



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Evaluación del tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis* como
modelo de estudio para estudiar mecanismos de estrés
oxidativo inducido por mercurio como contaminante del
suelo

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

Biol. Iván Arvizu Hernández

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Querétaro, Qro. A 18 de diciembre de 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Evaluación del tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis* como modelo de estudio para estudiar mecanismos de estrés oxidativo inducido por mercurio como contaminante del suelo

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

Biol. Iván Arvizu Hernández

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Juan Campos Guillén
Presidente

Dr. Andrés Cruz Hernández
Secretario

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Vocal

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente

Dr. Miguel Angel Ramos López
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.
18 de diciembre de 2020
México

DEDICATORIAS

Principalmente al Creador por darme la vida y permitirme llegar a este punto en el camino y llenarme de bendiciones siempre de manera inmerecida.

A mi madre Verónica por todo su apoyo incondicional durante mi crecimiento personal y profesional y por ser la mejor mamá del mundo siendo todo para mis hermanos y para mí.

A Christian y Emily, por ser los mejores hermanos, por darme su compañía y alegría siempre.

Al amor de mi vida, Valeria V. R., a quien admiro muchísimo por ser un gran ser humano y de quien he aprendido mucho; por ser mi más grande motivación e inspiración para continuar con mi preparación académica y ser mejor persona cada día.

A mi tío Jorge por ser un gran ejemplo para mí, y por darme muy buenos consejos además de ser como un padre para mí.

A mis abuelitos Abel y Soledad, desde donde estén.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco infinitamente al Dr. Juan Campos por confiar una vez más en mi persona para la realización de este proyecto de maestría, por su apoyo, disponibilidad y por siempre enseñarnos que la constancia es la clave del éxito.
- Agradezco a mi comité, al Dr. Andrés Cruz, al Dr. Sergio Romero, al Dr. Ramiro Pacheco y el Dr. Miguel Ramos, por aceptar asesorarme y siempre criticar de manera constructiva mi proyecto y por preocuparse por nuestro desarrollo personal, interpersonal y académico.
- Al Dr. Juan Caballero por la inmensa ayuda para el análisis bioinformático y por abrirnos las puertas con amabilidad para hacer un análisis certero y fidedigno en la plataforma Databiology.
- A la M. en C. Erika Álvarez H. por su guía y ayuda en las actividades experimentales, por siempre procurar un ambiente alegre en el laboratorio y estar al pendiente de los estudiantes.
- A la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental de la Facultad de Química, por ser un posgrado de excelencia y velar por la calidad en el aprendizaje de sus estudiantes.
- Y en especial a la Universidad Autónoma de Querétaro por EDUCARME EN LA VERDAD Y EN EL HONOR.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS Y SIGLAS	V
RESUMEN.....	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 RNA de transferencia.....	4
2.1.1 Estructura secundaria y terciaria.....	4
2.1.2 Importancia y funciones de los tRNAs	8
2.1.3 tRNAs como adaptadores en la síntesis de proteínas	10
2.2 Metabolismo del tRNA en bacterias	14
2.2.1 Estructura de los genes de tRNA.....	15
2.2.2 Síntesis de tRNA y su procesamiento.....	18
2.2.3 Control de calidad en los tRNAs	22
2.2.4 El tRNA de cisteína (tRNA ^{Cys}) de <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.3 Factores que afectan el procesamiento del tRNA y su función.....	30
2.3.1 Diversos tipos de estrés inducen la fragmentación del tRNA	31
2.3.2 Estrés osmótico	34
2.3.3 Estrés Oxidativo.....	36
2.3.4 La exposición a mercurio causa estrés oxidativo.....	41
2.3.5 Absorción de mercurio en los organismos vivos	41
2.3.6 Alteraciones fisiológicas causadas por mercurio	42
2.4 Estrés oxidativo en <i>Bacillus subtilis</i>	44
2.4.1 El procesamiento del tRNA ^{Cys} de <i>Bacillus subtilis</i> es afectado por mercurio.....	48
2.5 <i>Bacillus subtilis</i> como modelo de estudio	51
2.5.1 La espora de <i>Bacillus subtilis</i> como modelo de estudio.....	54
2.5.2 Importancia biológica y biotecnológica	56
2.6 Contaminación del suelo con metales pesados.....	59
2.6.1 Fuentes de los metales pesados en suelos contaminados	60
2.6.2 Contaminación del suelo por mercurio.....	62
2.6.3 Factores que influyen en la movilidad y biodisponibilidad del mercurio en el suelo	63

3 HIPÓTESIS	65
4 OBJETIVOS	66
4.1 Objetivo General	66
4.2 Objetivos específicos	66
5.1 Material Biológico.....	67
5.2 Evaluación de los perfiles transcriptómicos del tRNA ^{Cys} en <i>Bacillus subtilis</i> a partir de bases de datos en NCBI	67
5.3 Análisis de moléculas de tRNA ^{Cys} en el transcriptoma de Nagler et al., 2016b.....	68
5.4 Establecimiento de las condiciones de germinación y crecimiento de esporas bajo estrés oxidativo usando HgCl ₂	71
5.4.1 Producción y purificación de esporas.....	71
5.4.2 Cinéticas de germinación de esporas y crecimiento	72
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
6.1 Perfiles transcriptómicos del tRNA ^{Cys} en <i>Bacillus subtilis</i> a partir de bases de datos en NCBI	73
6.2 Lecturas mapeadas para el tRNA ^{Cys} en la espora.....	77
6.3 Distribución de moléculas de tRNA ^{Cys} durante la germinación y crecimiento bajo estrés salino	81
6.4 Dinámica de las moléculas de tRNA ^{Cys} durante el crecimiento en alta salinidad.....	84
6.5 Establecimiento de las condiciones de germinación y crecimiento de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> bajo estrés oxidativo	90
7 CONCLUSIONES	93
8 REFERENCIAS	94
9 ANEXOS	137

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Distribución de genes de tRNA en bacterias.....	18
Cuadro 2 Descripción de las librerías de RNA-seq de <i>Bacillus subtilis</i> en NCBI.....	70
Cuadro 3 Lecturas mapeadas correspondientes al tRNA ^{Cys}	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los tRNAs.....	5
Figura 2. Estructura terciaria del tRNA.....	6
Figura 3. Modificaciones conocidas en tRNAs de bacterias.....	7
Figura 4. Proceso de síntesis de proteínas.....	12
Figura 5. Reacciones de aminoacilación de tRNAs.....	14
Figura 6. Unidades de transcripción codificantes para tRNAs.....	16
Figura 7. Ciclo de vida típico de un tRNA bacteriano.....	20
Figura 8. Rutas de procesamiento de tRNAs.....	21
Figura 9. Mecanismos de control de calidad-procesamiento del tRNA.....	24
Figura 10. Ubicación del gen tRNA ^{Cys} de <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figura 11. Vías de procesamiento del tRNA ^{Cys} en <i>Bacillus subtilis</i>	29
Figura 12. Categorías estructurales de los fragmentos de tRNA.....	32
Figura 13. Modelo del efecto del mercurio en la homeostasis celular.....	51
Figura 14. Descripción general de las subpoblaciones de moléculas de tRNA ^{Cys} en esporas inactivas de <i>Bacillus subtilis</i>	76
Figura 15. Porcentaje de lecturas almacenadas en endosporas inactivas.....	78
Figura 16. Distribución de subpoblaciones de moléculas de tRNA ^{Cys} respecto al tiempo...81	
Figura 17. Descripción general de la dinámica de las subpoblaciones de moléculas de tRNA ^{Cys} respecto al tiempo de crecimiento en presencia y ausencia de NaCl 1.2 M.....	84

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Abreviatura	Descripción
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitro
Kg	Kilogramo
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de hidrógeno
mg	Miligramo
µg	Microgramo
rpm	Revoluciones por minuto
M	Molaridad
mM	Milimolar
psi	Libras por pulgada cuadrada (lb/in ²)

Siglas	Descripción
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
tRNA	RNA de transferencia
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
ncRNA	RNA no codificante
miRNA	Micro RNA
sp.	Especie desconocida de un género

RESUMEN

En su hábitat natural, la bacteria del suelo *Bacillus subtilis* a menudo tiene que responder a estrés osmótico, deficiencia de nutrientes y estrés oxidativo. Al agotarse los nutrientes, esta bacteria genera endosporas que germinan para formar células vegetativas cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles. En este sentido, los mecanismos moleculares de acumulación de tRNAs durante la esporulación son una prioridad, ya que desempeñan un papel esencial en la decodificación de la información genética en el mRNA durante la síntesis de proteínas en la germinación de esporas y el crecimiento. La expresión génica se ha analizado previamente durante la germinación y el crecimiento. Sin embargo, no se ha estudiado ampliamente el procesamiento de los tRNAs bajo estrés por sal y estrés oxidativo. Para obtener más información sobre el procesamiento del tRNA bajo una perspectiva de secuenciación global, en este trabajo se analizaron tres transcriptomas de *Bacillus subtilis* disponibles en bases de datos para averiguar qué metodología de extracción, purificación y secuenciación de RNA permite el análisis del tRNA y en particular de aquellos tRNAs de copia única en el genoma, por ejemplo el tRNA^{Cys}. En este trabajo, se analizaron tres bases de datos de transcriptomas bajo condiciones experimentales y de secuenciación diferente, se encontró que solamente aquella secuenciada a través de la plataforma Ion Torrent, logramos obtener un análisis del tRNA^{Cys} y, no así con las metodologías de Illumina y el protocolo DM-tRNA-seq. Por lo tanto concluimos que los protocolos disponibles para el análisis de RNA tienen limitaciones, por lo que la recuperación y obtención de secuencias es diferente en cada una. Debido a esto, es importante entonces la evaluación previa de métodos que permitan la detección y análisis fino de las moléculas de tRNA a estudiar para evitar sesgos. Con los resultados anteriores, se establecieron condiciones de estrés oxidativo en la germinación de endosporas de *Bacillus subtilis* PY79 expuestas a diferentes concentraciones de HgCl₂. Los resultados muestran un efecto negativo en el crecimiento a tal concentración por lo que nos permitió generar condiciones de cultivo para que en posteriores investigaciones se analice la expresión del tRNA.

Palabras clave: estrés ambiental, endosporas de *Bacillus subtilis*, procesamiento de tRNA^{Cys}, RNA-seq.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

ABSTRACT

In its natural habitat, the soil bacterium *Bacillus subtilis* often has to respond to osmotic stress, nutrient deficiencies, and oxidative stress. As nutrients are depleted, these bacteria generate endospores that germinate to form vegetative cells when nutrients are available again. In this sense, the molecular mechanisms of accumulation of tRNAs during sporulation are a priority, since they play an essential role in the decoding of genetic information in the mRNA during protein synthesis in spore germination and growth. Gene expression has been previously analyzed during germination and growth. However, the processing of tRNAs under salt stress and oxidative stress has not been extensively studied. To obtain more information about tRNA processing from a global sequencing perspective, in this work three *Bacillus subtilis* transcriptomes available in databases were analyzed to find out which RNA extraction, purification and sequencing methodology allows tRNA analysis and in particular of those single copy tRNAs in the genome, for example the tRNA^{Cys}. In this work, three transcriptome databases were analyzed under different experimental and sequencing conditions, it was found that only the one sequenced through the Ion Torrent platform, we were able to obtain an analysis of the tRNA^{Cys} and, not with the methodologies of Illumina and the DM-tRNA-seq protocol. Therefore, we conclude that the protocols available for RNA analysis have limitations, so that the retrieval and obtaining of sequences is different in each one. Due to this, it is important then the prior evaluation of methods that allow the detection and fine analysis of the tRNA molecules to be studied to avoid bias. With the above results, oxidative stress conditions were established in the germination of *Bacillus subtilis* PY79 endospores exposed to different concentrations of HgCl₂. The results show a negative effect on growth at such a concentration, which allowed us to generate culture conditions so that the expression of tRNA can be analyzed in subsequent investigations.

