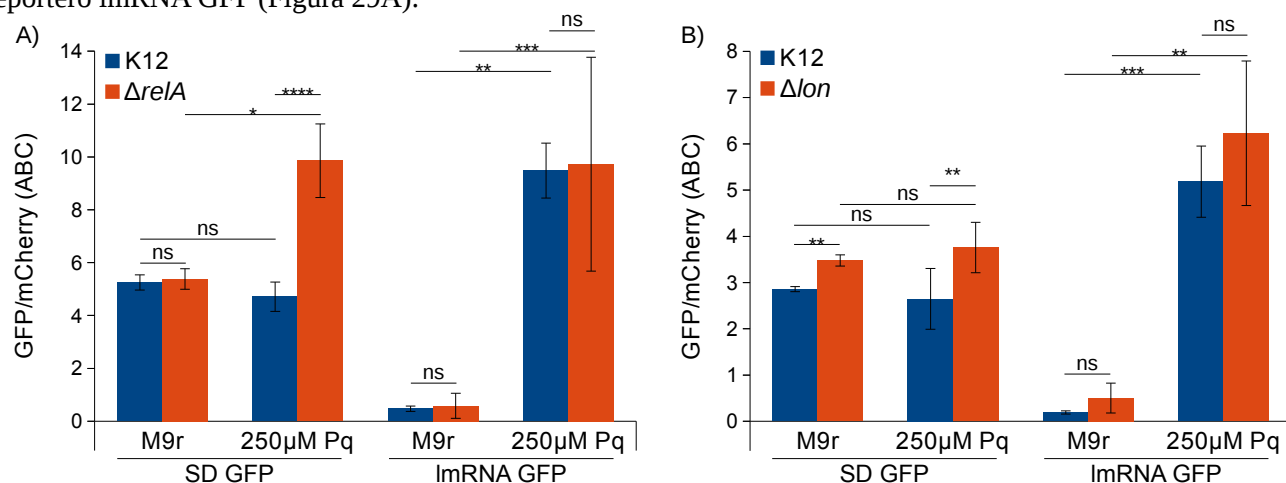


Figura 29. Análisis de la eficiencia traduccional de SD GFP y lmRNA GFP en las mutantes $\Delta relA$ y Δlon . En la figura se muestra el área bajo la curva (ABC) de las cinéticas GFP/mCherry en el tiempo, en el intervalo de 2 a 4 horas post inducción. Fueron analizados los reporteros pSD GFP y plmRNA GFP en la cepa *E. coli* K12 MG1655 (K12), *E. coli* K12 MG1655 $\Delta relA::FRT$ ($\Delta relA$) (A) y *E. coli* K12 MG1655 $\Delta lon::FRT$ (Δlon) (B). **** $\leq 0,0001$, *** $\leq 0,001$, ** $\leq 0,01$, * $\leq 0,05$. Análisis no paramétrico por test de *Kruskal-Wallis* y posterior comparación múltiple con test de *Dunn*.

En condición control, la traducción del reportero pSD GFP en la cepa silvestre es igual a la observada en la mutante $\Delta relA$. Sin embargo, bajo estrés oxidativo la traducción del reportero incrementa cerca del doble (Figura 29A). Esto nos sugiere que la acumulación de (p)ppGpp inducida bajo estrés oxidativo inhibiría la

traducción de mRNA convencionales. Algunos de las proteínas con las que interactúa (p)ppGpp, además lo hacen con GTP. Este es el caso de IF2, el cual requiere de su unión a GTP para la formación del complejo de preiniciación de la traducción. Algunos autores han determinado que la afinidad de IF2 es mayor por (p)ppGpp que por GTP (Mitkevich *et al.*, 2010). Esto nos permite plantear que bajo estrés oxidativo inducido con paraquat ocurre un incremento de las concentraciones intracelulares de (p)ppGpp, el cual compite con GTP por su unión a IF2. Dado que (p)ppGpp es un análogo no hidrolizable de GTP, IF2 sería inhibido bajo estrés oxidativo en la cepa silvestre. La ausencia de cambios en la traducción de lmrna GFP bajo estrés oxidativo (Figura 29A) podría ser explicada por el hecho que ésta prescinda de la formación del complejo de preiniciación (Udagawa *et al.*, 2004) y por lo tanto de IF2.

4.7.2. Papel de Lon en la regulación de los niveles de ribosomas bajo estrés oxidativo

Parte de los cambios gatillados en respuesta al estrés por carencia de aminoácidos es la activación de la proteasa Lon, la cual degrada una serie de proteínas ribosomales para suplir la carencia de aminoácidos. Sin embargo, para ejercer su actividad proteolítica esta proteína requiere formar un complejo con otros monómeros de Lon y cadenas de polifosfatos inorgánicos (Kuroda *et al.*, 2001). Los niveles de polifosfatos inorgánicos son dependientes de las enzimas polifosfato kinasa (PPK) y exopolifosfatasa (PPX), las cuales extienden o degradan dichas cadenas. El aumento en los niveles de (p)ppGpp inhibe la actividad de PPX, producto de una interacción directa entre el metabolito y la fosfatasa. Esto tiene como consecuencia un rápido incremento en los niveles de polifosfatos inorgánicos en *E. coli* (Kuroda *et al.*, 1997). Para determinar si el incremento en la eficiencia traduccional de lmrna bajo estrés oxidativo requiere la degradación de ciertas proteínas ribosomales mediada por Lon, se evaluó la contribución de Lon utilizando una mutante *E. coli* K12 MG1655 $\Delta lon::FRT$ (Δlon). Al analizar el área bajo la curva de la gráfica de GFP/mCherry en el reportero SD GFP, observamos que no hay diferencias significativas entre la condición control y estrés inducido con 250 μ M de paraquat. Para el caso del reportero plmrna GFP observamos bajos niveles de traducción en condición control y el incremento antes reportado bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat, para ambas cepas analizadas. Sin embargo, al comparar cada condición entre la cepa silvestre y la mutante Δlon , observamos un leve incremento en los niveles de traducción en la mutante de *lon* (Figura 29B). Esto indica que la proteólisis catalizada por Lon no está vinculada con el incremento en la eficiencia traduccional de lmrna bajo estrés oxidativo. Por otra parte, al parecer la proteasa Lon reduciría los niveles de ribosomas en medio M9r. A partir de estos resultados no podemos determinar si los niveles de (p)ppGpp en condición control son más elevados, o si existe un nivel basal de proteólisis independiente de la acumulación de (p)ppGpp.

4.8. Análisis de la etapa limitante en la traducción bajo estrés oxidativo

4.8.1. Verificación de la disminución global en la tasa traduccional bajo estrés oxidativo

En secciones anteriores se mostró el análisis de cambios en la eficiencia traduccional (GFP/mCherry) para cada uno de los codones codificantes bajo condiciones de estrés oxidativo (Figura 7). En dicho análisis se observó una disminución generalizada en la eficiencia traduccional de los codones bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat. Si bien analizamos el papel inhibitorio que ejerce (p)ppGpp sobre la iniciación de mRNA canónicos (IF2) (Figura 29), nuestros experimentos no nos permiten descartar un efecto similar sobre la elongación (EF-G y EF-Tu), terminación (RF3) y/o reciclaje (EF-G), e identificar la etapa limitante de la traducción bajo estrés oxidativo.

Para estimar cuán drástica es la caída en la velocidad de traducción durante de la etapa limitante decidimos inhibir fuerte y específicamente la elongación de la traducción de *gfp*. Un caso en el cual podemos afectar fuertemente la elongación es la traducción de prolinas. Debido a las diferencias estructurales del aminoácido, la traducción de motivos de poliprolinas requiere de la intervención del factor de elongación P (EF-P) para evitar su atascamiento en el ribosoma (Doerfel *et al.*, 2013). Para estimar la magnitud de esta disminución global en la tasa de traducción, comparamos la eficiencia traduccional de los codones de prolina en nuestros reporteros GFP, en la cepa silvestre y en la mutante *E. coli* K12 MG1655 Δ *efp*::FRT (Δ *efp*). En el caso de la cepa silvestre, observamos que en condición control los codones de prolina de baja frecuencia de uso CCT y CCC muestran una menor eficiencia traduccional respecto a los codones con mayor frecuencia de uso (CCA y CCG). Sin embargo, estas diferencias desaparecen bajo estrés oxidativo (Figura 30A), de acuerdo a lo observado en experimentos previos (Figura 7).

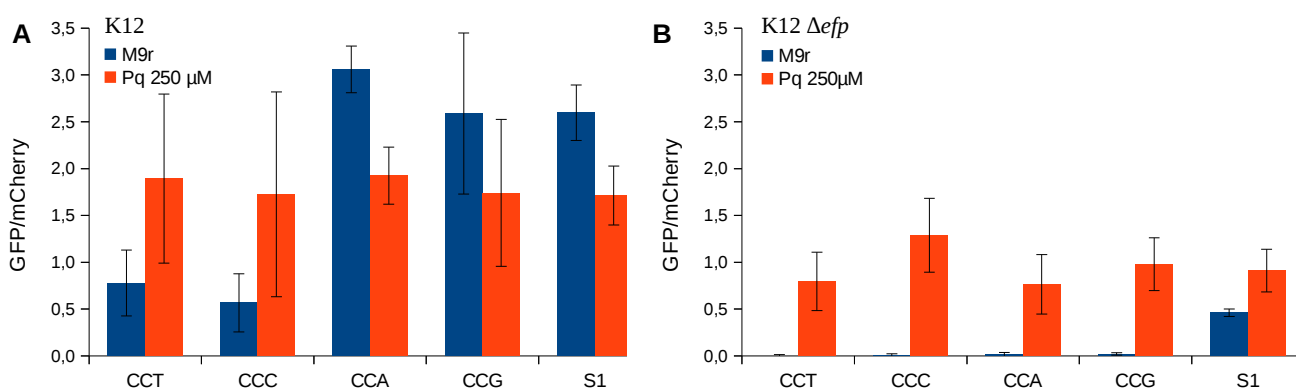


Figura 30. Efecto del estrés oxidativo sobre la traducción de motivos de poliprolinas. Eficiencia traduccional (GFP/mCherry) a las dos horas post inducción, de reporteros GFP con motivos de poliprolinas para cada codón. Estas mediciones fueron realizadas en la cepa silvestre *E. coli* K12 MG1655 (K12) (A) y en la mutante *E. coli* K12 MG1655 Δ *efp*::FRT (Δ *efp*) (B).

Cuando este mismo experimento se realiza en la mutante Δefp , observamos que el control S1 disminuye alrededor de 5 veces los valores de eficiencia traduccional, mientras que la síntesis de los reporteros GFP con poliprolinas cae bajo el límite de detección, en medio M9r (Figura 30B). Ensayos de pulso y caza para la detección de péptidos nacientes en la mutante Δefp muestran una reducción global en la síntesis de proteínas, como consecuencia del atascamiento de ribosomas en los motivos de poliprolinas en una mutante de *efp* (Tollerson et al., 2018). Esto concuerda con la disminución observada en la cepa Δefp transformada con el control S1, en medio M9r. En contraposición a lo observado en condición control, bajo estrés oxidativo se restaura la síntesis de poliprolinas e incrementa la eficiencia traduccional del control S1, en la mutante Δefp (Figura 30B). Esto nos indica que bajo estrés oxidativo se genera una etapa limitante, distinta y más lenta que la elongación de poliprolinas en la mutante Δefp .

4.8.2. Cambios a nivel de la iniciación versus cambios a nivel de la elongación

Hasta el momento hemos determinado la existencia de una reducción en la tasa traduccional bajo estrés oxidativo, pero no tenemos certeza de la etapa más preponderante en esta regulación. Generalmente se considera que el inicio es la etapa limitante del proceso traduccional. Para determinar si el inicio de la traducción es quien sufre la mayor disminución de velocidad bajo estrés oxidativo, convirtiéndose en la etapa limitante del proceso, se utilizaron las variantes de GFP con codones extra de leucina CTC y CTG, en los vectores pSD GFP y plmRNA GFP (Figura 31). Con esto se busca hacer competir los efectos de regulación a nivel de inicio de la traducción, con los efectos de los codones presentes en el transcrito sobre la etapa de elongación de la traducción.