Keywords: environmental stress, *Bacillus subtilis* endospores, tRNA^{Cys} processing, RNA-seq.

1 INTRODUCCIÓN

La traducción de la información del mRNA en proteínas es un paso central durante la expresión genética. Esta información genética codificada por 61 diferentes tripletes de nucleótidos llamados codones, es leída por el RNA de transferencia (tRNA) (Novoa and Ribas de Pouplana, 2012). La principal función de los tRNAs es llevar los aminoácidos correspondientes al ribosoma para facilitar la síntesis de proteínas, el cual es un proceso universal en todos los organismos (Elliott and Ladomery, 2016; Kubyskin et al., 2018). Para garantizar la síntesis de proteínas y la homeostasis celular efectivas, es importante conservar la integridad estructural y funcional de los tRNAs (Bloom-Ackermann et al., 2014; Gingold and Pilpel, 2011). Sin embargo, se ha observado que condiciones adversas como el estrés oxidativo y el estrés osmótico por altas concentraciones de sal, afectan los procesos biológicos celulares como consecuencia de la alteración de biomoléculas como lípidos, proteínas, DNA y RNA (Rana, 2008; Sies, 2015; Sies et al., 2017; Valko et al., 2005) .

El procesamiento del tRNA juega un papel importante y es un componente del metabolismo del RNA en todos los organismos (Elliott y Ladomery, 2016). En bacterias, hay suficiente evidencia que demuestra que los cambios en la renovación del RNA tienen un papel esencial en la adaptación al estrés (Anderson y Dunman, 2009; Shepherd e Ibba, 2015). Los tRNAs se sintetizan como precursores que se someten a modificaciones postranscripcionales, como el procesamiento del extremo 5' y 3', la adición de la secuencia 3'-CCA terminal y la edición de nucleótidos para generar un tRNA maduro y listo para la aminoacilación (Li and Deutscher, 1996; Pellegrini et al., 2003; Schürer et al., 2001). Al final de su vida útil, el tRNA es degradado por una maquinaria compuesta por RNAsas (Shepherd and Ibba, 2015). Cualquier defecto en este proceso, por ejemplo, la acumulación de tRNAs inmaduros o defectuosos, podría tener un efecto deletéreo en las células. El

procesamiento de RNA defectuoso a través del control de calidad, es imprescindible en el metabolismo de todas las células (Cairrão et al., 2033; Li et al., 2002).

Las reacciones redox son esenciales en los procesos metabólicos de las células. Sin embargo, cuando hay demasiada exposición a altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, pueden verse afectadas diversas rutas bioquímicas y fisiológicas, alterando así la homeostasis celular (Lushchak, 2014; Sies et al., 2017). Una cantidad creciente de evidencia ha demostrado el deterioro de las biomoléculas como resultado de la capacidad de metales pesados, como el mercurio (Hg), para inducir estrés oxidativo en las células (Valko et al., 2005). En el ambiente, los organismos están expuestos a diversas especies químicas de mercurio de diferente toxicidad (Clarkson et al., 2003; Genchi et al., 2017; Holmes et al., 2009). Los efectos biológicos adversos de los iones de mercurio están relacionados con su afinidad por los residuos de cisteína que contienen grupos tiol en las proteínas y tioles de bajo peso molecular con capacidad antioxidante (Allocati et al., 2009; Ezraty et al., 2017). Hay pruebas de varios sistemas procariotas que indican un efecto del mercurio en el metabolismo del RNA. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, concentraciones bajas de HgCl₂ inducen la degradación del RNA en células en crecimiento exponencial (Beppu and Arima, 1969), aunque no se determinaron los mecanismos exactos involucrados en esa inducción. En la arquea *Sulfolobus solfataricus*, la toxicidad del mercurio se debe a la inactivación de TFB-1 como consecuencia de la inhibición de la transcripción (Dixit et al., 2004).

La posibilidad de que el mercurio afecte el metabolismo del tRNA en las células bacterianas se ha investigado previamente. En Cruz-Hernández et al. 2013 dicha posibilidad se investigó en *Bacillus subtilis* durante el crecimiento exponencial utilizando cultivos de tipo salvaje y varias cepas deficientes en RNAsas (*pnp*, *rnr* y *pnp rnr*). Observaron un nivel bajo de acumulación de especies cortas de tRNA^{Cys} en la cepa de tipo silvestre, pero un nivel mucho más alto en la cepa deficiente en PNPasa. Estos resultados sugieren sensibilidad del metabolismo del tRNA^{Cys} a mercurio y participación esencial de PNPasa y RNasa R en el control de calidad

bajo estrés. Aquí se utilizó el análisis de *Northern blot*, por lo que no fue posible determinar un perfil global completo del mecanismo molecular del procesamiento de los tRNAs en estas condiciones. Es por lo anterior que es necesario el uso de nuevas metodologías para analizar de manera global cada molécula e isoceptor de tRNA y la expresión diferencial de RNAsas y otros genes relacionados con estrés oxidativo.

Por otra parte, se han reportado algunos eventos de resistencia a metales pesados en *Bacillus subtilis*, además de procesos de reparación de los sistemas edición y control de calidad en los tRNAs, pero sus sistemas moleculares aún no se comprenden bien (Barkay et al., 2003; Jarosławiecka and Piotrowska-Seget, 2014; Lu et al., 2016). Aunque se conoce que los metales pesados y sus especies químicas son sustancias sumamente tóxicas, sus mecanismos de acción aún se encuentran en discusión y deben ser detenidamente estudiados.

La comparación con el genoma de referencia nos permitirá analizar los perfiles de tRNAs que se estén generando en condiciones de estrés oxidativo causado por mercurio (Kunst, 1997). Es por lo anterior, que la bacteria *Bacillus subtilis* resulta ser un buen modelo de estudio para generar, por secuenciación masiva, diferentes transcriptomas con tecnologías de última generación y el análisis de datos con el uso de bioinformática para entender procesos de manera global y visualizar el metabolismo del tRNA en condiciones de estrés oxidativo inducido. En este sentido es importante evaluar el protocolo de extracción, purificación y secuenciación de RNA, ya que se sabe que las diferentes metodologías de recuperación y secuenciación de RNA muestran resultados diferentes. En el caso del tRNA, la secuenciación a través de métodos estándar no ha sido posible. Las características químicas y estructurales de los tRNAs dificultan su secuenciación. Algunas técnicas de secuenciación de tRNA están disponibles, pero, todas ellas tienen limitaciones.

2 ANTECEDENTES

2.1 RNA de transferencia

El RNA de transferencia (tRNA), también conocido como adaptadores o aminoacil-tRNA, son moléculas pequeñas de RNA no codificante y son las encargadas de transferir aminoácidos en la síntesis de proteínas. Desde la década de los 50's, estudios diversos se han realizado para conocer su biosíntesis, estructura y funciones por lo que son las moléculas de RNA mejor caracterizadas (Shepherd e Ibba, 2015). Están distribuidos universalmente en los tres dominios de la vida, por lo que existen al menos 60 tRNAs específicos en bacterias y de 100 a 110 en células de eucariotas (Elliott and Ladomery, 2016; Fujishima and Kanai, 2014). Los tRNAs son moléculas cortas, están constituidas por 73 a 95 ribonucleótidos que exhiben una estructura casi idéntica en procariontes y eucariotas, y en ambos tipos de organismos se transcriben como largos precursores que se modifican postranscripcionalmente para dar lugar a moléculas de tRNA funcionales (Elliott y Ladomery, 2016; Krebs et al., 2009).

2.1.1 Estructura secundaria y terciaria

Generalmente, los tRNAs tienen estructuras secundarias y terciarias comunes. La estructura secundaria de los tRNAs se representa en forma de una hoja de trébol (*cloverleaf*) que se encuentra conformada en dos dimensiones (Figura 1a), mientras que la estructura terciaria se observa como una estructura plegada tridimensionalmente en forma de L invertida, exhibiendo la forma real del tRNA (Figura 1b y Figura 2) (Väre et al., 2017). En la estructura de hoja de trébol se observa un apareo de bases complementarias que forman tallos (*stems*) que finalmente terminan en *loops* de cadena simple. Estas estructuras *stems-loops* son

llamadas brazos del tRNA (Alberts et al., 2014; Elliott and Ladomery, 2016; Krebs et al., 2009; Väre et al., 2017).

En ambas representaciones se pueden reconocer cinco regiones principales: 1) el sitio anticodón, 2) brazo D, 3) brazo T ψ C, 4) *loop* variable y 5) el brazo aceptor de aminoácidos. Todos estos sitios llevan a cabo una función específica en el ribosoma. Sin embargo, el sitio anticodón y el brazo aceptor son esenciales en la lectura del código genético y construcción de proteínas, por lo que mantener su integridad estructural y funcional es importante (Krebs et al., 2009; Lorenz et al., 2017; Väre et al., 2017) .

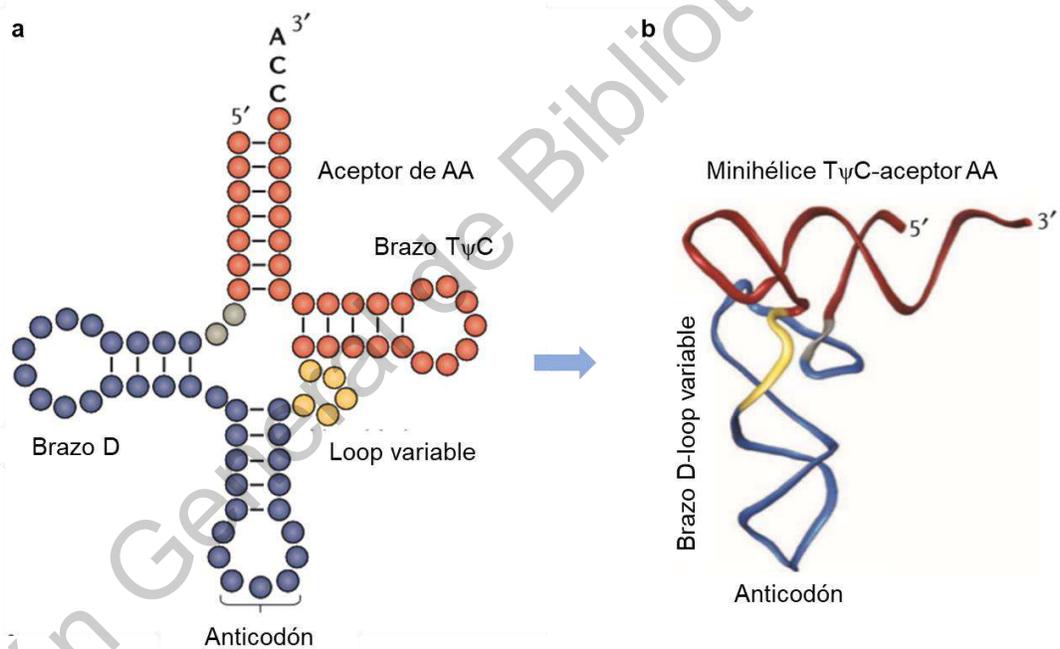


Figura 1. Estructura general de los tRNAs. En la figura a, se muestra la estructura secundaria representada como una hoja de trébol. En la figura b, se observa el esquema tridimensional en forma de L invertida. Todos los tRNAs están conformados por cinco regiones: 1) el sitio anticodón, 2) brazo D, 3) brazo T ψ C, 4) *loop* variable y 5) el brazo aceptor. Tomado y modificado de Schimmel, 2018.

El brazo aceptor consiste en un tallo de doble cadena con una terminación de la secuencia CCA no apareada con un grupo -OH libre donde se puede unir un aminoácido en el extremo 3' (Figura 1 a). El brazo T ψ C es llamado así debido a la presencia de este triplete, donde el símbolo ψ representa pseudouridina, una base modificada (Lorenz et al., 2017; Schimmel, 2018). El brazo anticodón siempre contiene el triplete codificante situado en el centro del *loop*, y es el encargado de leer el código del mRNA. EL brazo D es llamado así porque contiene dihidrouridina, otra base modificada en los tRNAs. El *loop* variable es llamado así por su variación en cuanto al número de bases que está conformado, que va de 3 a 21 bases en longitud (Alberts et al., 2014; Schimmel, 2018).

El apareo entre las bases es lo que mantiene la estructura secundaria mostrada en la Figura 1 a. Generalmente en los tRNAs, se encuentran apareos entre bases de A-U y G-C (tipo de complementariedad Watson y Crick), pero, ocasionalmente también se pueden encontrar G-U, G- ψ o A- ψ (no Watson y Crick), además de otras bases modificadas como inosina (I), formada a partir de la desaminación de la guanina (Krebs et al., 2009; Lorenz et al., 2017; Novoa et al., 2012).

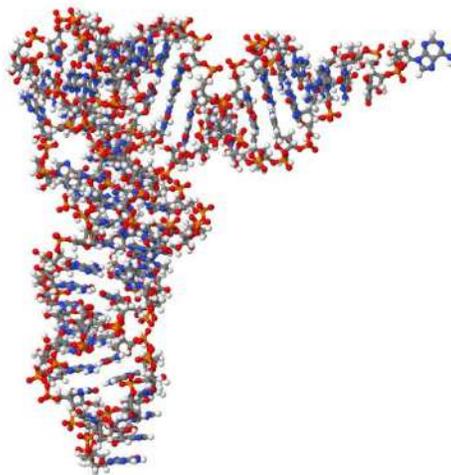


Figura 2. Estructura terciaria del tRNA. Esta estructura es similar en todos los tRNAs, en este caso, se muestra el arreglo molecular de la estructura terciaria del

RNA de transferencia de fenilalanina (tRNA^{Phe}). Como se puede apreciar, la estructura secundaria de hoja de trébol (Figura 1 a) da como resultado un plegamiento complejo tridimensional de la molécula. El sitio de unión de aminoácidos en el extremo 3' y el sitio anticodón se observan en los dos extremos de la L. Tomado y modificado de Alberts et al., 2014.

Estos tipos de bases adicionales son menos estables que las bases regulares, pero aun así permiten la formación de estructuras terciarias en los tRNAs. Análisis comparativos en la secuencia de ribonucleótidos de los tRNAs, han encontrado algunas posiciones que son invariantes (o conservadas); generalmente la misma base es encontrada en esa posición. Algunas otras posiciones han sido descritas como semi-invariantes (o semiconservadas) porque están restringidas a un tipo base (purina o pirimidina), pero cualquier base de un tipo puede estar presente (El Yacoubi et al., 2012).

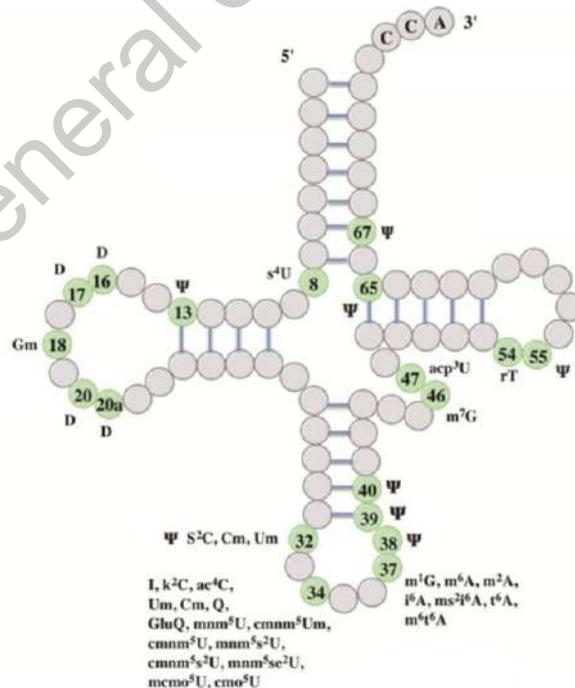


Figura 3. Modificaciones conocidas en tRNAs de bacterias. Las abreviaciones de grupos incluyen m-, c-, n-, o-, t-, i-, k-, r- y s- que representan a metil, carbono, amino, oxi, treonina, isopentil, lisina, ribosa y grupos tiol respectivamente. Otras abreviaciones son acp: 3-amino-3-carboxipropil, D: dihidrouridina, I: inosina, ψ : pseudouridina, Q: queuosina. Las otras letras mayúsculas se refieren a las bases uracilo, citosina, guanina y adenina. El índice y el exponente indican el número y la posición de la sustitución, por ejemplo: 6-dimetiladenosina está representado como m⁶₂A. Modificado de Shepherd e Ibba, 2015.

En los tres dominios de la vida se conoce una gran diversidad química en las moléculas de tRNA, esto debido a aquellas modificaciones que tienen lugar después de la transcripción (El Yacoubi et al., 2012; Shepherd e Ibba, 2015). Hasta ahora se han descrito más de 150 modificaciones químicas, las cuales generan derivados de los cuatro nucleósidos comunes, adenosina, guanosina, citidina y uridina (Figura 3). Como se puede observar, generalmente en las posiciones 34 y 37 existe una gran frecuencia y diversidad de modificaciones.

Trabajos como el de Bjork et al., 1987 y posteriores, han demostrado que si bien las modificaciones de los tRNAs tienen un papel principal en el mantenimiento de la eficiencia y la fidelidad de la traducción (modificaciones del 3' y posición 37), su importancia generalmente se subestima, y es que también pueden asumir un papel regulador mucho más global dentro de la célula al proporcionar conexiones entre la síntesis de proteínas, el metabolismo y las vías de respuesta al estrés (Bjork, 1995; Bjork et al., 1987).

2.1.2 Importancia y funciones de los tRNAs

Clásicamente, la función conocida asociada a los tRNAs es la de transferir la información genética codificada en el mRNA para la síntesis de proteínas a través

del acarreo diferencial de aminoácidos. Sin embargo, la investigación realizada en los últimos años da una fuerte evidencia de la existencia de una gran diversidad funcional de los tRNAs, no solamente la que está involucrada en el proceso de traducción. Los tRNAs están relacionados también con eventos de inhibición apoptótica vía complejación del citocromo c (Lee et al., 2009; Raina e Ibbá, 2014). También pueden participar en la adición de aminoácidos a lípidos de membrana; pueden ser parte de los blancos para algunos antibióticos o también estar relacionados con su biosíntesis (Banerjee et al., 2010; Raina e Ibbá, 2014; Schimmel, 2018). Las bacterias tienen diversos mecanismos para resistir la acción antibiótica y la resistencia a los antibióticos es un desafío cada vez mayor en el tratamiento clínico. La aminoacilación de los lípidos bacterianos de la membrana externa que dependiente de tRNAs, confiere mayor virulencia y resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos (O'Donoghue et al., 2018).

Bajo estrés, algunos tRNAs se dividen en mitades creando moléculas con función de señalización (Nawrot et al., 2011; Schimmel, 2018), mientras que los fragmentos derivados de tRNAs más cortos pueden funcionar como miRNAs (Lee et al., 2009; Yeung et al., 2009). Además, se han identificado diversas modificaciones de nucleósidos de los tRNAs que juegan un papel importante en la regulación de la expresión genética (Duechler et al., 2016). De acuerdo con las bases de datos de modificaciones de RNA, Modomics, <http://modomics.genesilico.pl> y The RNA Institute Database <http://mods.rna.albany.edu>, se conocen más de 150 tipos diferentes de modificaciones en DNA y RNA, de las cuales más de 90 han sido encontradas en tRNAs. Siendo estas moléculas las que más nucleósidos modificados contienen.

Son diversas las funciones que desempeñan estas modificaciones nucleosídicas. En efecto, se requieren ciertas modificaciones específicas para la estabilización de la estructura terciaria de los tRNAs, lo que influye en la tasa de aminoacilación. También se sabe que otras modificaciones participan en las funciones reguladoras de los tRNAs. Se ha demostrado que estas modificaciones

controlan la escisión de las propias moléculas de tRNA (Blanco et al., 2014; Klassen et al., 2008; Saikia et al., 2012a; Schaefer et al., 2010). Es importante destacar que algunas modificaciones muestran cambios dinámicos provocados, por ejemplo, por etapas en los ritmos circadianos, en la progresión del ciclo celular o por factores ambientales como la nutrición o el estrés (Zhou et al., 2013).

Si bien, son múltiples las funciones que realizan los tRNAs completos y sus modificaciones químicas que tienen lugar sus nucleósidos. Sin embargo, se han reportado también diversas funciones en los fragmentos de tRNA como mecanismos de respuesta a estrés. Se sabe que ciertas condiciones de estrés inducen la fragmentación de moléculas de tRNA a través de cortes en el sitio anticodón (Kirchner e Ignatova, 2015). En células de mamíferos, la angiogenina, una ribonucleasa, es quien cumple esta función (Fu et al., 2009). Bajo estrés, esta enzima es liberada al citoplasma de las células y hace cortes reversibles en los extremos 3'-CCA de los tRNAs, por lo que se inhabilitan para ser usados en la traducción (Czech et al., 2013). Otro corte se realiza en el sitio anticodón, el cual crea mitades de tRNA e induce la formación de gránulos de estrés, donde los mRNA que no son necesarios para la respuesta al estrés son entonces capturados e inactivados (Emera et al., 2010; Schimmel, 2018).

En bacterias y levaduras, esta fragmentación del sitio anticodón es utilizada como un mecanismo de defensa para inhibir organismos competidores. Estos eventos de fragmentación son llevados a cabo por nucleasas específicas para tRNA, incluidas algunas toxinas bacterianas como Colicin E5, Colicin D y PrrC. En levaduras se han identificado toxinas como Zymocin y PaT que participan en estos procesos de corte (Meineke et al., 2011; Saxena et al., 2002; Tomita et al., 2000).

2.1.3 tRNAs como adaptadores en la síntesis de proteínas

El RNA mensajero (mRNA) puede ser distinguido del aparato responsable para su traducción por el uso *in vitro* libre de sistemas celulares para sintetizar proteínas. Un sistema de síntesis proteica de un tipo celular puede traducir el mRNA de otro, demostrando así que el código genético y el aparato de traducción son universales (Barciszewska et al., 2016). El código genético escrito en el DNA se transcribe en el mRNA a través de un lenguaje que consta de tres nucleótidos (codón), el cual es leído y traducido en una cadena polipeptídica en los ribosomas. Existen 64 codones posibles (cuatro bases tomadas de tres en tres, 4^3) (Banerjee et al., 2010; Li y Zhou, 2009; Raina e Ibba, 2014; Wilusz, 2015).

Una de las características más importantes del código genético es que muchos aminoácidos están codificados por más de un codón cada uno. En estos casos no existe una correspondencia uno a uno entre el aminoácido y el codón (Alberts et al., 2014; Kubyshkin et al., 2018). En consecuencia, el saber donde se encuentra situado un aminoácido determinado, no significa conocer automáticamente el codón correspondiente. Por esta razón se sabe que el código genético es un código degenerado (Alberts et al., 2014; Kapp y Lorsch, 2004).