Este nuevo análisis de los codones CTC y CTG replicó los resultados obtenidos previamente para reporteros con región líder, donde el codón CTG es traducido de manera más eficiente que el codón CTC en una condición control, mientras que la diferencia entre CTC y CTG disminuye bajo estrés oxidativo como se espera si el inicio es limitante. Además, la relación entre codones se invierte bajo estrés oxidativo, traduciéndose CTC a mayor velocidad que CTG. Distinto es lo observado para estos codones en el vector que genera reporteros sin región líder, ya que bajo condición control la traducción de CTC es mayor que la traducción de CTG. Esta relación es muy similar a la observada para los reporteros en el vector pSD GFP bajo estrés oxidativo, sugiriendo que tales diferencias son observables cuando la tasa de iniciación de la traducción se reduce, producto del estrés oxidativo o por la eliminación de la región líder del transcrito. Como se espera, al disminuir la velocidad del inicio de la traducción (que es la etapa limitante) las diferencias entre los reporteros con distintos codones son menores que las observadas con el vector con líder. Dado que los lmrRNA presentan una mayor velocidad de inicio bajo estrés oxidativo, si el inicio es la etapa limitante debiésemos observar un aumento en la relación GFP/mCherry independiente de los codones presentes en el transcrito. En cambio si no lo es, los aumentos en la velocidad de

inicio no deberían provocar cambios notorios en la razón GFP/mCherry, conservando la diferencia entre los codones CTC y CTG. Los datos confirman un aumento de velocidad apoyando la hipótesis que bajo estrés oxidativo la etapa limitante es el inicio. El hecho que la traducción del vector con CTC sea similar a la del vector con CTG, sugiere un cambio de velocidad del codón más lento o bien que el inicio de traducción de lmrna continúa siendo más lenta que la elongación bajo estrés por paraquat. Esto indica que los efectos codogénicos serán observables solamente si presentan una velocidad menor o similar a la que tenga la iniciación.

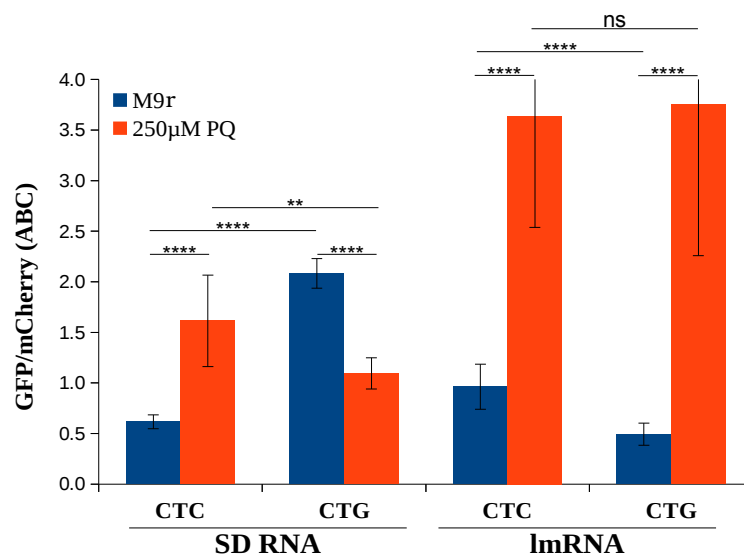


Figura 31. Efecto codogénico de leucina en vectores con y sin región líder. Se muestra la comparación del área bajo la curva de las cinéticas de la relación GFP/mCherry entre las distintas construcciones génicas en condición control y bajo estrés oxidativo inducido por 250 μM de paraquat. Todas las mediciones fueron realizadas en medio M9r, tras la inducción de la producción del transcrito con 0,4% arabinosa, a 37 °C con agitación. La inducción de estrés oxidativo fue efectuada con 250 μM de paraquat. Se utilizó la cepa *E. coli* K12 MG1655 silvestre. * P<0,05; **P<0,01; **** P<0,0001. Análisis por *t-student*.

4.9. Análisis predictivos

4.9.1. Estimación de la contribución en la eficiencia traduccional de cada codón en las variantes de GFP

Hasta el momento los resultados del análisis de la genoteca de variantes de GFP habían sido utilizados para identificar cambios en la velocidad de elongación de ciertos codones. Pero quisimos hacer uso de estos datos para la construcción de modelos teóricos que permitan predecir y explicar ciertos cambios observados bajo estrés oxidativo en el proteoma de *E. coli*. Como primera aproximación se utilizó un modelo lineal de traducción, que utiliza los valores de la razón GFP/mCherry obtenidos para cada una de las variantes de GFP de la genoteca y el

número de veces que se encuentra cada codón en los genes de *E. coli*. Es decir, a cada codón se le asigna el valor de la respectiva variante de GFP, y se obtiene un puntaje final por gen a partir de la sumatoria de todos los valores (Figura 32A). Sin embargo, con este análisis observamos que las diferencias entre las eficiencias traduccionales de los codones no se reflejan en el puntaje final, debido a que éste queda principalmente determinado por el tamaño del gen. Posteriormente, se utilizaron sistemas de ecuaciones para calcular la contribución de cada uno de los codones en la traducción de GFP a partir de los valores experimentales GFP/mCherry. Al utilizar estos nuevos valores para corregir el modelo, fue posible analizar cambios en los valores de eficiencia traduccional predicha entre genes de similar tamaño (Figura 32B). Sin embargo, se generan ciertas incoherencias tales como valores negativos de eficiencia traduccional predicha para algunos genes. Finalmente, se optó por un modelo exponencial basado en el cálculo de tAI (*tRNA Adaptation Index*) (*dos Reis et al., 2003*) que utiliza los coeficientes calculados para cada codón (a partir de un sistema de ecuaciones) e incluye el tamaño del gen analizado (Figura 32C). Para evaluar estos modelos, se compararon las estimaciones de la razón GFP/mCherry de reporteros que no fueron utilizados en la construcción del modelo (C1 y C2) con los valores experimentales obtenidos para estos reporteros. Este análisis indica que el modelo “C” basado en el cálculo de tAI es un mejor predictor de la eficiencia traduccional de fusiones a GFP.

A
$$ETP = [(GFP/mCherry)^{AAA} \cdot n^{\circ AAA}] + [(GFP/mCherry)^{AAG} \cdot n^{\circ AAG}] + \dots + [(GFP/mCherry)^{TTT} \cdot n^{\circ TTT}]$$

B
$$ETP = [(\beta_1 \cdot 1) + (\beta_2 \cdot \text{frec}_{AAA}) + (\beta_3 \cdot \text{frec}_{AAG}) + (\beta_4 \cdot \text{frec}_{AAC}) + (\beta_5 \cdot \text{frec}_{AAT}) + \dots + (\beta_{62} \cdot \text{frec}_{TTT})]$$

C
$$ETP = [(\beta_1)^1 \cdot (\beta_2)^{n^{\circ AAA}} \cdot (\beta_3)^{n^{\circ AAG}} \cdot (\beta_4)^{n^{\circ AAC}} \cdot (\beta_5)^{n^{\circ AAT}} \cdot (\beta_6)^{n^{\circ AGA}} \cdot \dots \cdot (\beta_{62})^{n^{\circ TTT}}]^{(1/(lg-1))}$$

Figura 32. Modelos matemáticos utilizados para el cálculo de la eficiencia traduccional predicha. **A)** Modelo lineal para el cálculo de Eficiencia Traduccional Predicha (ETP). $(GFP/mCherry)^{NNN}$ corresponde a los valores de la razón GFP/mCherry de cada una de las construcciones obtenidas con la genoteca. **B)** Modelo lineal para el cálculo ETP. β_1 corresponde a una constante que involucra cambios globales en el inicio y término de la traducción. β_2 a β_{62} son los coeficientes obtenidos para cada codón codificante. Los factores β son obtenidos a partir del sistema de ecuaciones, utilizando un modelo lineal. frec_{NNN} corresponde a la frecuencia de cada codón en la secuencia codificante. **C)** Modelo exponencial utilizado para el cálculo de la ETP. Los factores β son obtenidos a partir del sistema de ecuaciones, utilizando un modelo exponencial. N° es el número de veces que se encuentra cada codón en el gen analizado. lg es el número de aminoácidos que codifica el gen.

4.9.2. Comparación entre eficiencias traduccionales predichas para condición control y bajo estrés

Este nuevo modelo fue utilizado para comparar la eficiencia traduccional predicha (ETP) de los genes del regulón SoxRS/OxyR que son inducidos bajo estrés oxidativo y el resto del genoma. Hasta la fecha se ha determinado que el regulón SoxRS/OxyR está compuesto por 68 genes, de los cuales 52 genes se activan transcripcionalmente bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat (Seo *et al.*, 2015). A partir de estas predicciones se puede observar una fuerte disminución en la dispersión de ETPs para el genoma bajo estrés oxidativo (Figura 33A, Tabla 16). Sin embargo, se observa un incremento general en las ETPs de los genes pertenecientes al regulón SoxRS/OxyR (Figura 33B). Este resultado permite plantear que aquellos genes que deben ser traducidos bajo estrés oxidativo han adaptado su uso codogénico, incorporando codones que bajo estrés oxidativo permitirán una elongación más eficiente. A pesar de esta aparente adaptación, las ETPs del regulón SoxRS/OxyR son menores a la mediana del genoma, tanto en condición control como bajo estrés (Figura 33C y D). Esto sugiere que nuestro modelo de eficiencia traduccional basado en cambios en la elongación no es suficiente para explicar la regulación de la traducción bajo estrés oxidativo, ya que no considera factores como el nivel de los transcritos. Tomando en cuenta los resultados presentados en los objetivos anteriores, es probable que cambios a nivel de la iniciación de la traducción también tengan un fuerte impacto en la regulación bajo estrés.

	Genoma		Regulón SoxRS/OxyR	
	M9r	Pq	M9r	Pq
Promedio	1,02	0,97	0,57	0,79
Mediana	1,11	1,04	0,59	0,82
Moda	1,27	1,08	0,57	0,81
Curtosis	-0,59	2,69	0,03	6,84

Tabla 16. Descriptores estadísticos para las predicciones de las eficiencias traduccionales predichas en condiciones control y bajo estrés oxidativo. Estadígrafos de tendencia central (promedio, mediana y moda) y curtosis de la distribución de eficiencias traduccionales predichas para el regulón SoxRS/OxyR y el resto del genoma de *E. coli*, bajo condición control (M9r) y bajo estrés oxidativo inducido con paraquat (pq).

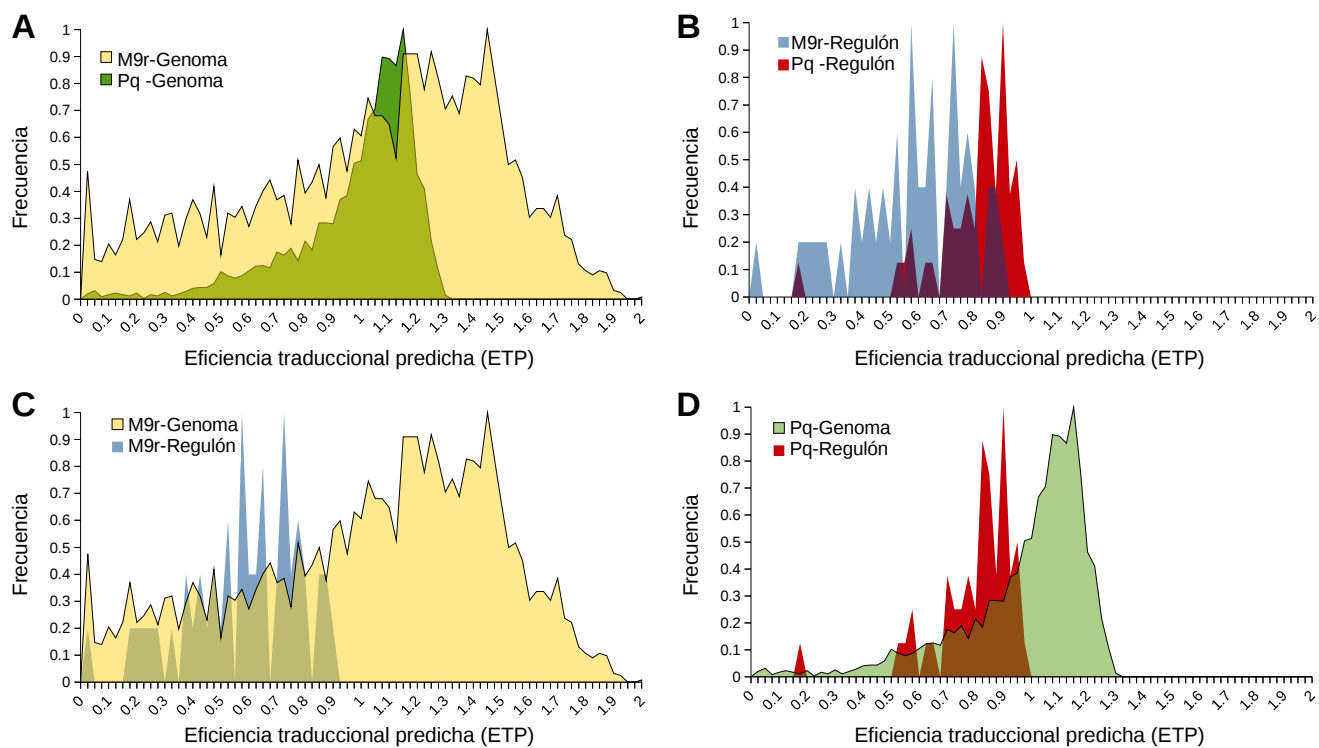


Figura 33. Distribución de las eficiencias traduccionales predichas en condiciones control y bajo estrés oxidativo. Los histogramas muestran el cambio de las ETPs para (A) el genoma en ambas condiciones, para (B) el regulón SoxRS/OxyR en ambas condiciones, para (C) el genoma completo y el regulón SoxRS/OxyR bajo condición control y para (D) el genoma completo y el regulón SoxRS/OxyR bajo estrés oxidativo.