Cada triplete nucleotídico en el mRNA corresponde a un aminoácido. Sin embargo, de la incongruencia de estructura entre el trinucleótido y el aminoácido surge la pregunta de cómo cada codón se corresponde con su aminoácido particular. La respuesta es el adaptador, el tRNA, que funciona como intermediario entre condón y aminoácido. Un tRNA tiene dos propiedades cruciales, representa a un solo aminoácido (que es unido covalentemente) y, este contiene una secuencia trinucleótido, el anticodón, que es complementario al codón que representa ese aminoácido (Figura 4). El anticodón permite al tRNA reconocer el codón correspondiente a través del apareo de bases complementarias (Kapp y Lorsch, 2004; Krebs et al., 2018; Wang et al., 2006).

Si se tratara siempre del apareamiento estándar de A con U y G con C, existiría al menos un tRNA para cada codón. En algunos casos sucede así, por ejemplo, hay seis tRNAs diferentes en *Escherichia coli* que transportan leucina, uno

por cada codón (Wang et al., 2006). Por otra parte, algunos tRNAs pueden reconocer más de un codón. Por ejemplo, aunque hay dos codones de lisina en *Escherichia coli*, existe solo un lisil-tRNA cuyo anticodón puede aparearse con AAA y AAG. En estos casos especiales, las moléculas de tRNA forman pares de bases estándar solo en las dos primeras posiciones del codón, y toleran el apareamiento irregular en la tercera posición (complementariedad no Watson y Crick). Este evento es conocido como balanceo (Hopper y Phizicky, 2003; Krebs et al., 2018; Wang et al., 2006).

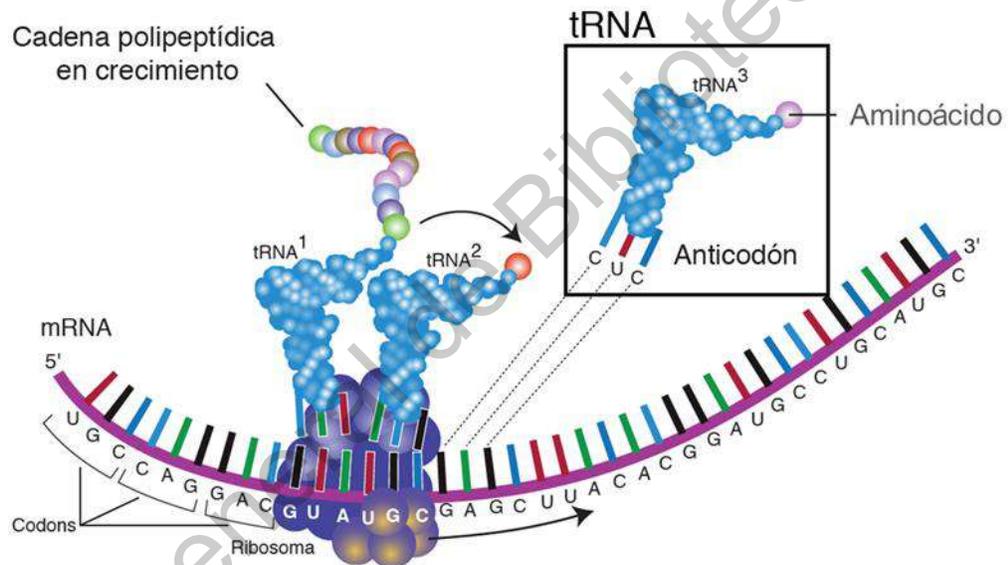


Figura 4. Proceso de síntesis de proteínas. El proceso de síntesis de proteínas traduce los codones (tripletes de nucleótidos) del mRNA del código de los 20 aminoácidos esenciales que construyen las cadena de polipéptidos de las proteínas, a través de los adaptadores biológicos, los tRNAs. El proceso de traducción del mRNA comienza en su extremo 5' y concluye en el extremo 3'. A lo largo del proceso, la cadena polipeptídica se sintetiza desde su extremo amino-terminal a su carboxilo-terminal. Tomado y modificado de Krebs et al., 2018.

Existe al menos un tRNA (pero usualmente más) para cada aminoácido. Un tRNA es nombrado utilizando una abreviación que consta de tres letras a manera de superíndice. Si hay más de un tRNA para el mismo aminoácido, se usan números en subíndices para distinguirlos. Así dos tRNAs para tirosina (*tyrosine*) podrían ser escritos como tRNA₁^{Tyr} y tRNA₂^{Tyr} (Alberts et al., 2014; Elliott and Ladomery, 2016; Krebs et al., 2018).

Cuando un tRNA es cargado con el aminoácido correspondiente a su secuencia anticodón, éste es llamado aminoacil-tRNA (Giegé y Springer, 2016; Ibbá y Söll, 2000). El aminoácido es unido por un enlace éster en su grupo carboxilo al grupo hidroxilo 2' o 3' de la ribosa de la base ubicada en la región 3' del tRNA, que es siempre un residuo de adenina perteneciente a la secuencia CCA (Figura 5). Este proceso de carga es catalizado por una clase específica de enzimas llamadas aminoacil-tRNA sintetasas, de las cuales existen al menos 20. Cada enzima puede reconocer un aminoácido único (Ho et al., 2018; Kapp y Lorsch, 2004).

El reconocimiento del tRNA correcto por parte de una aminoacil-tRNA sintetasa implica contactos específicos entre regiones clave del tRNA y la sintetasa. El anticodón del tRNA juega un papel esencial en el reconocimiento por parte de la enzima (Giegé, 2006). Sin embargo, se han realizado estudios de unión entre tRNAs y aminoacil-tRNA sintetasas, donde se cambiaron por mutación bases específicas en el tRNA, y se ha observado que solo algunos nucleótidos fundamentales, además del anticodón, están implicados en el reconocimiento. Estos otros nucleótidos clave forman parte del brazo aceptor de la molécula de tRNA (Figura 1) (Giegé, 2006; Ho et al., 2018).

La reacción específica entre un aminoácido y su tRNA comienza con la activación del aminoácido por reacción con ATP, cuyos productos son aminoacil-AMP + P-P (Figura 5). Generalmente, el intermediario aminoacil-AMP formado permanece unido a la enzima hasta que se produce el choque con la molécula de tRNA adecuada. Entonces el aminoácido activado se une al tRNA para formar un

tRNA cargado, dando como productos aminoacil-tRNA + AMP. Tras la activación y la carga, el aminoacil-tRNA es liberado de la enzima y viaja al ribosoma donde se sintetiza el polipéptido (Ibba y Söll, 2000; Pang et al., 2014b).

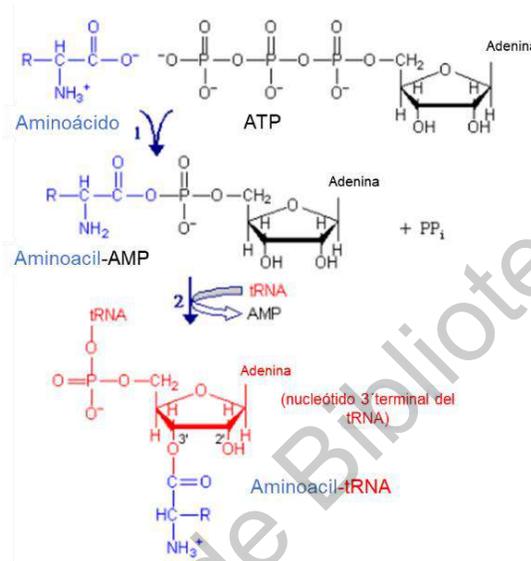


Figura 5. Reacciones de aminoacilación de tRNAs. La aminoacilación de los tRNAs se lleva a cabo en dos etapas. La primera etapa es la formación de un aminoacil adenilato, el aminoacil-AMP, el cual se queda unido en el sitio activo de la enzima. En la segunda etapa, el grupo aminoacil es transferido al tRNA para formar un aminoacil-tRNA. Tomado y modificado de <https://www.wikipathways.org/>.

2.2 Metabolismo del tRNA en bacterias

Antes de que se produzca un reconocimiento preciso por parte de la aminoacil-tRNA sintetasa y otros componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, cada tRNA debe someterse primero a un proceso de maduración específico. La maduración asegura que la integridad estructural y la composición de la molécula final de tRNA conduzcan a su funcionamiento exacto. En todos los reinos de la vida, la maduración de los precursores de tRNA se compone de

múltiples pasos. Antes de la aminoacilación del extremo 3' por la aminoacil-tRNA sintetasa, cada transcrito precursor de tRNA sintetizado debe procesarse eficientemente en los extremos 5' y 3', en la mayoría de los casos, por modificaciones adicionales en residuos específicos dentro de su estructura (Alberts et al., 2014; Elliott and Lodomery, 2016; Krebs et al., 2009).

2.2.1 Estructura de los genes de tRNA

En bacterias, los genes que codifican para tRNAs son frecuentemente encontrados en *clusters* en el cromosoma, y también es común la presencia de múltiples copias de estos genes. Hasta ahora, se han descrito tres diferentes unidades de transcripción codificantes para tRNAs (Figura 6), abarcando esos que solamente contienen genes de tRNA, los que contienen genes de tRNA y están relacionados con operones de RNA ribosomal (rRNA) y operones de tRNA que también incluyen genes que codifican proteínas específicas, tales como factores de elongación Tu (EF-Tu), entre otras (Toh et al., 2009). Estas estructuras genéticas permiten la transcripción de un tRNA de un solo promotor en precursores que son típicamente más largos que la molécula madura final. En términos estructurales, los genes para tRNAs son a menudo pequeños, que van de 75 a 90 pares de bases en longitud. En general, sus secuencias de nucleótidos varían significativamente entre cada gen de tRNA pero siempre hay cuatro o cinco repeticiones invertidas que son responsables de la formación de los elementos del *stems-loop* que se encuentran dentro de cada estructura de hoja de trébol (Figura 1). En bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, los genes para tRNAs a menudo tienen codificada la secuencia CCA del extremo 3' (Blattner et al., 1997; Hartmann et al., 2009; Schürer et al., 2001). Mientras que la mayor parte de genes de tRNAs en sistemas eucariotas, este requerimiento esencial, es añadido a la molécula postranscripcionalmente (Schürer et al., 2001; Shepherd e Ibba, 2015).

La mayoría los genes de tRNAs bacterianos codifican una secuencia ininterrumpida, es decir, no contienen intrones (Hartmann et al., 2009; Hopper y Phizicky, 2003; Li, 2007; Muralitharan y Thajuddin, 2008). En eucariotas y arqueas, los intrones de tRNAs son más comunes, de 4 a 25 % de los genes de tRNA (Li, 2007). Los intrones de tRNAs bacterianos son del tipo de intrón del grupo I de autoempalme, mientras que los intrones de tRNAs de eucariotas y arqueas requieren una endonucleasa de empalme para la escisión (Abelson et al., 1998; Trotta y Abelson, 1999).

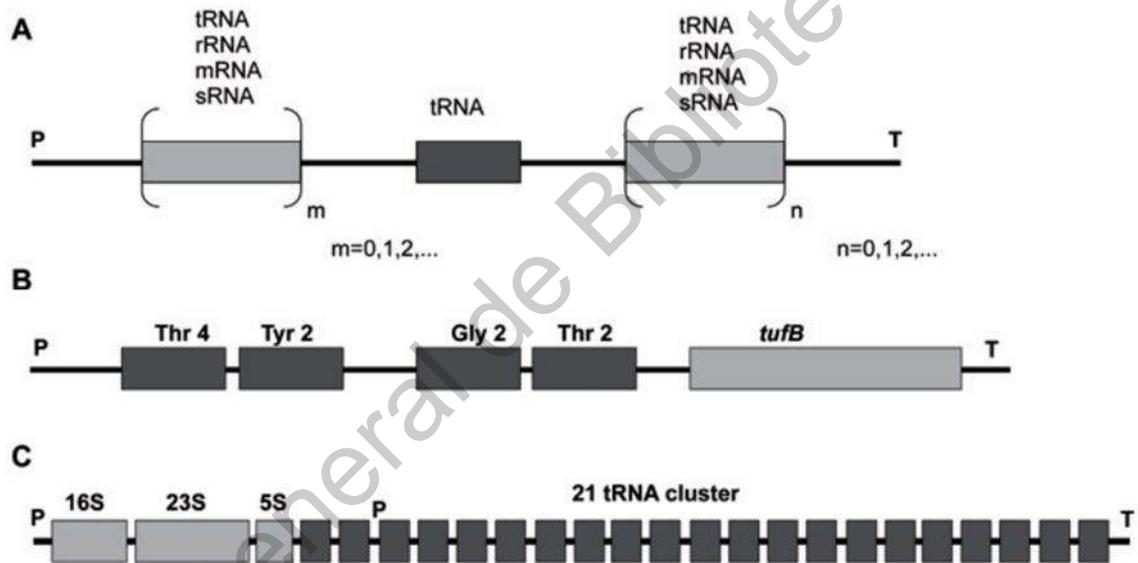


Figura 6. Unidades de transcripción codificantes para tRNAs. En A, se muestra una representación general de un operón de tRNA, cuyos genes pueden ser expresados en diferentes contextos, rRNA, mRNA, sRNA. En B, el operón *tufB* de *Escherichia coli* es mostrado como ejemplo de un operón con genes que codifican para tRNA y también para proteínas. En C, el operón *rrnB/trnB* de *Bacillus subtilis*, ejemplo de un *cluster* de genes de tRNA relacionadas con un operón de RNA ribosomal. P y T significan promotor y terminador respectivamente.

En diversas bacterias que codifican para la endoribonucleasa RNasa E o sus homólogos, hay una secuencia rica en AU en las proximidades del extremo 3' de sus tRNAs. Esto presumiblemente sirve como una señal para el procesamiento endonucleolítico del extremo 3'. Las bacterias que carecen de RNasa E o un homólogo, parecen carecer también de una secuencia rica en AU en esta región (Li et al., 2005).

Otra característica de los genes bacterianos de tRNA es la identidad del nucleótido que limita con el inicio (posición +1) de la secuencia de codificación del tRNA. El nucleótido inmediatamente río abajo de este sitio será el primer nucleótido del tRNA maduro. La mayoría de los tRNAs de bacterias tienen una G en esta posición, la posición +1 (Jühling et al., 2009). El nucleótido que se encuentra inmediatamente río arriba de la secuencia codificante del tRNA (la posición -1) es, en la mayoría de las bacterias, una U (Brännvall et al., 2003; Sun et al., 2006). Las identidades de estos nucleótidos son importantes en relación con el procesamiento del extremo 5' del tRNA.

El número promedio y máximo de genes de tRNA en un operón bacteriano también varía significativamente. La comparación de bacterias con un número similar de genes de tRNA, como se muestra en la Tabla 1, ilustra claramente esto. *Streptomyces coelicolor*, que tiene 65 genes de tRNA, de estos, aproximadamente el 71 % de sus transcritos son RNA mono o policistrónico que carecen de otros genes de tRNA. Esto debería compararse con *Listeria monocytogenes*, que tiene solo el 12 % de sus 67 genes de tRNA organizados de esta manera. Por su parte *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, que tienen 86 genes de tRNA, también difieren en su organización (Dittamar et al., 2004; Marck and Grosjean, 2002). Mientras que *Bacillus subtilis* tiene solo aproximadamente el 9 % de sus genes de tRNA no agrupados con otros genes de tRNA, *Escherichia coli* tiene el 30 %. De hecho, *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* tienen el 43 % y el 55 % de todos sus genes de tRNA respectivamente, agrupados en dos grandes operones de tRNA que contienen 16 y 21 genes de tRNA cada uno (Figura 6).

Cuadro 1. Distribución de genes de tRNA en bacterias

Organismo	Número de genes de tRNA/operón										Referencia	Operones de rRNA con genes de tRNA	Σ
	1	2	3	4	5	6	7	9	16	21			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	26	7	5	2	0	0	0	0	0	0	Stover et al., 2000	4	63
<i>Bacillus subtilis</i> 168	8	3	0	2	1	1	1	1	1	1	Kunst et al., 1997	7	86
<i>Escherichia coli</i> K12	26	4	7	3	1	0	2	0	0	0	Blattner et al., 1997	7	89
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	8	2	0	1	1	0	0	1	1	1	Glaser et al., 2001	6	67
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	29	5	2	0	0	0	0	0	0	0	Cole et al., 2001	0	45
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	31	4	2	0	0	0	0	0	0	0	Fleischmann et al., 2002	0	45
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	18	9	3	2	0	1	0	0	0	0	Tettelin et al., 2000	4	59
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	46	1	1	1	2	0	0	0	0	0	Bentley et al., 2002	1	65

Σ= total de genes de tRNA para cada organismo

2.2.2 Síntesis de tRNA y su procesamiento

Después de la expresión de los genes de tRNA, por lo general los transcritos primarios, también llamados precursores, a menudo tienen extensiones en los extremos 3' y 5'. También, algunos transcritos bacterianos son policistrónicos, conteniendo más de una especie de tRNA, mientras que otros son monocistrónicos (Inokuchi y Yamao, 1995; Z. Li y Deutscher, 2002; Ow y Kushner, 2002). Los pasos siguientes en el procesamiento, están dados por eventos de corte endonucleolíticos mediados por enzimas RNasas (Figura 7). Se ha visto que este procesamiento de los precursores ocurre durante o inmediatamente después de llevarse a cabo la transcripción (Grosjean, 2009).

En los tres dominios de la vida, el procesamiento del extremo 5' del transcrito de tRNA es llevado a cabo por una ribonucleoproteína llamada RNasa P (Altman y Kirsebom, 1999; Frank y Pace, 1998). En los años 70's esta RNasa fue relacionada inicialmente con el procesamiento del tRNA cuando se demostró que eliminaba específicamente un fragmento de 41 pares de bases del extremo 5' del

tRNA^{Tyr} en *Escherichia coli*, dejando el extremo 3' intacto (Altman, 1971; Altman y Smith, 1971). Trabajos posteriores de precursores de tRNA acumulados en una cepa mutante de *Escherichia coli* con una RNasa sensible a temperatura, esclarecieron el papel esencial de la enzima en la maduración del extremo 5' en todas las especies de tRNA de esa bacteria (Altman, 1975).

Cuando la molécula precursora de tRNA contiene solo una secuencia para tRNA, el procesamiento por parte de la RNasa P puede ser el único requerimiento para la maduración de la terminación 5'. En el caso contrario de que el transcrito contenga más secuencias de tRNA, otras endoribonucleasas como la RNasa E y RNasa III, pueden participar para generar moléculas precursoras más pequeñas (Li y Deutscher, 2002). Estos precursores más pequeños pueden ser susceptibles a ser procesados más eficientemente por la RNasa P, para así generar una molécula con el extremo 5' maduro (Figura 7). El procesamiento subsecuente está dado por exoribonucleasas, tal como las RNasas II, BN, D, PH, PNPasa y T, las cuales intervienen en la generación de un 3' maduro (Reuven y Deutscher, 1993; Sakano y Shimura, 1978, 1975).

El procesamiento de la terminación 3', en general, es iniciado por una escisión endonucleolítica que tiene lugar río abajo de la secuencia CCA terminal (Mörl and Marchfelder, 2001). Se ha observado que este evento de corte a menudo es realizado antes del procesamiento del 5' por acción de la RNasa P y también la actividad exonucleolítica del 3'. Este procesamiento endonucleolítico en el 3' del precursor es llevado a cabo por dos enzimas, la RNasa E y RNasa III (Apirion y Miczak, 1993; Li y Deutscher, 2002; Ray y Apirion, 1981). Se sabe que la estructura primaria y secundaria del RNA determina la amplia especificidad de sustrato de RNasa E y RNasa III. Así las secuencias de cadena sencilla y secuencias ricas en AU son reconocidas por RNasa E; mientras la RNasa III se une a secuencias de RNA de doble cadena (McDowall et al., 1994; Nicholson, 1999).

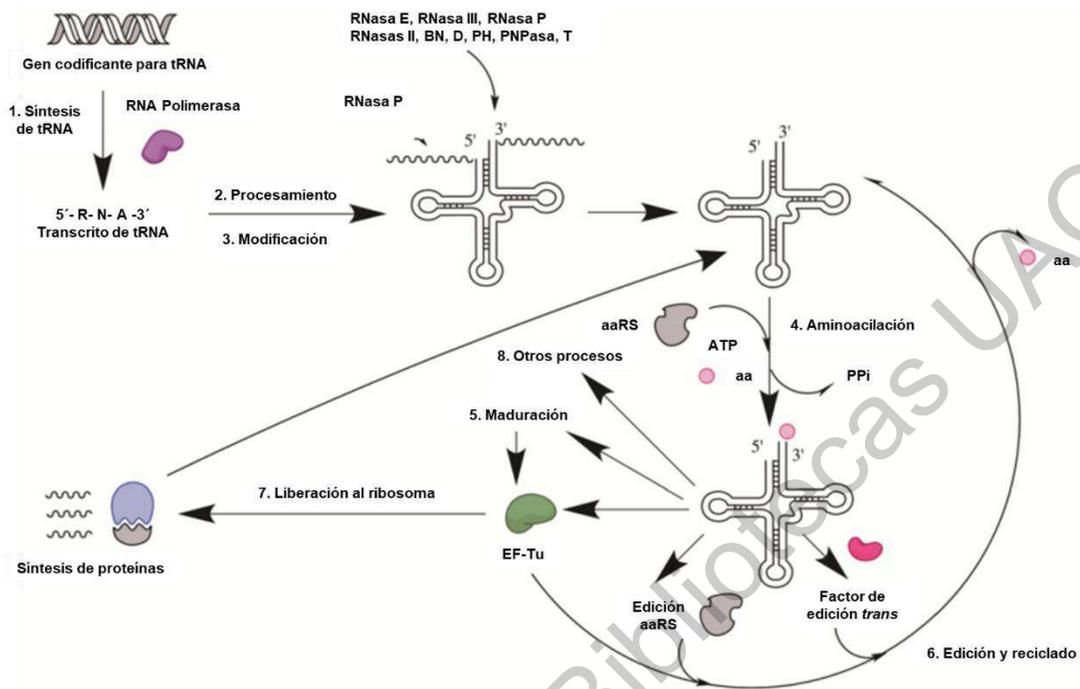


Figura 7. Ciclo de vida típico de un tRNA bacteriano. Las abreviaciones corresponden a aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS), fosfato inorgánico (PPI), aminoácido (aa) y factor de elongación-TU (EF-Tu). Tomado y modificado de Shepherd e Ibba, 2015.