5. DISCUSIÓN

5.1. Evolución de las estrategias experimentales para el estudio de la regulación de la traducción

En el marco del estudio de la síntesis de proteínas en respuesta a condiciones de estrés, la regulación de la traducción del mensaje genético es un área mucho menos abordada que la regulación de la transcripción. Es posible que la carrera por el desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos haya potenciado la exploración de la genómica y la transcriptómica, antes que la regulación de la traducción. Sin embargo, la masiva generación de datos de secuenciación de ácidos nucleicos, proveniente de distintos modelos biológicos, ha respaldado las observaciones realizadas desde la secuenciación de los primeros genes: el uso de codones dentro de la secuencia de un gen parece no ser aleatorio (*Min Jou et al., 1972*). No hicieron falta muchos años para que se evidenciara experimentalmente que la velocidad de traducción de una proteína dependía de la composición codogénica de los transcritos. A partir de la comparación de las cinéticas de la síntesis de proteínas radiomarcadas, se determinó que el uso de codones poco frecuentes se correlaciona con una menor tasa traduccional en *E. coli*, y viceversa (*Pedersen, 1984*).

Las estrategias experimentales basadas en el análisis de cinéticas de la síntesis de proteínas continuó siendo utilizada cerca de veinte años, hasta la incorporación de microarreglos y secuenciación masiva en el estudio de la traducción. Éstas facilitaron la identificación y cuantificación de transcritos asociados a ribosomas traduccionalmente activos (usualmente polisomas), permitiendo el desarrollo de técnicas como *polysome profiling*, *Ribo-seq* y *TRAP-seq* (*Translating Ribosome Affinity Purification*) (*Arava et al., 2003; Ingolia et al., 2009; Heiman et al., 2014*). Todas estas técnicas nos permiten obtener una “imagen” del traductoma en un momento preciso, estimando la densidad de ribosomas en cada uno de los transcritos.

Paralelamente, los avances en la capacidad de detección y análisis de péptidos mediante espectrometría de masas permitieron el desarrollo de estrategias con un enfoque proteómico en el estudio de la traducción. Es así que fue posible el desarrollo de técnicas como BONCAT (*Bioorthogonal Non-canonical Amino Acid Tagging*), pSILAC (*Pulsed Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture*) y QuaNCAT (una combinación de las dos técnicas anteriores), en las cuales el modelo de estudio es suplementado brevemente con aminoácidos no convencionales y/o radioisótopos, y posteriormente se determina la tasa de síntesis de las proteínas a partir del nivel de incorporación de estas marcas en el péptido naciente, identificado y cuantificado mediante espectrometría de masas (*Dieterich et al., 2006; Selbach et al., 2008; Howden et al., 2013*).

De todas las estrategias mencionadas, las únicas que han sido lo suficientemente sensibles para describir la cinética traduccional a nivel de codones, son aquellas derivadas del análisis de perfiles de ribosomas (*Ribo-seq*) (*Ingolia et al., 2009*). Brevemente, éstas consisten en una lisis y detención rápida de la maquinaria traduccional, seguidas de una degradación controlada del mRNA que no se encuentra protegido por los ribosomas.

Finalmente, se purifican y secuencian dichos fragmentos de mRNA. A partir de los resultados de la secuenciación masiva se determina la abundancia de cada fragmento, lo que permite determinar la densidad de ribosomas a lo largo de los transcritos. A partir de estos valores es posible estimar el tiempo relativo que tarda la lectura de cada codón (Ingolia *et al.*, 2009).

A pesar que esta metodología fue desarrollada hace diez años, aún existen controversias en cuanto a las etapas claves del procedimiento. Un ejemplo de esto es el uso de drogas para la detención de la traducción. Algunos autores defienden el uso de cicloheximida o cloranfenicol para detener la traducción en eucariontes o procariontes respectivamente, mientras que otros han detectado que estas drogas alteran el sitio en que los ribosomas se detienen (Sharma *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019; Mohammad *et al.*, 2019; Duncan *et al.*, 2017). Este y otros puntos como el método utilizado para la lisis celular, la elección de la ribonucleasa para la digestión del mRNA no protegido, la selección del tamaño de los fragmentos protegidos por el ribosoma, y la sustracción de rRNA, hace que la técnica sea muy susceptible a sesgos operacionales.

En este trabajo de tesis se rescata la estrategia basada en el análisis de la cinética de síntesis de reporteros. Para esto se utilizó un transcrito bicistrónico que codifica los genes *gfp* y *mCherry*, cuya transcripción depende del promotor inducible por L-arabinosa, P_{BAD} (Figura 6A). A partir de la comparación de la razón de las intensidades de fluorescencia de GFP y mCherry, pudimos comparar el efecto de la inserción de distintas secuencias en una zona cercana al inicio de la región codificante de *gfp*. Si bien pudimos haber utilizado la razón de las tasas de aumento en el tiempo de la intensidad de fluorescencia de cada reportero (cuyo valor es proporcional a la cantidad de proteína sintetizada), se desestimó este cálculo. Esto fue producto de los bajos y muy dispersos niveles de intensidad de fluorescencia observados en dicho intervalo de tiempo bajo estrés oxidativo. Sin embargo, observamos que las curvas del cociente de las intensidades de fluorescencia GFP/mCherry, tienen un comportamiento asintótico cuyo valor tiende a la razón de las pendientes luego de las 2 horas (Figura 6B).

Cuanto más utilizamos este sistema de reporteros, detectamos y corregimos las falencias que nos presentaba el modelo original. Por ejemplo, nos percatamos que muchas veces los niveles de traducción del primer gen incidían en los niveles de traducción del gen río abajo. Para la gran mayoría de nuestras construcciones, tanto *gfp* como *mCherry* poseen sitios de unión al ribosoma independientes, para que éstos inicien su traducción a través del mecanismo canónico de iniciación. Sin embargo, la fluorescencia de *mCherry* dependería parcialmente de la traducción de *gfp* ya que *mCherry* iniciaría parte de su traducción producto del resbalamiento de ribosomas provenientes de la traducción de *gfp* sobre el mismo transcrito. Este mecanismo ha sido descrito en policistrones y parece ser muy frecuente en *E. coli* (Yamamoto *et al.*, 2016). Para corregir esto, incorporamos una secuencia palindrómica capaz de generar una horquilla estable en el transcrito, la cual evita el resbalamiento de los ribosomas (Figura 15A). Esto nos permitió reducir la varianza de las intensidades de fluorescencia de

mCherry entre distintas construcciones, e incrementar la sensibilidad del sistema de genes reporteros (Figura 15B y C). Sin embargo, es importante recalcar que el resbalamiento solo atenúa las diferencias de expresión entre mCherry y GFP, por lo que los efectos observados en ausencia de la horquilla son conceptualmente correctos. Es decir, probablemente las diferencias observadas habrían sido mayores si hubiésemos utilizado un reportero con la horquilla en el diseño de la genoteca.

Luego de distintos ajustes operacionales y la mejora en el análisis de datos, fuimos capaces de obtener información acerca de la eficiencia traduccional de cada codón al utilizar la genoteca de variantes de *gfp* con sucesiones de cuatro codones repetidos, en distintas condiciones de cultivo (Figura 7). Al comparar algunos de los valores de eficiencia traduccional obtenidos con nuestro sistema de genes reporteros, como los codones de prolina, glicina, aspartato y aminoácidos ramificados, observamos que tenían un comportamiento similar a los resultados de *Ribo-seq* de otros grupos (Mohammad et al., 2019). Esto nos ayuda a validar el uso de nuestra genoteca para llevar a cabo el análisis de cambios en la eficiencia traduccional de codones en distintas condiciones, de manera rápida, de bajo costo, y a partir de pequeñas volúmenes de cultivo. Sin embargo, el uso de la genoteca de genes reporteros dificulta analizar el impacto de dichos codones en el contexto real de los transcritos ya que en la práctica es imposible probar todos los contextos posibles. Además, así como en los inicios se observó que la frecuencia del uso de codones no es aleatoria, hoy en día se han determinado combinatorias de codones que son fuertemente preferidas o evitadas por parte de genomas virales, eucariontes y procariontes (Tats et al., 2008; Wu et al., 2010). Todos estos efectos sinérgicos en la regulación de la traducción son difíciles de analizar con el uso de genes reporteros, de modo que para estos casos el análisis de perfiles de ribosomas seguirá siendo la metodología más idónea.

5.2. Cambios en la eficiencia traduccional de codones

Como se mencionó, a través de la introducción de sucesiones de cuatro codones idénticos en el extremo 5' de la región codificante de *gfp* pudimos observar diferencias en la eficiencia traduccional entre los distintos codones codificantes, tanto en condición control como bajo estrés oxidativo inducido con 250 μ M de paraquat. En algunos grupos de codones, como los codificantes de glicina y prolina, se observó una correlación entre los valores de frecuencia de uso en el genoma de *E. coli* y los valores de eficiencia traduccional en condición control (razón GFP/mCherry de las intensidades de fluorescencia). Sin embargo, bajo estrés oxidativo ocurren cambios que modifican este tipo de correlaciones. El más llamativo de éstos es una disminución generalizada en la eficiencia traduccional para todos los codones (Figura 7). Luego de distintas comparaciones entre los datos de eficiencia traduccional en condición control y bajo estrés oxidativo, podemos diferenciar tres grupos. En el grupo mayoritario los codones que codifican un mismo aminoácido disminuyen de manera proporcional, es decir, en este grupo los codones que se traducen más rápido para un aminoácido bajo condición control siguen

siendo los codones más rápidos para el aminoácido bajo estrés oxidativo. En los otros dos grupos, los codones se alejan medianamente (una desviación estándar) o bastante (dos desviaciones estándar) de la proporcionalidad, es decir, cambiando la razón entre las velocidades en que se traducen cada uno de los codones de un aminoácido (Figura 9C).

La disminución generalizada de la tasa de síntesis de proteínas en cultivos sometidos a una condición de estrés oxidativo es un fenómeno que ya había sido descrito en la literatura. Algunos autores plantean que esto se debe a una rápida y masiva degradación de tRNA al inducir estrés oxidativo en cultivos de *E. coli* (Zhong *et al.*, 2015; Sørensen *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019). Sin embargo, existen ciertas contradicciones en estas afirmaciones. Por una parte, Zhu *et al.* (2015) indican que esta degradación alcanzaría su máximo cerca de los 5 minutos luego de la inducción de estrés, y los niveles de tRNA se restituirían a los 30 minutos (Zhu *et al.*, 2019). Mientras que Zhong *et al.* (2019) muestran que esta degradación continúa siendo observable luego de 60 minutos luego de la inducción de estrés (Zhong *et al.*, 2015). Por otra parte, análisis realizados en nuestro laboratorio mostraron por *Northern blot* que los niveles de tRNA^{Gly} no eran alterados luego de la inducción de estrés oxidativo (Figura 3A). Adicionalmente, experimentos de electroforesis de RNA mostraron que el resto de los tRNA tampoco se degradaba. Estos resultados podrían ser coherentes con lo observado por el grupo de Zhu *et al.* (2019), dado que nuestros análisis fueron realizados una vez transcurridos 30 minutos desde la inducción de estrés oxidativo. Por otra parte, algunos autores han observado que en otras γ -proteobacterias la degradación de tRNA afectaría principalmente a tRNA hipomodificados bajo condiciones de estrés (Kimura *et al.*, 2019). Considerando que algunos de los trabajos mencionados reportaron reducción de los niveles de tRNA utilizando métodos dependientes de la retrotranscripción de éstos, es posible que exista un sesgo en dichos análisis, y que las diferencias observadas correspondan a cambios en los niveles de tRNA inmaduros, ya que las modificaciones químicas de nucleótidos de los tRNA dificultan su uso como sustrato de la transcriptasa inversa (Wilusz, 2015).