En células bacterianas y eucariotas se han identificado dos tipos de precursores intermedios de tRNAs, el factor principal que los diferencia está en términos de sus requerimientos para el procesamiento exonucleolítico del extremo 3'. En el tipo de precursor más común, la secuencia 3'-CCA del tRNA ya está presente y rio abajo, se encuentra una serie de nucleótidos extra. La maduración final para este tipo de precursor en el 3', únicamente requiere de una nucleasa que pueda recortar hasta el extremo crítico del CCA sin interrumpirlo (Figura 8). En el otro tipo de precursor, que es raro en bacterias pero común en eucariotas, otros residuos sustituyen la secuencia 3'-CCA, es decir, no está codificada genéticamente. En este caso, el procesamiento del 3' requiere una nucleasa que remueva solamente los residuos de sustitución, dejando entonces un producto que

puede ser reparado por una nucleotidiltransferasa, de modo que tenga una terminación 3'-CCA al finalizar la maduración (Deutscher et al., 1977; Reuven et al., 1997; Schürer et al., 2001).

La enzima ATP(CTP): tRNA nucleotidiltransferasa (también llamada CCAsa) adiciona la secuencia CCA esencial al 3' terminal de los tRNAs (Figura 8). Esta enzima es esencial en aquellos organismos que no tienen codificada la secuencia CCA en los genes de tRNA, incluyendo eucariotas, algunas eubacterias y algunas arqueas (Campos-Guillen et al., 2005; Schürer et al., 2001). En organismos como *Escherichia coli*, donde todos los genes de tRNA tienen codificada la secuencia 3'-CCA, esta enzima no es esencial, y al parecer sólo se limita a la reparación de los tRNAs que han sufrido un ataque exonucleolítico (Reuven et al., 1997; Schürer et al., 2001).

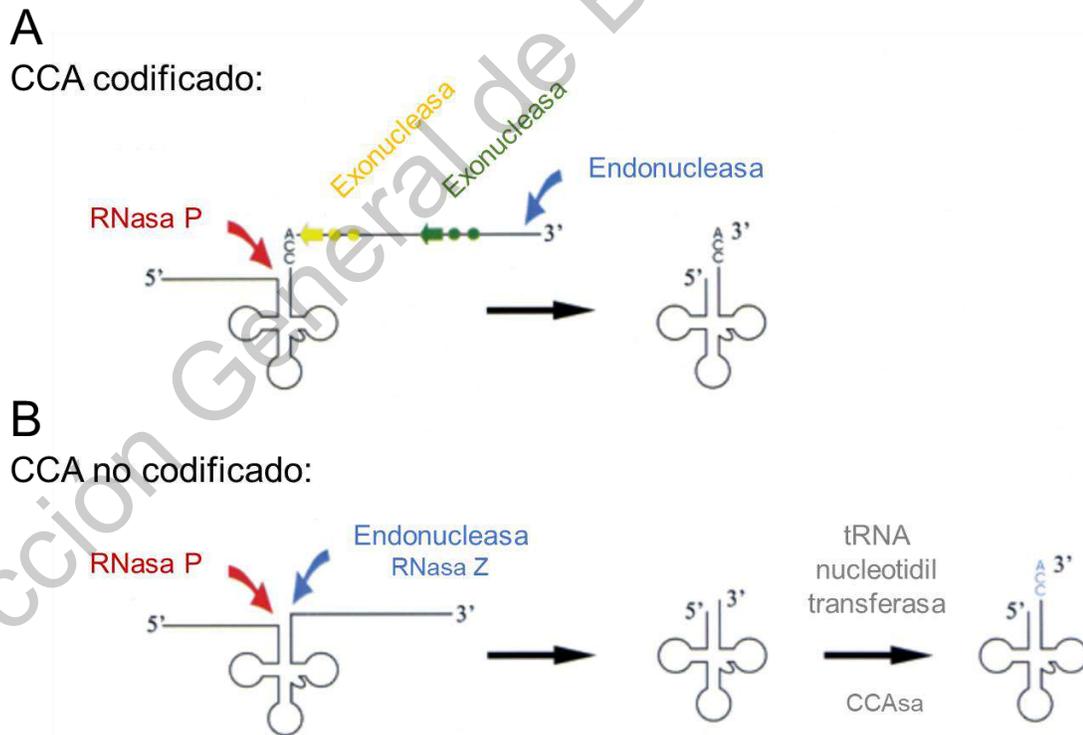


Figura 8. Rutas de procesamiento de tRNAs. En A, una vía de procesamiento típica de genes de tRNA de *Escherichia coli* involucrando exo y endonucleasas, la cual es un ejemplo de precursores de tRNA con la secuencia CCA codificada

genéticamente. En B se muestra el procesamiento general de un transcrito de tRNA carente del CCA en el extremo 3'. Este tipo de procesamiento está reportado en tRNAs de *Bacillus subtilis*, arqueas y eucariotas como *Drosophilla melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*, donde el procesamiento del extremo 3' está dado por la endonucleasa RNasa Z y la secuencia CCA se adiciona postranscripcionalmente por tRNA nucleotidil transferasas.

Cuando un precursor de tRNA contiene la secuencia CCA terminal, la RNasa D es la enzima que remueve los nucleótidos extras hasta el CCA, dando lugar así a un tRNA maduro listo para el proceso de aminoacilación (Figura 5) (Cudny y Deutscher, 1980). Por otra parte, en el segundo tipo de precursor que tiene el CCA incompleto o ausente, participa una exonucleasa llamada RNasa BN. A diferencia de la RNasa D, la especificidad de la RNasa BN para precursores de tRNA no está determinada por la presencia de un 3'-CCA terminal intacto (Asha et al., 1983; Asha y Deutscher, 1983). En los años 90's, se identificaron otras tres exonucleasas que participan en el procesamiento del extremo 3', la RNasa PH, la RNasa T y una enzima polinucleótido fosforilasa (PNPasa) (Figura 7) (Li y Deutscher, 1996; Söll y RajBhandary, 1995).

2.2.3 Control de calidad en los tRNAs

A pesar del alto grado de exactitud en la síntesis de macromoléculas, un pequeño número de moléculas con secuencia o estructura diferentes a las formas funcionales pueden ser producidas. Estos productos defectuosos pueden ocasionar un problema metabólico al ser acumulados en la célula, por lo que varios mecanismos se han desarrollado para corregirlos o eliminarlos. Estos incluyen la reparación de DNA con secuencias incorrectas o alteradas, la degradación o el

replegamiento de proteínas desnaturalizadas y la degradación de cadenas peptídicas terminadas prematuramente (Krebs et al., 2009).

En el caso de la biosíntesis de RNA, pueden generarse moléculas defectuosas por un número de mecanismos, incluyendo la síntesis de genes mutados, la incorporación de nucleótidos incorrectos, la terminación prematura de la transcripción o a un procesamiento o plegamiento inapropiado (Alberts et al., 2014). Debido a que la acumulación de estos RNAs defectuosos puede interferir con la maquinaria de traducción, resultando en proteínas no funcionales o poco eficientes, se cree que mecanismos de control de calidad del RNA, al igual que en DNA y proteínas, pueden estar presentes en la célula. Sin embargo, es poca la información disponible acerca de los procesos de control de calidad de RNAs, en particular los referentes a RNAs estables. La distinción entre RNA estable (tRNA y rRNA) e inestable (mRNA) se ha considerado una característica importante del metabolismo del RNA bacteriano. El factor principal que diferencia entre ellos es la poliadenilación que promueve la degradación del RNA inestable (Alberts et al., 2014; Elliott y Ladomery, 2016). Sin embargo, se han observado formas poliadeniladas de diversos precursores de RNAs estables, principalmente en cepas deficientes de exoribonucleasas (Campos-Guillen et al., 2005; Campos-Guillén et al., 2010; Deutscher, 2003; Li et al., 1998a). Basados en este antecedente, investigadores de la Universidad de Miami se dieron a la tarea de investigar la presencia de un sistema de control de calidad en *Escherichia coli*, que eliminara RNAs estables y defectuosos usando como modelo un tRNA^{Trp} mutante. Ellos muestran en su trabajo que genes codificantes de tRNA normales y defectuosos, se transcriben con la misma eficiencia para generar precursores de tRNA. Sin embargo, mientras que los precursores de tRNA normal son rápidamente convertidos a su forma madura por las RNasas, la maduración de precursores defectuosos es muy baja. Tales precursores defectuosos son sujetos a poliadenilación (Figura 9), por la enzima poli(A) polimerasa I (PAP 1), la cual sirve como una señal que promueve la degradación de los RNAs, por la enzima

polinucleótido fosforilasa (PNPasa), una exonucleasa activa 3´- 5´. (Andersen et al., 2008; Li et al., 2002). Alternativamente, RNasa R, un homólogo de RNasa II, funciona como la enzima que cataliza la descomposición (Deutscher, 2003).

Recientemente, nuevos mecanismos reguladores del procesamiento del tRNA han sido identificados y relacionados con la poliadenilación de los tRNAs. Investigaciones en *Escherichia coli*, en la cual las enzimas RNasa T y la RNasa PH (exonucleasas involucradas en el paso final de la maduración del extremo 3´), compiten con la poli(A) polimerasa I por sustratos precursores de tRNA (pre-tRNA), donde se agregan colas cortas de poli(A) (Mohanty et al., 2012). Este hecho es evidencia de que la poliadenilación no solo modula la estabilidad de los pre-tRNAs bajo un sistema de control de calidad, sino que también regulan la disponibilidad de tRNA funcionales (Figura 9) (Mohanty y Kushner, 2019).

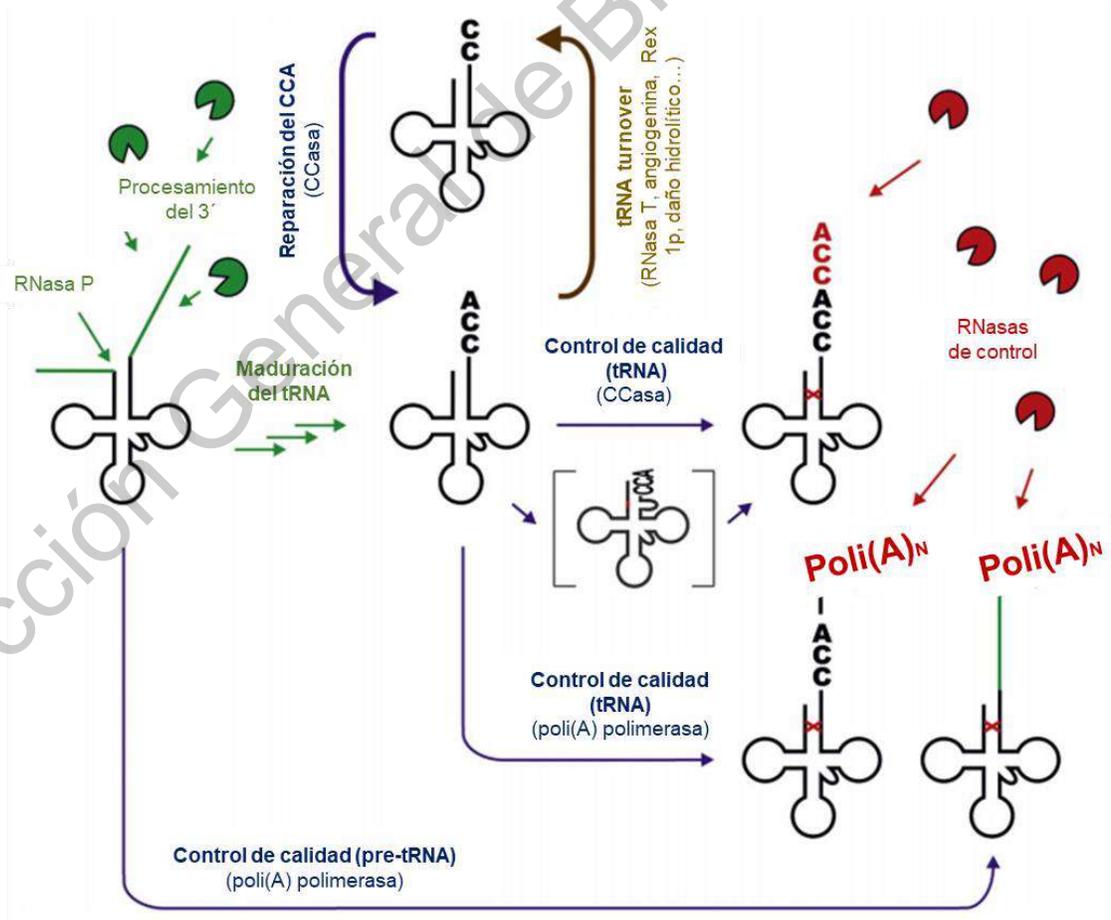


Figura 9. Mecanismos de control de calidad-procesamiento del tRNA. Antes de cumplir su función esencial en la célula, los tRNAs son sintetizados como largos precursores los cuales se someten después a procesos de maduración (color verde). Sin embargo, tanto transcritos primarios como tRNAs maduros son constantemente monitoreados para asegurar su integridad (azul). La adición de etiquetas de degradación en el 3' por CCasa o Poli(A) polimerasa de tRNAs inestables (cruces rojas) para degradación por RNasas de control (rojo). Además, la integridad del CCA es asegurada por la renovación o recambio (*turnover*) del extremo del ARNt (marrón). Tomado y modificado de Wellner et al., 2018.