Un factor que puede tener un impacto transversal en cambios en la velocidad de traducción es la acumulación de (p)ppGpp inducida por el estrés oxidativo. Algunos trabajos vinculan los niveles de (p)ppGpp con la tasa de síntesis de nuevos tRNA y rRNA (Ryals *et al.*, 1982). También se ha descrito que este metabolito puede interactuar con varios de los factores traduccionales que se unen a GTP (Zhang *et al.*, 2018). Algunos de éstos presentan una alta afinidad por (p)ppGpp, pudiendo inhibir al factor traduccional debido a que éste es un análogo no hidrolizable de GTP (Mitkevich *et al.*, 2010). De esta manera la acumulación de (p)ppGpp podría afectar la etapa de inicio (dependiente de IF2), elongación (dependiente de EF-Tu y EF-G), terminación de la traducción (dependiente de RF3) y reciclaje de las subunidades ribosomales (dependiente de EF-G). Además, se ha observado que (p)ppGpp es capaz de unirse a la GTPasa ObgE incrementando su afinidad por la subunidad 50S, evitando la asociación de las subunidades mayor y menor (Feng *et al.*, 2014). Sumado a estos antecedentes, algunos de nuestros experimentos muestran un mayor nivel de traducción en mensajeros canónicos bajo estrés

oxidativo en una mutante carente del gen *relA*, el cual codifica una de las enzimas encargadas de la síntesis de (p)ppGpp (Figura 29A). Todo esto sugiere que la disminución observada en la eficiencia de la traducción canónica bajo estrés oxidativo es, al menos en parte, consecuencia de la regulación ejercida por (p)ppGpp.

Como se mencionó, al analizar los cambios en la eficiencia traduccional se distinguen dos grupos de codones en que la disminución de la eficiencia traduccional no es proporcional para codones sinónimos. Dentro de estos grupos, los codones que más se destacaron fueron TCC (serina), GGA (glicina), CTC (leucina), CCT y CCC (prolina), debido a que conservaron o incrementaron su eficiencia traduccional (Figura 10A). Estas diferencias difícilmente pueden ser explicadas por las variaciones en los niveles de (p)ppGpp, y los principales candidatos que surgen para entender este fenómeno son los tRNA implicados en su decodificación. En el caso de los tRNA^{Gly} determinamos que 1) el nivel de los isoaceptores de glicina se conserva luego de la inducción de estrés oxidativo, 2) ocurre una disminución en los niveles de tRNA^{Gly} aminoacilado *in vivo* que no es proporcional entre los distintos isoaceptores, y que 3) una población de tRNA^{Gly} pierde su capacidad de ser aminoacilada (Figuras 2 y 3). Es probable que todos estos cambios terminen por afectar el proceso traduccional de los codones de glicina. En efecto, al reducir los niveles del tRNA^{Gly} más abundante (tRNA^{Gly}_{GCC}) observamos que la proporcionalidad entre la eficiencia traduccional de los codones sinónimos de glicina cambia, bajando la eficiencia de traducción de los codones que son traducidos por el tRNA^{Gly}_{GCC} (Figura 16).

5.3. Rol del aminoácido glicina en el contexto del estrés oxidativo

A partir del análisis de la genoteca de variantes de GFP detectamos que los codones que codifican los aminoácidos de serina, glicina, leucina y prolina muestran cambios distintos a los observados para el resto de codones. Particularmente nos llamó la atención el efecto del estrés oxidativo sobre los codones de glicina, pues teníamos antecedentes que el estrés oxidativo causa la inactivación de tRNA^{Gly} (Figura 2). Esto nos llevó a estudiar en detalle el efecto del estrés oxidativo sobre la traducción de sus codones. Primero observamos que en condición control, la eficiencia traduccional de los codones de glicina se correlaciona con los valores de frecuencia de uso en el genoma de *E. coli*. Cuando estudiamos el efecto del estrés oxidativo (inducido con 250 μ M de paraquat) sobre la eficiencia traduccional de los reporteros, observamos que ésta disminuye para todas las construcciones. Sin embargo, la eficiencia de traducción del reportero con sucesiones del codón GGA disminuye menos que el resto de los codones, observándose una eficiencia traduccional similar para todos los codones. Esto podría deberse a que el estrés oxidativo está causando un “cuello de botella” (o etapa limitante), el cual limita la velocidad máxima a la que puede proceder la de traducción de los reporteros, haciendo que sea independiente de los codones insertados en *gfp*. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo fue inducido con una mayor concentración de paraquat (700 μ M) la disminución en la eficiencia traduccional de los codones GGT, GGC y GGG fue mayor, posicionando al codón GGA como el más eficiente bajo estrés oxidativo (Figura 13).

Esto sugiere que bajo un estrés oxidativo muy intenso la velocidad de traducción de algunos codones disminuye lo suficiente como para acercarse a la velocidad de inicio, alterando la eficiencia de producción de GFP. Llama la atención observar que cuando el medio de cultivo que contiene 700 μM de paraquat se suplementa con glicina, el codon GGA se comporta de manera similar al resto de los codones. Al analizar los niveles de tRNA^{Gly} aminoacilado *in vivo* luego de la inducción de estrés oxidativo, documentamos una disminución en los tres tRNA isoaceptores de glicina (Figura 3B). De modo que un incremento en los niveles de glicina en el medio de cultivo parece compensar la disminución en los niveles de tRNA^{Gly} al aumentar la aminoacilación de la fracción que sigue activa.

Análisis realizados en nuestro laboratorio indican que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa utilizada en estos experimento es cercana a 37,5 μM de paraquat en medio M9r con agitación. Resulta importante este número ya que la mayoría de nuestros experimentos fueron realizados en una condición de estrés oxidativo inducido con una concentración de paraquat que la sobrepasa casi 7 veces (250 μM). Mayor relevancia toma cuando los principales efectos en la regulación de la traducción de los codones de glicina fueron observados cuando la concentración de paraquat fue 19 veces mayor a la CMI (700 μM). Para determinar si los cambios reportados realmente corresponden a un mecanismo de regulación de la traducción y no son consecuencia de procesos erráticos en células cuya muerte es inminente, debiésemos evaluar la letalidad del paraquat en nuestras condiciones experimentales. Algunos reportes indican que la concentración mínima bactericida (CMB) para algunas bacterias como *E. coli* varía entre 10 a 100 veces sobre la CMI (Peterson *et al.*, 1981). Algunos experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron que utilizando concentraciones superiores a 700 μM de paraquat en medio mínimo M9r, aún es observable el crecimiento de *E. coli*, en períodos de cultivo mucho más extensos. Es importante tener estos valores en consideración, ya que bajo fuertes condiciones de estrés el proceso traduccional y su fidelidad podría verse alterado.

Algo que nos llamó la atención fue que cuando realizamos cultivos de una mutante *E. coli* $\Delta\text{glyVX}::\text{FRT}$ (que presenta menores niveles del tRNA^{Gly_{GCC}}) suplementados con glicina, observamos una disminución en la tasa de crecimiento. Esto nos sugiere que de alguna forma la relación entre los niveles intracelulares de glicina y los niveles de tRNA^{Gly} pueden estar afectando procesos celulares esenciales para la replicación celular. Por ejemplo, se ha observado que la suplementación de glicina en el medio de cultivo puede inhibir la biosíntesis de purinas en una cepa silvestre (Cheng *et al.*, 2019), lo que podría explicar la disminución en la tasa de crecimiento de la mutante *E. coli* $\Delta\text{glyVX}::\text{FRT}$ en medio M9r+Gly (Figura 16). Es posible que los altos niveles de tRNA^{Gly_{GCC}} ayuden a tamponar las variaciones en la concentración intracelular de glicina en la cepa silvestre, y al reducir sus niveles con la mutación de los genes *glyV* y *glyX* incrementamos el impacto de los efectos colaterales. De modo que la principal conclusión que se desprende de esto es que para comprender algunas de nuestras observaciones debemos entender el papel de la glicina más allá del proceso traduccional.

Glicina representa alrededor de un 9% de los aminoácidos que constituyen las proteínas más abundantes de *E. coli* (Thanaraj *et al.*, 1996). Sin embargo, este aminoácido es utilizado en otros procesos celulares, algunos de los cuales son necesarios para enfrentar las condiciones de estrés oxidativo. Por ejemplo, glicina junto a glutamato y cisteína son requeridos para la síntesis de glutatión, un tripéptido que participa en la degradación de ROS y restauración del daño ocasionado durante una condición de estrés oxidativo (Cabiscol *et al.*, 2000). Glicina también puede ser sustrato para la síntesis de serina por parte de la serina hidroximetil transferasa, y de esta manera promover la síntesis de ATP a partir del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) tras la conversión de serina en piruvato (Cheng *et al.*, 2019). Además, se ha observado que este ciclo no transcurre de igual manera bajo estrés oxidativo debido a que tres de sus enzimas (aconitasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa) poseen centros de Fe-S susceptibles de ser oxidados. Esto tiene como consecuencia una disminución en la actividad de estas enzimas, favoreciendo la utilización de la vía del glioxilato (Rui *et al.*, 2010). En *Pseudomonas aeruginosa*, una γ -proteobacteria como *E. coli*, se ha observado que el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ promueve la activación de la vía del glioxilato, producto de la activación transcripcional de las enzimas isocitrato liasa (*aceA*) y malato sintasa (*glcB*). Se ha observado que la sustracción de esta vía, a través de la mutación de los genes *aceA* y *glcB*, desencadena una desregulación en la homeostasis del hierro libre, aumentando la sensibilidad de *P. aeruginosa* al estrés oxidativo (Ha *et al.*, 2018). Esto nos sugiere que la ruta del glioxilato puede tener un papel similar en *E. coli*.

Por otra parte, la utilización de glicina como precursor para el ciclo de los TCA facilitaría el uso de fuentes de carbono como glucosa-6-fosfato para la recuperación del poder reductor (NADPH). Esto sería inducido por un incremento en la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la ruta de las pentosas, bajo estrés oxidativo inducido con paraquat (Rui *et al.*, 2010).

Todos estos cambios metabólicos inducidos por el estrés oxidativo pueden ser responsables de una caída rápida de la concentración intracelular de glicina. Esta disminución ya ha sido documentada en microorganismos evolutivamente cercanos a *E. coli*, como *Pseudomonas fluorescens* en respuesta a estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (Alhasawi *et al.*, 2014). Frente a este fenómeno, algunos autores han explorado la posibilidad de cambios en la tasa traduccional producto de la limitación de ciertos aminoácidos. Elf *et al.* (2003) analizó de manera teórica el impacto que tendría un escenario en que la concentración de aminoácidos es limitante, sobre el nivel de aminoacilación de tRNA isoaceptores. A partir de cultivos de *E. coli* realizados en distintos medios se determinaron los niveles de cada tRNA y la concentración de aminoácidos para estimar el grado de aminoacilación de cada tRNA de acuerdo a su frecuencia de uso (Elf *et al.*, 2003). Estas predicciones mostraron que ante la baja de un aminoácido, disminuiría drásticamente el nivel de aminoacilación de algunos tRNA que decodifican codones con una alta frecuencia de uso. Esta propuesta coincide con algunos de los cambios que observamos con la genoteca de variantes de GFP. Por ejemplo, Elf *et al.* (2003) plantea que tRNA^{Gly}_{CCG} reduciría

drásticamente su nivel de aminoacilación al disminuir la concentración de glicina, y nosotros observamos que hay una mayor disminución en la eficiencia traduccional de los codones decodificados por tRNA^{Gly}_{CCG}. Esta disminución en la eficiencia traduccional de GGT y GGC posiciona a GGA como el más eficiente bajo estrés oxidativo, dentro del grupo de codones sinónimos de glicina. Además, ante un incremento en la concentración de glicina, *Elf et al.* (2003) plantea que se restaurarían los niveles de aminoacilación de tRNA^{Gly}_{CCG}, situación en que nosotros observamos que desaparece el incremento relativo en la eficiencia traduccional de GGA. En resumen, algunos de los efectos traduccionales pueden depender parcial o completamente de los cambios metabólicos ocurridos bajo estrés oxidativo.

5.4. Mecanismos alternativos de la iniciación de la traducción durante estrés oxidativo

Previamente nos referimos a las posibles causas de la disminución generalizada observada en el análisis de la eficiencia traduccional de la genoteca de variantes de GFP bajo estrés oxidativo. Sin embargo, un punto que no fue abordado es el papel de la iniciación de la traducción, una etapa que ha sido postulada por muchos autores como aquella que define la velocidad de la traducción de un transcrito por ser la más lenta (*Kennerl et al.*, 1977; *Hersh et al.*, 2014). Hoy en día se conocen tres mecanismos de iniciación de la traducción bacteriana: iniciación canónica, iniciación por resbalamiento de ribosomas, e iniciación de mRNA carentes de líder (lmRNA) (*Schmeing et al.*, et al., 2009; *Yamamoto et al.*, 2016; *Ptashne et al.*, 1976). Por muchos años ha regido como paradigma que el inicio canónico de la traducción prepondera sobre otros mecanismos de inicio en bacterias. Los reportes de mecanismos alternativos de iniciación correspondían a casos particulares, poco relevantes para la fisiología bacteriana. Sin embargo, cada vez son más los autores que han desestimado las secuencias de consenso en las regiones de unión a ribosomas (*Ludwig et al.*, 2018). También se ha descrito la traducción de policistrones a través del resbalamiento de ribosomas sobre el transcrito una vez éstos llegan al codón de detención (*Yamamoto et al.*, 2016). Se han descrito nuevos lmRNA que se generan a partir de genes reguladores de procesos biológicamente relevantes, como *virF* en la virulencia de *Shigella* spp. (*Di Martino et al.*, 2016).

Uno de los casos más estudiados en el campo de los lmRNA son los transcritos del gen *cI*, el cual codifica uno de los principales reguladores de la lisis/lisogenia del fago Lambda. Gran parte de estos estudios se centraron en el mecanismo de regulación de los promotores P_{RE} y P_{RM}, encargados de la transcripción de un mRNA canónico y un lmRNA para el gen *cI*, respectivamente (*Resch et al.*, 1995). Es probable que la poca atención que han recibido los lmRNA se deba en parte a los bajos niveles de traducción que se pueden observar en condición control (Figura 22), condición en que se han realizado la mayoría de los estudios al respecto. Uno de los principales hitos de este trabajo fue el análisis de la eficiencia traduccional de los lmRNA en un contexto diferente. Considerando que tanto la activación del ciclo lítico del fago Lambda (dependiente de *cI*) así como la virulencia de *Shigella* spp. (dependiente de *VirF*) se ven promovidas por cambios del medio extracelular

(radiación UV, osmolaridad, temperatura, pH, oxígeno, etc), quisimos analizar la eficiencia traduccional de los lmRNA en un contexto de estrés (Fry, 1959; Nakayama et al., 1995; Dorman et al., 1998). Esto nos llevó a determinar que bajo estrés oxidativo la traducción de lmRNA se ve favorecida en comparación a la de mRNA canónicos, producto de un aumento en la traducción de lmRNA a la par de una inhibición en la traducción de mRNA canónicos (Figura 22). Esto se debe en parte a la acumulación de (p)ppGpp producto del estrés, la que inhibe la traducción canónica sin afectar mayormente la traducción de lmRNA (Figura 29A). Algunos autores postulan que la eficiencia traduccional se ve determinada por la estructura que puede adoptar el extremo 5' del transcrito (de Smit et al., 1990). Esto no aplicaría para los vectores utilizados para la síntesis de transcritos sin líder, dado que éstos generan transcritos cuya secuencia y estructura del extremo 5' es totalmente distinto entre sí: secuencia codificante de los genes *gfp* (Figura 22), *cl* (Figura 23) y *katG* (Figura 25). Esto ayuda a sustentar la idea que la traducción de lmRNA se ve favorecida bajo estrés oxidativo. Algunos análisis preliminares realizados en el laboratorio nos sugieren que esto no se restringe a una respuesta frente a estrés oxidativo, y que el estrés salino también es capaz de inducir este incremento en la eficiencia traduccional de lmRNA.

Un aspecto que resulta muy importante en la regulación de la traducción bajo estrés oxidativo es la relación existente entre las velocidades de iniciación y elongación. Cuando observamos la eficiencia traduccional de los codones CTC y CTG en un transcrito con líder, vemos que CTC posee una eficiencia traduccional mucho menor que CTG en condición control. Sin embargo, observamos que dicha diferencia entre codones se minimiza bajo estrés oxidativo. Esto es lo esperado para un escenario en que la velocidad de iniciación se reduce tanto, que define la velocidad del proceso completo de traducción (Figura 31). Esto nos indica que el estrés oxidativo reduce drásticamente la velocidad de inicio de mRNA canónicos, convirtiendo a la iniciación en la etapa limitante de la traducción (Figura 31). Una consecuencia que se desprende de esta conclusión es que el uso de codones pierde su capacidad de afectar la cantidad total de proteína producida a partir de mRNA canónicos bajo estrés oxidativo, y que cambios a nivel del inicio de la traducción pueden tener un mayor efecto.

El mecanismo que explica el aumento en la eficiencia de traducción de lmRNA es hoy una interrogante mayor que cuando se inició esta tesis. Por ejemplo, determinamos que este incremento en la eficiencia traduccional no es catalizado por la endoribonucleasa MazF, la cual había sido reconocida como pieza fundamental en la formación de una subpoblación de ribosomas especializados en la traducción de los lmRNA (ribosomas de estrés 70S^{Δ43}) (Vesper et al., 2011). Además, luego de la utilización de distintos enfoques experimentales determinamos que la formación de ribosomas de estrés 70S^{Δ43} (producto de la digestión del rRNA 16S) es indetectable bajo estrés oxidativo en *E. coli* K12 MG1655 (sección 4.5.3). Luidalepp et al. (2016) y Culvier et al. (2018) han reportado que en otras condiciones tampoco se formarían ribosomas 70S^{Δ43}. Sin embargo, al analizar perfiles de polisomas obtenidos de una condición de estrés oxidativo observamos la aparición de un pico con menor coeficiente de sedimentación al de un ribosoma completo (70S) (Figura 28). Un

hecho que llama poderosamente la atención es que otros autores han observado un pico de similares características (61S) en perfiles de polisomas obtenidos de células tratadas con kasugamisina, donde se activa la traducción de lmrRNA. Esta disminución en el coeficiente de sedimentación se debería a la falta de una serie de proteínas ribosomales, producto del tratamiento con kasugamicina (Delvillani *et al.*, 2011; Kaberdina *et al.*, 2009). Además, la magnitud del pico de 61S incrementa al sobreproducir el lmrRNA de *cl* (Delvillani *et al.*, 2011). Los experimentos realizados en esta tesis no nos permiten determinar si el pico que encontramos corresponde a un caso similar al de la partícula S61 donde los cambios corresponden a una pérdida de proteínas ribosomales o bien corresponden a un problema en la biogénesis ribosomal no relacionado a la partícula S61. Independiente de esto, la formación de una partícula semejante a la partícula S61 abre un camino para explorar en la búsqueda de los mecanismos que permiten activar la traducción de lmrRNA.

5.5. Regulación de la traducción bajo estrés oxidativo

Basado en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y en los antecedentes bibliográficos, proponemos el siguiente modelo de cambios inducidos por el estrés oxidativo en la maquinaria traduccional y sus consecuencias en el proceso de síntesis de proteínas (Figura 34).

El estrés oxidativo induce alteraciones en la estructura de los ribosomas, causando la aparición de picos entre la subunidad mayor (50S) y ribosomas maduros (70S). Estas partículas podrían tener variaciones en la estequiometría de proteínas ribosomales que pueden deberse a problemas en la biogénesis y/o a la pérdida de éstas. Como consecuencia del estrés oxidativo se induce la síntesis de la alarmona (p)ppGpp, la cual es capaz de competir por IF2 y desplazar su unión a GTP, además de formar el complejo de anti-asociación de subunidades ribosomales ObgE-(p)ppGpp. Esto tiene como consecuencia una inhibición en el mecanismo canónico de inicio de la traducción, que sumado a la activación en la traducción de lmrRNA hace que este mecanismo alternativo de inicio de la traducción tome gran importancia bajo estrés oxidativo. Paralelamente, la acumulación de (p)ppGpp activa el sistema toxina-antitoxina MazEF, el cual promovería la formación de nuevos mRNA carentes de líder (lmrRNA) a partir de mRNA canónicos. No podemos decir si es más frecuente la producción de lmrRNA por digestión de mRNA canónicos o por el uso de promotores alternativos.

Dado que (p)ppGpp también es capaz de unirse a los factores EF-Tu, EF-G y RF3, es posible que la elongación y terminación también estén siendo inhibidas por esta alarmona. La oxidación de algunas de las proteínas que participan en el proceso también podría apoyar su inhibición. Todo esto tendría como consecuencia una disminución global en la tasa traduccional. Aunque bajo estrés oxidativo la traducción canónica pasa a ser dominada casi exclusivamente por la velocidad de inicio del proceso, algunos codones (TCC, GGA, CTC, CCT y CCC) conservan o incrementan su eficiencia traduccional respecto al resto. Todos estos cambios terminarían promoviendo la traducción de los genes inducidos en respuesta al estrés oxidativo por sobre el resto de los genes

del genoma, debido a que poseen una adaptación a los cambios en la eficiencia de traducción codogénica ocurridos bajo estrés oxidativo. Finalmente, dado que el impacto del uso de codones observado en condición control tiene mucho menor impacto bajo estrés oxidativo, producto que la velocidad del inicio de la traducción canónica se convierte en la etapa limitante de la síntesis, es probable que estos genes además sean regulados a nivel de su inicio traduccional. Futuros trabajos deberán determinar cuáles de estos genes son traducidos a partir de mRNA carentes de líder, lo que nos permitirá establecer el real impacto de este mecanismo de inicio de la traducción sobre la adaptación de *E. coli* al estrés oxidativo.