La integridad del propio tRNA también se controla durante la síntesis de la secuencia CCA. Basado en la cinética de recambio único de la enzima de *Escherichia coli*, se demostró que las mellas en la estructura azúcar-fosfato de un tRNA tienen un impacto dramático en la eficiencia de la adición de CCA. Parece ser que la enzima que agrega el CCA escanea tal estructura en busca de defectos antes de la incorporación de nucleótidos (Dupasquier et al., 2008). En consecuencia, estos tRNAs mellados que carecen de un extremo CCA se degradan. Este mecanismo de corrección controlado cinéticamente asegura que los tRNAs dañados se eliminen del conjunto de tRNAs funcionales y no participen en la traducción (Hou, 2010).

Por otro lado, existe un mecanismo regulador que involucra la remoción y restitución de A de la secuencia CCA terminal de los tRNAs. Dicha restauración del 3'-CCA incompleto es un *check point* crucial para el control de calidad en *Escherichia coli*, donde interviene la enzima RNasa T. Esta enzima bacteriana es una exoribonucleasa no procesiva que pertenece a la superfamilia DEDD (Deutscher y Marlor, 1985; Zuo y Deutscher, 2001). Esta RNasa tiene una preferencia de sustrato muy alta hacia componentes de RNA carentes de residuos de C (Zuo y Deutscher, 2002). Como consecuencia, y similar a la RNasa BN antes mencionada, la RNasa T discrimina eficazmente contra el extremo 3'-CCA y elimina solo el residuo A terminal, lo que da como resultado la obtención de un tRNA que termina en 3'-CC (Figura 9). Además de su participación en la maduración final de los RNA estables

(tRNA, rRNA 5S y rRNA 23S) (Li et al., 1999, 1998b, Li y Deutscher, 1996, 1995), la RNasa T se identificó inicialmente como un actor clave en el recambio (*turnover*) del extremo 3' de los tRNAs. Aquí, el residuo terminal A de los extremos del ARNt-CCA es degradado por la RNasa T y posteriormente restituido por la acción de una enzima que añade CCA (CCasa) (Figura 9) (Deutscher et al., 1985, 1984). Este recambio final induce la función de reparación de la enzima que agrega la secuencia CCA, y que finalmente da como resultado un escrutinio de la integridad estructural del tRNA (Wellner et al., 2018, 2017).

En los últimos años, además de los mecanismos del control de calidad y degradación del tRNA ya conocidos, un nuevo mecanismo fue identificado. En este caso, al igual que en el recambio (*turnover*) del 3'-CCA, la enzima que agrega la secuencia CCA también está relacionada (Kuhn et al., 2015; Wilusz et al., 2011). Además de la incorporación de la secuencia CCA como un paso imprescindible en la maduración del tRNA, se ha demostrado que la enzima que agrega CCA determina el destino de un tRNA inestable mediante la incorporación de un segundo triplete de CCA. Dando como resultado una cola de 3'-CCACCA que se reconoce como una etiqueta de degradación (Figura 9) (Betat y Mörl, 2015; Kuhn, 2016; Wilusz, 2015).

Por otro lado, se sabe que la función principal de la enzima polinucleótido fosforilasa (PNPasa) es la degradación del RNA. Sin embargo, se ha observado que en *Escherichia coli* y humanos tiene la capacidad de unirse a RNA sintético que con ciertos daños por oxidación (8-hidroxiguananina, 8-oxoG), incluso con mayor afinidad que el RNA normal (Hayakawa et al., 2001; Hayakawa y Sekiguchi, 2006). Se ha visto que la PNPasa humana puede disminuir el nivel de 8-oxoG del RNA y en células HeLa es un factor protector bajo estrés oxidativo (Wu y Li, 2008). Estudios en RNA de secuencia natural con daño por oxidación con H₂O₂, también confirman la unión al RNA oxidado con mayor afinidad que el RNA no tratado con la misma secuencia, por lo que las células PNPasa deficientes acumulan 8-oxoG en el RNA celular a una mayor medida que las células de tipo silvestre (Wu et al., 2009). Dichos

resultados sugieren una relación directa de la PNPasa en el reconocimiento y eliminación de RNA con 8-oxoG.

2.2.4 El tRNA de cisteína (tRNA^{Cys}) de *Bacillus subtilis*

El tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis* de la cepa de referencia 168 está codificado por el gen *trnD-Cys*, al igual que otros *Firmicutes* reportados como *Paenibacillus spp.* y *Bacillus cereus s.l.*, es copia única en su genoma (Campos-Guillén et al., 2010; Hernández-Flores et al., 2020; Zhu y Stülke, 2017). Este gen se encuentra inmerso en el operón *trnD*, el cual está constituido por 16 genes para tRNAs (Figura 10). Rio arriba del cluster *trnD*, se encuentra un operón ribosomal (*rrnD*) con los genes para rRNA 16S, 23S y 5S (Cummings and Connerton, 1997; Zhu and Stülke, 2017). El gen *trnD-Cys* tiene una longitud total de 71 pb, rio arriba, se encuentra una secuencia intergénica de cinco pb que separa al gen de tRNA^{Cys} del gen de tRNA^{Gly}; mientras que río abajo, una secuencia de siete pb lo separan del gen para el tRNA^{Leu} (Figura 10).

El procesamiento del tRNA en *Bacillus subtilis* se da por ambas vías endo y exonucleolítica (Pellegrini et al., 2003; Wen et al., 2005). En el caso de los genes de tRNA cuya secuencia CCA está codificada genéticamente, el procesamiento es de tipo exonucleolítico, llevado a cabo principalmente por la RNasa PH (Wen et al., 2005). Mientras que en el 30 % de los genes de tRNA en *Bacillus subtilis*, donde el CCA está ausente (incluido el tRNA^{Cys}), la maduración del extremo 3' es llevada a cabo por la endoribonucleasa RNasa Z (Figura 11 A) (Pellegrini et al., 2003), y el procesamiento del 5' está a cargo de la enzima universal RNasa P (Vold y Green, 1988). El requerimiento del 3'-CCA terminal es resuelto por la acción de la enzima CCasa (Bralley et al., 2005; Raynal et al., 1998). Sin embargo, en un estudio reciente se sugiere que otras enzimas distintas de la CCasa pueden participar en la adición de la secuencia CCA en el extremo 3' del tRNA^{Cys} inmaduro, donde tanto

rutas endo como exonucleolíticas pueden estar participando (Figura 11) (Campos-Guillén et al., 2019). El transcrito primario del tRNA^{Cys} tiene un tamaño de 71 bases, cuando la secuencia CCA es adicionada, el tamaño total del tRNA^{Cys} maduro es de 74 bases.

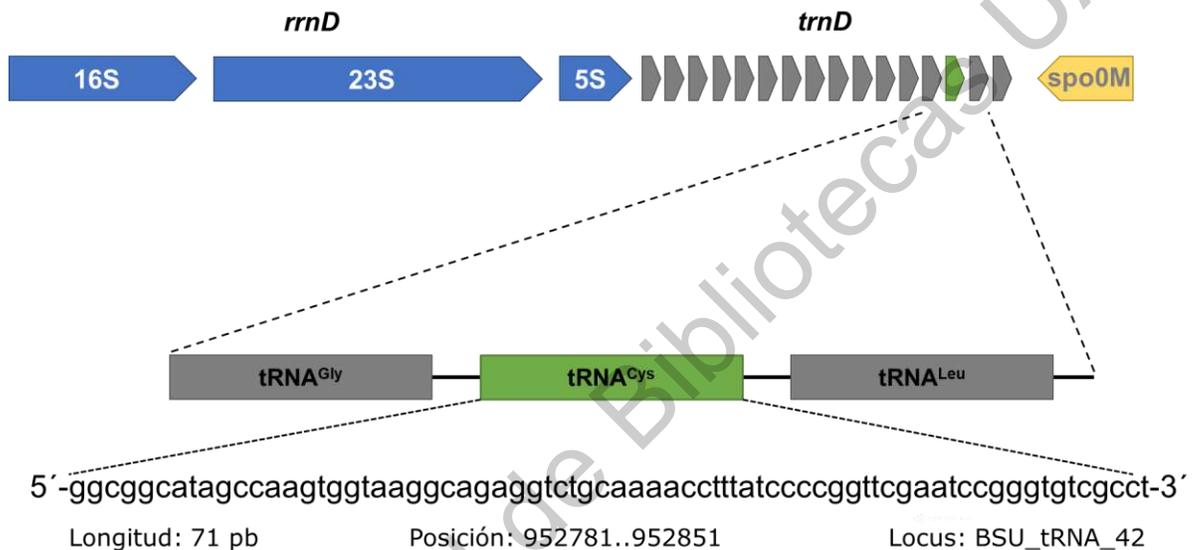


Figura 10. Ubicación del gen tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis*. El gen de tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis* 168 tiene 71 pb de longitud, está ubicado dentro de un *cluster* de 16 genes para tRNAs (*trnD*). Este grupo de genes a su vez está relacionado con el operón *rrnD*, el cual está compuesto por los genes ribosomales 16S, 23S y 5S rio arriba (datos obtenidos de KEGG genome data base y SubtiWiki).