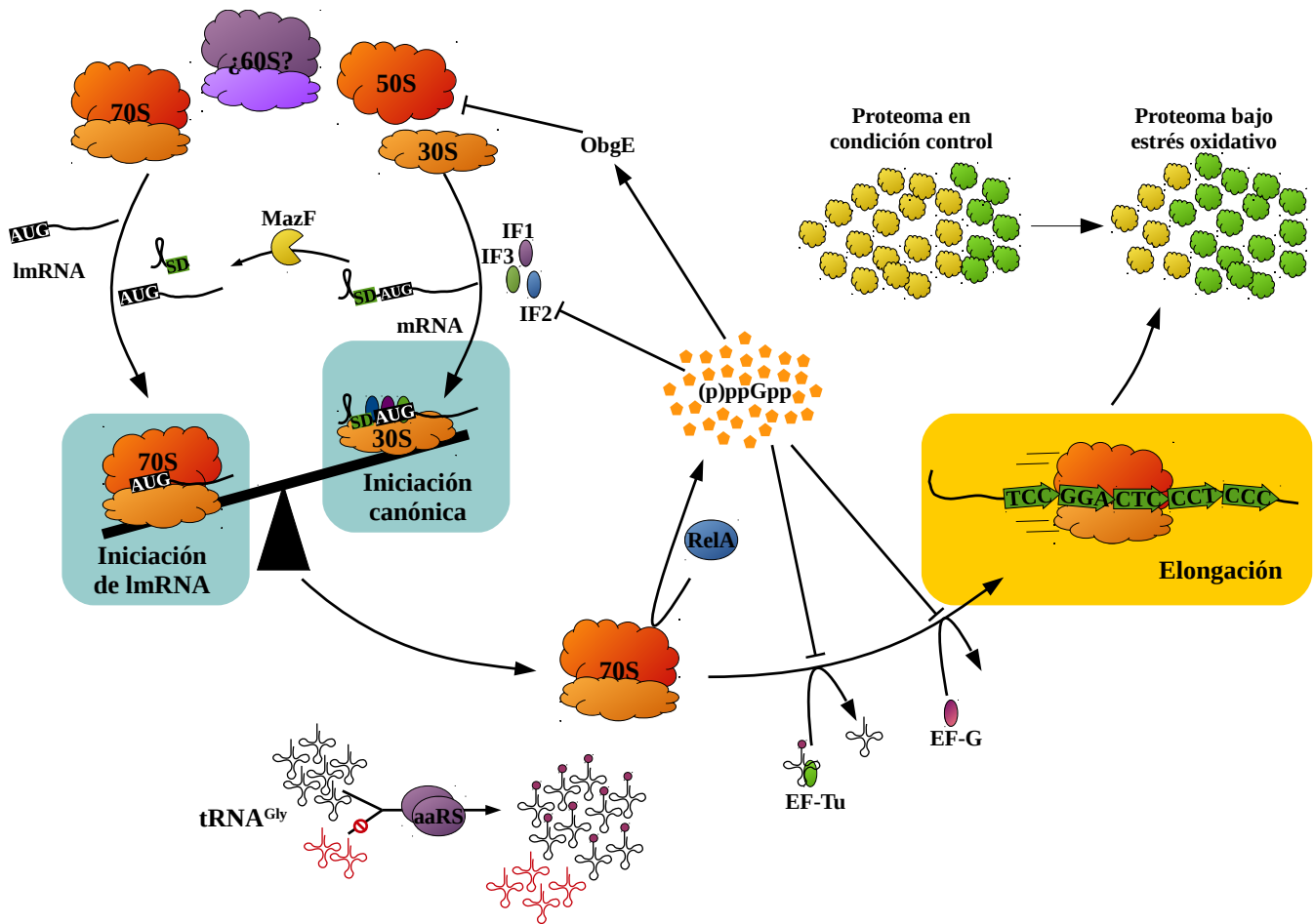


Figura 34. Modelo de alteraciones y/o regulación de la maquinaria traduccional bajo oxidativo. En la figura se muestran los hitos más relevantes en la regulación de la iniciación y elongación de la traducción bajo estrés oxidativo analizados en éste trabajo. A la izquierda se observa que lmRNA silvestres o provenientes del procesamiento de mRNA canónicos interactúan con complejos 70S para iniciar su traducción. A continuación se observa la formación del complejo de preiniciación requerido para la traducción de mRNA canónicos. En estas condiciones, este mecanismo de iniciación de la traducción resulta menos eficiente que el de lmRNA. En la parte central de la figura se observa que RelA cataliza la acumulación de (p)ppGpp, el cual puede unirse a los factores IF2, EF-Tu y EF-G, inhibiendo la iniciación canónica y la elongación. Además, (p)ppGpp puede unirse a ObgE e inhibir la asociación de las subunidades mayor y menor. En la parte inferior se observa que producto del estrés oxidativo se inactiva una población de tRNA^{Gly}, la cual es incapaz de ser aminoacilada. A la derecha se observa que en estas condiciones es mayor la eficiencia de la traducción de los codones TTC, GGA, CTC, CCT y CCC (flechas verdes). Esto tiene como consecuencia un cambio en el proteoma, sintetizando una mayor proporción de proteínas con tales codones (proteínas verdes).

6. CONCLUSIONES

1. Una disminución en los niveles de tRNA^{Gly}_{GCC} reduce la eficiencia traduccional de los codones decodificados por dicho tRNA.
2. A diferencia del resto de codones, la eficiencia traduccional relativa de los codones GGA (glicina), TCC (serina), CTC (leucina), CCT y CCC (prolina) se mantiene o incrementa bajo estrés oxidativo.
3. El incremento en la eficiencia traduccional de GGA bajo estrés oxidativo inducido con altas concentraciones de paraquat, es observable en genes silvestres de *E. coli*.
4. La eficiencia traduccional de lmrRNA es mayor que la de mRNA canónicos bajo estrés oxidativo. Esta diferencia es independiente de MazF.
5. La acumulación de (p)ppGpp inhibe el inicio de traducción canónico bajo estrés oxidativo.
6. El estrés oxidativo inducido con paraquat no induce la formación de ribosomas de estrés (70S^{Δ43}).
7. A partir de la predicción de un modelo teórico de eficiencia traduccional, observamos que los genes de los regulones SoxRS y OxyR tienen un uso codogénico adaptado para su traducción bajo estrés oxidativo.
8. La etapa limitante de la traducción bajo estrés oxidativo es la iniciación.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(12):6059-6063.

Alhasawi A, Castonguay Z, Appanna ND, Auger C, Appanna VD. (2014). Glycine metabolism and anti-oxidative defence mechanisms in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol Res.* 171:26-31.

Altuvia S, Zhang A, Argaman L, Tiwari A, Storz G. (1998). The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J.*, 17(20):6069-6075.

Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Meltabashi M, Sacher A, Engelberg-Kulka H. (2009). *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS Genet.*, 5(3):e1000390. doi: 10.1371/journal.pgen.1000390.

Arava Y, Wang Y, Storey JD, Liu CL, Brown PO, Herschlag D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):3889-3894.

Åslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(11):6161-6165.

Avazéri C, Turner RJ, Pommier J, Weiner JH, Giordano G, et al. (1997). Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology.* 143(Pt4):1181-1189.

Avçilar-Kucukgoze I, Bartholomäus A, Cordero Varela JA, Kaml RF, Neubauer P, et al. (2016). Discharging tRNAs: a tug of war between translation and detoxification in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 44(17):8324-8334.

Babu P, Chandel AK, Singh OV. (2015). Survival Mechanisms of Extremophiles. In: *Extremophiles and Their Applications in Medical Processes*. SpringerBriefs in Microbiology. Springer, Cham

Balakrishnan R, Oman K, Shoji S, Bundschuh R, Fredrick K. (2014). The conserved GTPase LepA contributes mainly to translation initiation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42(21):13370-13383.

Berks BC, Ferguson SJ, Moir JW, Richardson DJ. (1995). Enzymes and associated electron transport syst catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta.* 1232(3):97-173.

Bernhart SH, Hofacker IL, Will S, Gruber AR, Stadler PF. (2008) RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics.* 9:474. doi: 10.1186/1471-2105-9-474.

Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.

Blasco F, Dos Santos JP, Magalon A, Frixon C, Guigliarelli B, et al. (1998). NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 28(3):435-447.

Blondel CJ, Jiménez JC, Leiva LE, Alvarez SA, Pinto BI, et al. (2013). The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages. *Infect Immun.* 81(4):1207-1220.

Bochner BR, Ames BN. (1982). Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol Chem.* 257(16):9759-9769.

Bossi L, Figueroa-Bossi N. (2016). Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol.*, 14(12):775-784.

Brevet A, Chen J, Lévêque F, Plateau P, Blanquet S. (1989). In vivo synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap₄N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8275–8279.

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 3(1):3-8.

Calabretta A, Küpfer PA, Leumann CJ. (2015). The effect of RNA base lesions on mRNA translation. *Nucleic Acids Res.*, 43(9):4713-4720.

Chan CT, Pang YL, Deng W, Babu IR, Dyavaiah M, et al. (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun.*, 3:937. doi: 10.1038/ncomms1938.

Chan PP, Lowe TM. (2009). GtRNAdb: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D93-7. doi: 10.1093/nar/gkn787.

Chang DE, Smalley DJ, Conway T. (2002). Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol.* 45(2):289-306.

Cheng ZX, Guo C, Chen ZG, Yang TC, Zhang JY, et al. (2019). Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing. *Nat Commun.* 10(1):3325. doi: 10.1038/s41467-019-11129-5.

Chevance FF, Le Guyon S, Hughes KT. (2014). The effects of codon context on in vivo translation speed. *PLoS Genet.* 10(6):e1004392. doi: 10.1371/journal.pgen.1004392.

Cheverton AM, Gollan B, Przydacz M, Wong CT, Mylona A, Hare SA, Helaine S. (2016). A *Salmonella* Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. *Mol Cell.*, 63(1):86-96.

Chiancone, E. (2008). Dps proteins, an efficient detoxification and DNA protection machinery in the bacterial response to oxidative stress. *Rend. Fis. Acc. Lincei.*, 19: 261. doi: 10.1007/s12210-008-0018-4

Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G, Ryu SE. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, 105(1):103-113.

Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110-2114.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 17(10):1195-1214.

Cortes T, Schubert OT, Rose G, Arnvig KB, Comas I, et al. (2013). Genome-wide mapping of transcriptional start sites defines an extensive leaderless transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep.*, 5(4):1121-1131.

Culviner PH, Laub MT. (2018). Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. *Mol Cell.* 70(5):868-880.

Dahlberg AE, Dahlberg JE, Lund E, Tokimatsu H, Rabson AB, et al. (1978). Processing of the 5' end of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(8):3598-3602.

Dai X, Zhu M, Warren M, Balakrishnan R, Patsalo V, et al. (2016). Reduction of translating ribosomes enables *Escherichia coli* to maintain elongation rates during slow growth. *Nat Microbiol.* 2:16231. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.231.

Datsenko KA, Wanner BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12):6640-6645.

Delvillani F, Papiani G, Dehò G, Briani F. (2011). S1 ribosomal protein and the interplay between translation and mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 39(17):7702-7715.

De Smit MH, van Duin J. (1990). Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(19):7668-7672.

Di Martino ML, Romilly C, Wagner EG, Colonna B, Prosseda G. (2016). One Gene and Two Proteins: a Leaderless mRNA Supports the Translation of a Shorter Form of the *Shigella* VirF Regulator. *mBio.* 7(6). pii: e01860-16. doi: 10.1128/mBio.01860-16.

Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(25):9482-9487.

Ding H, Hidalgo E, Dimple B. (1996). The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem.*, 271(52):33173-33175.

Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina MV. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science*. 339(6115):85-88.

Dong H, Nilsson L, Kurland CG. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol.*, 260(5):649-663.

Dorman CJ, Porter ME. (1998). The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol.* 29(3):677-684.

dos Reis M, Wernisch L, Savva R. (2003). Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Res.* 31(23):6976-6985.

Duncan CDS, Mata J. (2017). Effects of cycloheximide on the interpretation of ribosome profiling experiments in *Schizosaccharomyces pombe*. *Sci Rep.* 7(1):10331. doi: 10.1038/s41598-017-10650-1.

Elf J, Nilsson D, Tenson T, Ehrenberg M. (2003). Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science*. 300(5626):1718-1722.

Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ, Ames BN. (1989). An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(13):5010-5014.

Farr SB, Kogoma T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.*, 55(4):561-585.

Feng B, Mandava CS, Guo Q, Wang J, Cao W, et al. (2014). Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol.* 12(5):e1001866. doi: 10.1371/journal.pbio.1001866.

Fernández-Vázquez J, Vargas-Pérez I, Sansó M, Buhne K, Carmona M, et al. (2013). Modification of tRNA(Lys) UUU by elongator is essential for efficient translation of stress mRNAs. *PLoS Genet.*, 9(7):e1003647. doi: 10.1371/journal.pgen.1003647.

- Fry BA. (1959). Conditions for the infection of *Escherichia coli* with lambda phage and for the establishment of lysogeny. *J Gen Microbiol.* 21:676-684.
- Gambino M, Cappitelli F. (2016). Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling.* 32(2):167-178.
- Gibbs MR, Moon KM, Chen M, Balakrishnan R, Foster LJ, Fredrick K. (2017). Conserved GTPase LepA (Elongation Factor 4) functions in biogenesis of the 30S subunit of the 70S ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(5):980-985.
- Goerlich O, Foeckler R, Holler E. (1982). Mechanism of synthesis of adenosine (5') tetraphospho (5')adenosine (AppppA) by aminoacyl-tRNA synthetases. *Eur J Biochem.* 126(1):135-142.
- Green J, Paget MS. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol.*, 2(12):954-966.
- Groot A, Roche D, Fernandez B, Ludanyi M, Cruveiller S, et al. (2014). RNA sequencing and proteogenomics reveal the importance of leaderless mRNAs in the radiation-tolerant bacterium *Deinococcus deserti*. *Genome Biol Evol.*, 6(4):932-948.
- Grosjean H, de Crécy-Lagard V, Marck C. (2010). Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett.* 584(2):252-264.
- Gualerzi CO, Pon CL. (2015). Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci.*, 72(22):4341-4367.
- Ha DG, Kuchma SL, O'Toole GA. (2014). Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol. Biol.* 1149, 59–65.
- Ha S, Shin B, Park W. (2018). Lack of glyoxylate shunt dysregulates iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 164(4):587-599.
- Hazan R, Sat B, Engelberg-Kulka H. (2004). *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol.*, 186(11):3663-3669.

Heiman M, Kulicke R, Fenster RJ, Greengard P, Heintz N. (2014). Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat Protoc.* 9(6):1282-1291.

Hersch SJ, Elgamal S, Katz A, Ibba M, Navarre WW. (2014). Translation initiation rate determines the impact of ribosome stalling on bacterial protein synthesis. *J Biol Chem.*, 289(41):28160-28171.

Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 77(1):61-68.

Howden AJ, Geoghegan V, Katsch K, Efstathiou G, Bhushan B, et al. (2013). QuaNCAT: quantitating proteome dynamics in primary cells. *Nat Methods.* 10(4):343-346.

Hu XP, Yang Y, Ma BG. (2015). Amino Acid Flux from Metabolic Network Benefits Protein Translation: the Role of Resource Availability. *Sci Rep.* 5:11113. doi: 10.1038/srep11113.

Ibba M, Losey HC, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, Bunjun S, Söll D. (1999). Substrate recognition by class I lysyl-tRNA synthetases: a molecular basis for gene displacement. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 418–423.

Imlay JA, Linn S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol.*, 169(7):2967-2976.

Imlay JA. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ Microbiol.* 21(2):521-530.

Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* 324(5924):218-223.

Ish-Horowicz D, Burke JF. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.

Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell.*, 43(4):613-623.

Jo I, Chung IY, Bae HW, Kim JS, Song S, Cho YH, Ha NC. (2015). Structural details of the OxyR peroxide-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(20):6443-6448.

Jovanovic SV, Simic MG. (1986). One-electron redox potentials of purines and pyrimidines. *J. Phys. Chem.*, 90(5), 974–978.

Kaberdina AC, Szafarski W, Nierhaus KH, Moll I. (2009). An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? *Mol Cell.* 33(2):227-236.

Kataria R, Ruhai R. (2014). *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Chapter 21: Microbiological Metabolism Under Chemical Stress. New York: Elsevier, 499-511.

Katz A, Elgamal S, Rajkovic A, Ibba M. (2016). Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell biology. *Mol Microbiol.*, 101(4):545-558.

Katz A., Orellana O. (2012). "Protein synthesis and the stress response." *Cell-free protein synthesis*. InTech, Croatia, 111-134.

Kennell D, Riezman H. (1977). Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli lac* operon. *J Mol Biol.*, 114(1):1-21.

Kimura S, Waldor MK. (2019). The RNA degradosome promotes tRNA quality control through clearance of hypomodified tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116(4):1394-1403.

Kojima K, Oshita M, Nanjo Y, Kasai K, Tozawa Y, et al. (2007). Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol Microbiol.*, 65(4):936-947.

Korshunov S, Imlay JA. (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 75(6):1389-1401.

Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB. (2009). Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science.* 324(5924):255-258.

Kuo CF, Mashino T, Fridovich I. (1987). alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. J Biol Chem., 262(10):4724-4727.

Kuroda A, Murphy H, Cashel M, Kornberg A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 272(34):21240-21243.

Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, et al. (2001). Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. Science. 293(5530):705-708.

Lee PC, Bochner BR, Ames BN. (1983). AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(24):7496-7500.

Liu M, Gong X, Alluri RK, Wu J, Sablo T, Li Z. (2012). Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*. Biol Chem., 393(3):123-132.

Lu J, Deutsch C. (2008). Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. J Mol Biol. 384(1):73-86.

Ludwig P, Huber M, Lehr M, Wegener M, Zerulla K, et al. (2018). Non-canonical *Escherichia coli* transcripts lacking a Shine-Dalgarno motif have very different translational efficiencies and do not form a coherent group. Microbiology. 164(4):646-658.

Luidalepp H, Berger S, Joss O, Tenson T, Polacek N. (2016). Ribosome Shut-Down by 16S rRNA Fragmentation in Stationary-Phase *Escherichia coli*. J Mol Biol. 428(10 Pt B):2237-2247.

Lushchak VI. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact., 224:164-175.

MacQueen JB. (1967): "Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability", Berkeley, University of California Press, 1:281-297

Masuda H, Inouye M. (2017). Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. *Toxins (Basel)*. 9(4). pii: E140. doi: 10.3390/toxins9040140.

Mattei E, Ausiello G, Ferrè F, Helmer-Citterich M. (2014). A novel approach to represent and compare RNA secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 42(10):6146-6157.

Mattei E, Pietrosanto M, Ferrè F, Helmer-Citterich M. (2015). Web-Beagle: a web server for the alignment of RNA secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 43(W1):W493-7. doi: 10.1093/nar/gkv489.

Messner KR, Imlay JA. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 274(15):10119-10128.

Min Jou W, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W. (1972). Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature.* 237(5350):82-88.

Mitkevich VA, Ermakov A, Kulikova AA, Tankov S, Shyp V, et al. (2010). Thermodynamic characterization of ppGpp binding to EF-G or IF2 and of initiator tRNA binding to free IF2 in the presence of GDP, GTP, or ppGpp. *J Mol Biol.* 402(5):838-846.

Mohammad F, Green R, Buskirk AR. (2019). A systematically-revised ribosome profiling method for bacteria reveals pauses at single-codon resolution. *Elife.* 8. pii: e42591. doi: 10.7554/eLife.42591.

Moll I, Hirokawa G, Kiel MC, Kaji A, Bläsi U. (2004). Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 32(11):3354-3363.

Nakayama S, Watanabe H. (1995). Involvement of cpxA, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei virF* gene. *J Bacteriol.* 177(17):5062-5069.

Näsvalld SJ, Chen P, Björk GR. (2007). The wobble hypothesis revisited: uridine-5-oxyacetic acid is critical for reading of G-ending codons. *RNA.* 13(12):2151-2164.

Nawrot B, Sochacka E, Döchler M. (2011). tRNA structural and functional changes induced by oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.*, 68(24):4023-4032.

Neidhardt FC, Umbarger HE. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology; Chemical Composition of *Escherichia coli* (chapter 3). 2nd edition. Vol 1. American Society of Microbiology (ASM).

Nikolic N, Didara Z, Moll I. (2017). MazF activation promotes translational heterogeneity of the *grcA* mRNA in *Escherichia coli* populations. *PeerJ*. 5:e3830. doi: 10.7717/peerj.3830. eCollection 2017.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H, Murata N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*. 43(35):11321-11330.

Nunomura A, Lee HG, Zhu X, Perry G. (2017). Consequences of RNA oxidation on protein synthesis rate and fidelity: implications for the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Biochem Soc Trans*. 45(5):1053-1066.

Park, J. (1990). Oxidative damage to bacterial DNA and evidence for its repair. *J. Arch. Pharm. Res.*, 13: 252–256.

Pavlov MY, Watts RE, Tan Z, Cornish VW, Ehrenberg M, Forster AC. (2009). Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(1):50-54.

Pedersen S. (1984). *Escherichia coli* ribosomes translate in vivo with variable rate. *EMBO J*. 3(12): 2895–2898.

Peterson E, Fairshter R, Morrison J, Cesario T. (1981) Effects of the herbicide paraquat dichloride on bacteria of human origin. *Appl Environ Microbiol*. 41(1):327-328.

Phizicky EM, Hopper AK. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.*, 24(17):1832-1860.

Pomposiello PJ, Bennik MH, Demple B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol.*, 183(13):3890-3902.

Prabhakar A, Choi J, Wang J, Petrov A, Puglisi JD. (2017). Dynamic basis of fidelity and speed in translation: Coordinated multistep mechanisms of elongation and termination. *Protein Sci.* 26(7):1352-1362.

Ptashne M, Backman K, Humayun MZ, Jeffrey A, Maurer R, et al. (1976). Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda. *Science*, 194(4261):156-161.

Qin D, Fredrick K. (2013). Analysis of polysomes from bacteria. *Methods Enzymol.* 2013;530:159-172.

Rao YS, Cherayil JD. (1974). Studies on chemical modification of thionucleosides in the transfer ribonucleic acid of *Escherichia coli*. *Biochem J.*, 143(2):285-294.

Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids.*, 2010:592980. doi: 10.4061/2010/592980.

Resch A, Tedin K, Graschopf A, Haggård-Ljungquist E, Bläsi U. (1995). Ternary complex formation on leaderless phage mRNA. *FEMS Microbiol Rev.* 17(1-2):151-157.

Rodnina MV. (2016). The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Sci.* 25(8):1390-1406.

Rojas AM, Ehrenberg M, Andersson SG, Kurland CG. (1984). ppGpp inhibition of elongation factors Tu, G and Ts during polypeptide synthesis. *Mol Gen Genet.*, 197(1):36-45.

Rojas J, Castillo G, Leiva LE, Elgamal S, Orellana O, Ibba M, Katz A (2018) Codon usage revisited: Lack of correlation between codon usage and the number of tRNA genes in enterobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 502, 450–455.

Ron EZ. (2013). Bacterial Stress Response. In: *Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F.* (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_79.

Rothschild LJ, Mancinelli RL. (2001). Life in extreme environments. *Nature.* 409(6823):1092-1101.

Rui B, Shen T, Zhou H, Liu J, Chen J, et al. (2010). A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC Syst Biol.* 4:122. doi: 10.1186/1752-0509-4-122.

Ryals J, Little R, Bremer H. (1982). Control of rRNA and tRNA syntheses in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *J Bacteriol.* 151(3):1261-1268.

Salazar JC, Ambrogelly A, Crain PF, McCloskey JA, Söll D. (2004). A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(20):7536-7541.

Santos DA, Shi L, Tu BP, Weissman JS. (2019). Cycloheximide can distort measurements of mRNA levels and translation efficiency. *Nucleic Acids Res.* 47(10):4974-4985.

Sauer:P1vir phage transduction. (2011, March 2). *OpenWetWare*, . Retrieved 20:35, February 6, 2020 from https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Sauer:P1vir_phage_transduction&oldid=496559.

Sauert M, Wolfinger MT, Vesper O, Müller C, Byrgazov K, Moll I. (2016). The MazF-regulon: a toolbox for the post-transcriptional stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 44(14):6660-6675.

Schmeing TM, Ramakrishnan V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature.* 461(7268):1234-1242.

Schwanhäusser B, Busse D, Li N, et al. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 473(7347):337-342.

Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455(7209):58-63.

Seo SW, Kim D, Szubin R, Palsson BO. (2015). Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Rep.*, 12(8):1289-1299.

Seth D, Hausladen A, Wang YJ, Stamler JS. (2012). Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science.* 336(6080):470-473.

Shao ZQ, Zhang YM, Feng XY, Wang B, Chen JQ. (2012). Synonymous codon ordering: a subtle but prevalent strategy of bacteria to improve translational efficiency. PLoS One. 7(3):e33547. doi: 10.1371/journal.pone.0033547.

Sharma P, Nilges BS, Wu J, Leidel SA. (2019). The translation inhibitor cycloheximide affects ribosome profiling data in a species-specific manner. BioRxiv. doi:10.1101/746255.

Sharma S, Kaushik S, Sinha M, Kushwaha GS, Singh A, et al. (2014). Structural and functional insights into peptidyl-tRNA hydrolase. Biochim Biophys Acta., 1844(7):1279-1288.

Sharp PM, Li WH. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic Acids Res. 15(3):1281-1295.

Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, et al. (2006). Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. J Biol Chem., 281(39):29011-29021.

Simms CL, Hudson BH, Mosior JW, Rangwala AS, Zaher HS. (2014). An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. Cell Rep., 9(4):1256-1264.

Sørensen MA, Fehler AO, Lo Svenningsen S. (2018). Transfer RNA instability as a stress response in *Escherichia coli*: Rapid dynamics of the tRNA pool as a function of demand. RNA Biol. 15(4-5):586-593.

Stadtman ER. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem., 62:797-821.

Stadtman ER. (2006). Protein oxidation and aging. Free Radic Res., 40(12):1250-1258.

Starzyk R. (1984). tRNA base modifications and gene regulation. Trends in Biochemical Sciences, 9(8): 333-334.

Steiner RE, Kyle AM, Ibba M. (2019). Oxidation of phenylalanyl-tRNA synthetase positively regulates translational quality control. Proc Natl Acad Sci U S A. 116(20): 10058–10063.

Subramaniam AR, Deloughery A, Bradshaw N, Chen Y, O'Shea E, et al. (2013b). A serine sensor for multicellularity in a bacterium. *Elife*. 2:e01501. doi: 10.7554/eLife.01501.

Subramaniam AR, Pan T, Cluzel P. (2013a). Environmental perturbations lift the degeneracy of the genetic code to regulate protein levels in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(6):2419-2424.

Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. (2010). Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal.*, 12(3):323-325.

Tanaka M, Chock PB, Stadtman ER. (2007). Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(1):66-71.

Tartaglia LA, Storz G, Ames BN. (1989). Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J Mol Biol.* 210(4):709-719.

Tats A, Tenson T, Remm M. (2008). Preferred and avoided codon pairs in three domains of life. *BMC Genomics.* 9:463. doi:10.1186/1471-2164-9-463

Temmel H, Müller C, Sauert M, Vesper O, Reiss A, Popow J, Martinez J, Moll I. (2017). The RNA ligase RtcB reverses MazF-induced ribosome heterogeneity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 45(8):4708-4721.

Thanaraj TA, Argos P. (1996). Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein Sci.* 5(8):1594-1612.

Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA*, 14(10):2095-2103.

Tollerson R, Witzky A, Ibba M. (2018). Elongation factor P is required to maintain proteome homeostasis at high growth rate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(43):11072-11077.

Torrent M, Chalancon G, de Groot NS, Wuster A, Madan Babu M. (2018). Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. *Sci Signal.* 11(546). pii: eaat6409. doi: 10.1126/scisignal.aat6409.

Udagawa T, Shimizu Y, Ueda T. (2004). Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria. *J Biol Chem.*, 279(10):8539-8546.

Velázquez L, Camarena L, Reyes JL, Bastarrachea F. (1991). Mutations affecting the Shine-Dalgarno sequences of the untranslated region of the *Escherichia coli* gltBDF operon. *J Bacteriol.* 173(10):3261-3264.

Vesper O, Amitai S, Belitsky M, Byrgazov K, Kaberdina AC, et al. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell*, 147(1):147-157.

Vila-Sanjurjo A, Schuwirth BS, Hau CW, Cate JH. (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nat Struct Mol Biol.*, 11(11):1054-1059.

Watanabe S, Kita A, Kobayashi K, Miki K. (2008). Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(11):4121-4126.

Willi J, Küpfer P, Evéquo D, Fernandez G, Katz A, et al. (2018). Oxidative stress damages rRNA inside the ribosome and differentially affects the catalytic center. *Nucleic Acids Res.* 46(4):1945-1957.

Wilusz JE. (2015). Removing roadblocks to deep sequencing of modified RNAs. *Nat Methods.* 12(9):821-822.

Winther KS, Gerdes K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(18):7403-7407.

Wright M, Boonyalai N, Tanner JA, Hindley AD, Miller AD. (2006). The duality of LysU, a catalyst for both Ap4A and Ap3A formation. *FEBS J.* 273(15):3534-3544.

Wu X, Wu S, Li D, Zhang J, Hou L, et al. (2010). Computational identification of rare codons of *Escherichia coli* based on codon pairs preference. *BMC Bioinformatics.* 11:61. doi: 10.1186/1471-2105-11-61.

Xie J, de Souza Alves V, von der Haar T, et al. (2019). Regulation of the Elongation Phase of Protein Synthesis Enhances Translation Accuracy and Modulates Lifespan. *Curr Biol.* 29(5):737-749.

Yamamoto H, Wittek D, Gupta R, Qin B, Ueda T, et al. (2016). 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(9):E1180-9. doi: 10.1073/pnas.1524554113.

Yu CH, Dang Y, Zhou Z, et al. (2015). Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Mol Cell*. 59(5):744-754.

Zhang Y, Zborníková E, Rejman D, Gerdes K. (2018). Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of *Escherichia coli*. *mBio*. 9(2). pii: e02188-17. doi: 10.1128/mBio.02188-17.

Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qing G, Inouye M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 12(4):913-923.

Zhong J, Xiao C, Gu W, Du G, Sun X, et al. (2015). Transfer RNAs Mediate the Rapid Adaptation of *Escherichia coli* to Oxidative Stress. *PLoS Genet*, 11(6):e1005302. doi: 10.1371/journal.pgen.1005302.

Zhu M, Dai X. (2019). Maintenance of translational elongation rate underlies the survival of *Escherichia coli* during oxidative stress. *Nucleic Acids Res*. 47(14):7592-7604.

Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*. 30(4):892-897.

Tabla anexo 1: Frecuencias de uso de codones en *E. coli* (Thanaraj et al., 1996) y valores experimentales de eficiencia traduccional en condición control (medio M9r) y bajo estrés oxidativo (medio M9r + Pq 250 µM).

Aminoácido	Codón	Frecuencia De uso	M9r		Pq 250µM	
			Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
Met	ATG	0,0197	6,3755	0,4803	0,1798	1,8211
	TGT	0,0010	4,5785	1,2359	0,1406	1,4504
Cys	TGC	0,0030	4,8287	0,7744	0,1465	1,3416
	CAT	0,0044	5,6905	1,5794	0,1772	1,6707
His	CAC	0,0138	8,0665	1,0957	0,1476	1,8530
	AAA	0,0600	6,5181	0,5373	0,2948	2,0442
Lys	AAG	0,0191	8,2725	2,4958	0,2472	2,0421
	AGA	0,0001	6,5915	0,9102	0,1196	1,9099
Arg	AGG	0,0000	2,2922	0,6244	0,4749	1,5496
	CGT	0,0488	6,1575	0,4114	0,2080	2,2295
	CGC	0,0187	6,5484	0,8914	0,1898	1,7991
	CGA	0,0003	3,3082	1,0276	0,2784	1,4433
	CGG	0,0001	4,8957	0,8575	0,2997	1,8787
Asp	GAT	0,0185	2,2978	0,2301	0,1124	1,3736
	GAC	0,0385	2,5065	0,1916	0,0736	1,4413
Glu	GAA	0,0542	2,3485	0,7389	0,4295	1,5068
	GAG	0,0155	2,5676	0,5864	0,1415	1,7535
Gln	CAA	0,0046	7,1695	0,9662	0,1564	1,7333
	CAG	0,0304	6,5359	2,1776	0,2263	1,9030
Asn	AAT	0,0032	4,7547	0,2364	0,1429	1,6586
	AAC	0,0371	5,9927	0,8937	0,1829	1,8727
Thr	ACT	0,0253	8,2923	4,3859	0,4369	2,0616
	ACC	0,0269	6,0137	0,3713	0,2758	2,0469
	ACA	0,0010	4,6062	1,2287	0,3247	1,7825
	ACG	0,0034	6,1657	0,7772	0,2962	2,2368
Ser	AGT	0,0012	6,0705	0,3634	0,1921	2,0091
	AGC	0,0091	5,4361	0,5576	0,1809	1,9125
	TCT	0,0169	4,4561	1,0807	0,1419	1,5991
	TCC	0,0126	1,9262	0,3043	0,3310	1,7240
	TCA	0,0009	5,0218	0,7312	0,1807	1,8716
	TCG	0,0005	4,6275	0,2077	0,2345	1,6983
Trp	TGG	0,0061	4,3933	0,8216	0,1413	1,3622
Phe	TTT	0,0069	4,8894	1,5785	0,2453	1,4940
	TTC	0,0260	5,9135	0,4566	0,1832	1,6113
Tyr	TAT	0,0055	5,1136	0,1688	0,0966	1,1989
	TAC	0,0192	5,5284	0,8625	0,1619	1,6142
Ile	ATT	0,0108	5,4148	0,2568	0,1844	1,6952
	ATC	0,0475	5,6735	0,1213	0,2403	2,0108
	ATA	0,0000	4,3470	0,2499	0,0433	1,8347

Aminoácido	Codón	Frecuencia De uso	M9r		Pq 250µM	
			Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
Pro	CCT	0,0038	0,7776	0,3516	0,9035	1,8939
	CCC	0,0003	0,5660	0,3112	1,0947	1,7252
	CCA	0,0038	3,0586	0,2491	0,3056	1,9251
	CCG	0,0264	2,5876	0,8603	0,7849	1,7408
Ala	GCT	0,0470	6,0974	0,8550	0,4111	2,0975
	GCC	0,0080	6,1785	0,9060	0,1521	1,7088
	GCA	0,0272	5,9189	0,4970	0,0965	1,9599
	GCG	0,0201	4,8161	0,3526	0,1864	1,8455
Val	GTT	0,0499	7,5271	1,9381	0,2046	2,3260
	GTC	0,0063	5,1855	0,4995	0,1556	1,7704
	GTA	0,0227	6,4546	1,3783	0,1794	1,9687
	GTG	0,0120	4,7269	0,5060	0,1530	1,7364
Gly	GGT	0,0536	2,7808	0,2513	0,1745	1,8406
	GGC	0,0354	3,5982	0,3238	0,1193	1,6788
	GGA	0,0005	1,9365	0,0873	0,2700	1,7236
	GGG	0,0015	2,3335	0,5976	0,2351	1,7003
Leu	TTA	0,0005	5,5465	0,8393	0,3393	1,9968
	TTG	0,0026	7,1516	1,3046	0,1407	1,8950
	CTT	0,0029	6,4404	0,9247	0,0774	1,6958
	CTC	0,0023	0,9674	0,0959	0,3836	1,9845
	CTA	0,0003	5,7448	0,4516	0,1980	1,9257
	CTG	0,0611	5,7722	0,3566	0,2195	1,9597

Tabla anexo 2: Número y porcentaje de codones de los reporteros GFP y mCherry.

AA	Codón	GFP		mCherry	
		Nº codones	%	Nº codones	%
Ala	GCA	2	0,82	1	0,41
Ala	GCC	1	0,41	2	0,81
Ala	GCG	0	0,00	6	2,44
Ala	GCT	5	2,04	3	1,22
Arg	AGA	0	0,00	0	0,00
Arg	AGG	0	0,00	0	0,00
Arg	CGA	0	0,00	0	0,00
Arg	CGC	2	0,82	5	2,03
Arg	CGG	1	0,41	0	0,00
Arg	CGT	5	2,04	3	1,22
Asn	AAC	9	3,67	2	0,81
Asn	AAT	5	2,04	5	2,03
Asp	GAC	6	2,45	5	2,03
Asp	GAT	12	4,90	9	3,66
Cys	TGC	2	0,82	0	0,00
Cys	TGT	0	0,00	0	0,00
Gln	CAA	6	2,45	3	1,22
Gln	CAG	1	0,41	6	2,44
Glu	GAA	11	4,49	14	5,69
Glu	GAG	6	2,45	11	4,47
Gly	GGA	9	3,67	0	0,00
Gly	GGC	4	1,63	14	5,69
Gly	GGG	3	1,22	0	0,00
Gly	GGT	7	2,86	11	4,47
His	CAC	5	2,04	3	1,22
His	CAI	5	2,04	3	1,22
Ile	ATA	1	0,41	1	0,41
Ile	ATC	3	1,22	7	2,85
Ile	ATT	7	2,86	3	1,22
Leu	CTA	2	0,82	0	0,00
Leu	CTC	4	1,63	1	0,41
Leu	CTG	1	0,41	12	4,88
Leu	CTT	11	4,49	0	0,00
Leu	TIA	3	1,22	1	0,41
Leu	TTG	0	0,00	0	0,00

AA	Codón	GFP		mCherry	
		Nº codones	%	Nº codones	%
Lys	AAA	14	5,71	20	8,13
Lys	AAG	6	2,45	6	2,44
Met	ATG	5	2,04	10	4,07
Phe	TTC	4	1,63	5	2,03
Phe	TTT	8	3,27	5	2,03
Pro	CCA	5	2,04	2	0,81
Pro	CCC	2	0,82	0	0,00
Pro	CCG	1	0,41	8	3,25
Pro	CCT	2	0,82	3	1,22
Ser	AGC	1	0,41	3	1,22
Ser	AGT	2	0,82	0	0,00
Ser	TCA	1	0,41	0	0,00
Ser	TCC	2	0,82	2	0,81
Ser	TCG	2	0,82	0	0,00
Ser	TCT	3	1,22	7	2,85
Stop	TAA	1	0,41	1	0,41
Stop	TAG	0	0,00	0	0,00
Stop	TGA	0	0,00	0	0,00
Thr	ACA	4	1,63	1	0,41
Thr	ACC	2	0,82	6	2,44
Thr	ACG	2	0,82	3	1,22
Thr	ACT	11	4,49	3	1,22
Trp	TGG	1	0,41	3	1,22
Tyr	TAC	5	2,04	4	1,63
Tyr	TAT	4	1,63	8	3,25
Val	GTA	3	1,22	2	0,81
Val	GTC	7	2,86	2	0,81
Val	GTG	0	0,00	7	2,85
Val	GTT	8	3,27	4	1,63
Total		245	100	246	100