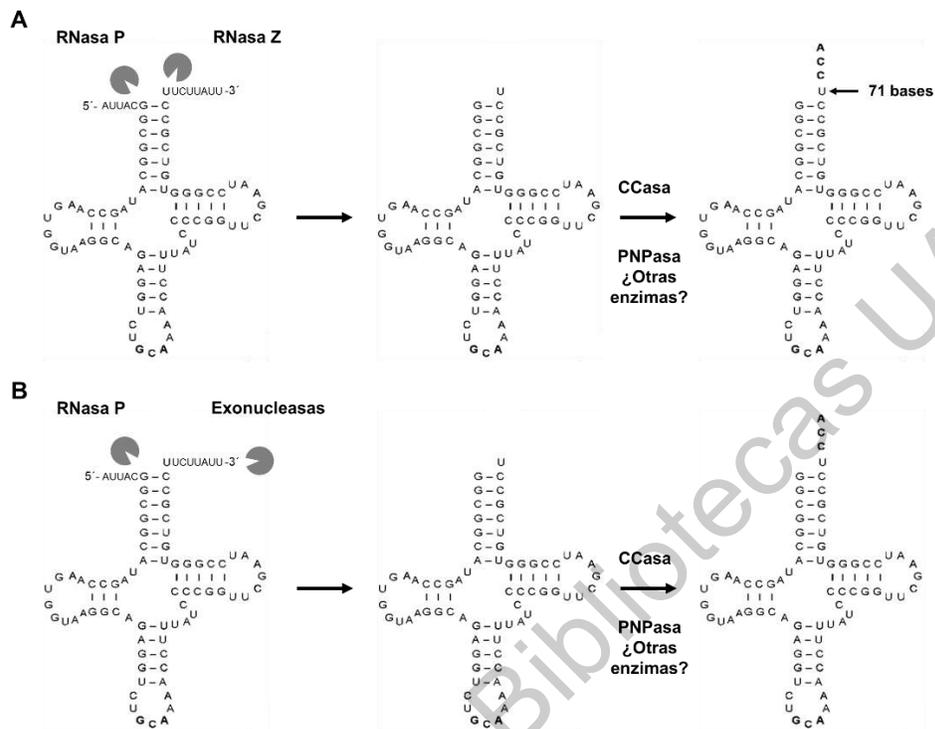


Figura 11. Vías de procesamiento del tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis*. Se presenta el modelo de maduración del extremo 3' del tRNA^{Cys}. En A, la RNasa Z escinde el extremo 3' del tRNA^{Cys} y la RNasa P escinde el extremo 5' de tRNA^{Cys}. Después, la secuencia CCA es agregada por la CCasa, PNPasa u otras enzimas no identificadas. En B, la RNasa P escinde el extremo 5' del tRNA^{Cys} y del tRNA^{Leu} río abajo, generando así una extensión en el 3' para el tRNA^{Cys}. Luego, la extensión 3' es degradada por exonucleasas, seguido de la maduración o reparación por CCasa, PNPasa u otras enzimas.

Como se vio en el apartado anterior, las moléculas de tRNA deficientes son degradadas rápidamente bajo un sistema de control de calidad. Se sabe que en *Escherichia coli* la poliadenilación por la enzima poli(A) polimerasa y la actividad de la PNPasa promueven la degradación de moléculas de tRNA^{Trp} deficientes (Li et al., 2002). Mientras que en *Bacillus subtilis* no existe un homólogo de la poli(A) polimerasa (PAP I) que sea identificable (Campos-Guillen et al., 2005; Condon,

2003). En este sentido se ha sugerido que la PNPasa es la enzima principal responsable de la síntesis de la cola de poli(A) en los cloroplastos, que también carecen de un homólogo de PAP I (Yehudai-Resheff et al., 2001). Ya que PNPasa parece funcionar como una exonucleasa 3'-5' y, en la reacción inversa, una poli(A) polimerasa en *Escherichia coli*, dependiendo de la disponibilidad de fosfato y ribonucleósidos difosfatados (Mohanty y Kushner, 2000), pero en *Bacillus subtilis* no estaba claro si se trataba de la misma actividad (Condon, 2003). Sin embargo, ahora se sabe que la PNPasa de *Bacillus subtilis* no es la principal enzima responsable de la adición de nucleótidos a los extremos 3' del RNA (Campos-Guillén et al., 2005). Campos-Guillén et al., observaron que la desintegración de las moléculas de tRNA^{Cys} se produce mediante la adición de colas poli(A) o heteropoliméricas y sugirieron una exonucleasa implicada en el control de calidad del tRNA^{Cys}, la RNasa R (Campos-Guillén et al., 2010). La RNasa R degrada el RNA de manera procesiva (es decir, la enzima no libera su sustrato entre ciclos hidrolíticos) a di o trinucleótidos (Cheng y Deutscher, 2002). Se piensa que el sustrato principal de esta enzima es el rRNA, ya que tiene un éxito significativamente mayor en la degradación de RNAs altamente estructurados (Condon, 2003).

2.3 Factores que afectan el procesamiento del tRNA y su función

Como ya se mencionó anteriormente, los tRNAs cumplen la función esencial de proveer aminoácidos a la maquinaria de síntesis de proteínas. Para poder funcionar como una molécula adaptadora durante la traducción, el isoceptor del tRNA se carga con un aminoácido afín para dar lugar a aminoacil-tRNA e interactuar con el ribosoma (Alberts et al., 2014; Elliott and Lodomery, 2016; Krebs et al., 2009). Pero, como ya se vio antes, la función esencial de traducir el código genético va más allá, los tRNAs también funcionan en otros procesos biológicos. Por lo tanto, los tRNAs tienen funciones emergentes en la traducción adaptativa, la dinámica de

señalización y la regulación de los procesos biológicos 7-8 (Hopper, 2013; Kirchner e Ignatova, 2015; Raina e Ibba, 2014).

Como se explicó en el apartado anterior, la biogénesis del tRNA implica una gran cantidad de pasos, muchos de los cuales están conservados en todos los organismos. Los pre-tRNAs se someten a un elaborado conjunto de pasos postranscripcionales para generar tRNAs maduros. Estos pasos incluyen el procesamiento de los extremos 5' y 3', adición de nucleótidos en el 3', eliminación de intrones por *splicing* (en el caso de los sistemas eucariotas), modificaciones de nucleótidos, entre otros (Abelson et al., 1998; Trotta y Abelson, 1999). Además de la regulación en cada paso de la biogénesis, las células también utilizan diversos mecanismos de control de calidad para evitar el uso de sustratos incorrectos en la síntesis de proteínas (Hopper, 2013).

2.3.1 Diversos tipos de estrés inducen la fragmentación del tRNA

Se ha visto que el procesamiento del extremo 3' de tRNAs puede ser regulado por estrés. Estudios recientes han sugerido que en la levadura, el procesamiento del 3' de pre-tRNAs esta específicamente regulado por las condiciones de crecimiento. A través de análisis de *Northern Blot* y secuenciación de RNA se ha observado que después de aumentos de temperatura y/o al medio que contiene glicerol, los pre-tRNAs defectuosos se acumulan en la célula. Bajo estrés por calor, se han detectado niveles altos de tRNA^{Tyr} con la terminación 3' extendida y la 5' procesada, lo que sugiere que existe inhibición de la maduración del 3'. Es posible entonces que las enzimas de procesamiento 3' estén reguladas por las condiciones de crecimiento celular para influir en el procesamiento 3' de los pre-tRNA o que los niveles y la estabilidad de los pre-tRNA se alteren con el estrés (Foretek et al., 2016).

También se ha visto que los fragmentos derivados del tRNA producidos por diversas condiciones de estrés pueden funcionar como reguladores de los procesos celulares (Keam y Hutvagner, 2015). Los tRNAs se pueden fragmentar, y es un evento que sucede en los tres dominios de la vida, el cual se puede producir durante condiciones de estrés (Anderson e Ivanov, 2014; Keam y Hutvagner, 2015; Kirchner e Ignatova, 2015; Masaki y Ogawa, 2002; Thompson et al., 2008; Thompson y Parker, 2009a). También, la base datos tRFdb revela 552, 559, 433, 320 y 649 secuencias de fragmentos derivados de tRNAs de humanos, ratón, *Drosophila*, la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y *Caenorhabditis elegans* respectivamente (Kumar et al., 2015). Los RNAs no codificantes (ncRNA) derivados de tRNAs se pueden clasificar en dos grupos principales: mitades de tRNA (tRNA halves) y fragmentos derivados de tRNA (tRFs) (Lee et al., 2009; Raina e Ibbá, 2014; Thompson et al., 2008). Sin embargo, recientemente se ha identificado una nueva categoría, los fragmentos internos derivados de tRNA (i-tRF) (Figura 12) (Loher et al., 2017; Telonis et al., 2015).

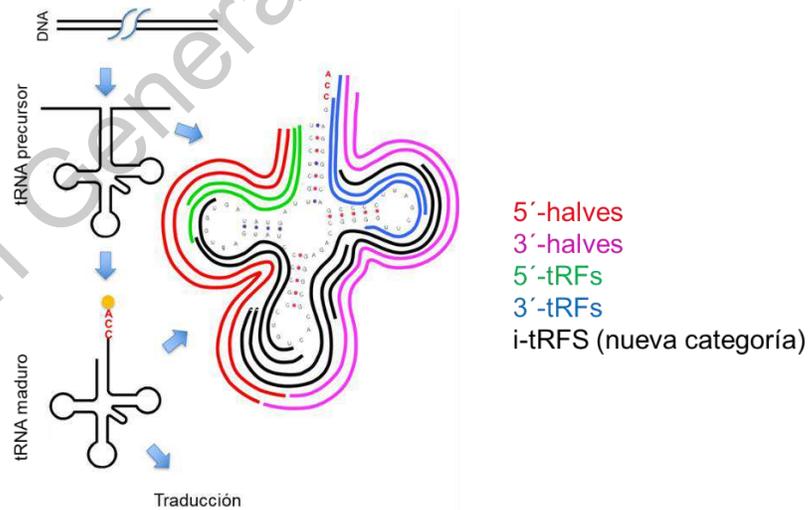


Figura 12. Categorías estructurales de los fragmentos de tRNA. La representación esquemática muestra los cinco posibles fragmentos alineados a una estructura secundaria de un tRNA. El fragmento a la mitad del tRNA, del anticodón hacia el 5´

(5'-tRH, en rojo), tiene una longitud de ~30-35 nt y surgen del tRNA maduro a través de la escisión en el anticodón por la endonucleasa angiogenina. Del anticodón hacia el 3' (3'-tRH, en magenta), es la mitad remanente, la segunda mitad. Los 5'-tRFs (en verde), son derivados de un tRNA maduro después del corte en el *loop* D hacia el extremo 5'. El 3'-tRF (en azul), derivado también de un tRNA maduro del *loop* T o después del anticodón hacia el extremo 3'. Los fragmentos internos (i-tRF, en negro), están completamente contenidos dentro del intervalo del tRNA maduro. Tomado y modificado de Loher et al., 2017.

Las mitades de tRNA, que se componen de 30-35 nucleótidos derivados de la parte 5' o 3' de tRNA maduros, se generan bajo diversas condiciones de estrés (Honda, 2015; Ivanov et al., 2011; Yamasaki et al., 2009). Cuando los tRNAs de vertebrados se exponen a estrés oxidativo, choque térmico y radiación UV, la angiogenina, un miembro de la familia de la RNasa A, se activa y escinde endonucleolíticamente los tRNAs maduros (Fu et al., 2009; Su et al., 2019). La angiogenina puede hacer un corte en la terminación 3'-CCA y posteriormente escindir en el *loop* anticodón, generando mitades de tRNA 5' y 3' (Czech et al., 2013).

Estudios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, han identificado la enzima Rny1, un miembro de la RNasa T2, la cual es responsable de la generación de mitades de tRNA (Keam y Hutvagner, 2015; Thompson y Parker, 2009b). La escisión de especies de tRNA de levadura se produce en respuesta al estrés oxidativo, la falta de metionina, el crecimiento prolongado y el calor, pero no en las células que sufren estrés por radiación UV y falta de glucosa (Thompson et al., 2008). En condiciones normales, Rny1 se localiza en la vacuola. En consecuencia a la exposición al estrés oxidativo, se cree que Rny1 se libera en el citoplasma, lo que proporciona un mecanismo por el cual podría acceder a los tRNAs para la escisión (Thompson y Parker, 2009b). En bacterias por su parte, se ha demostrado

que las nucleasas anticodón de tRNA como PrrC, colicina D y colicina E5 escinden subconjuntos específicos de tRNA (Kaufmann, 2000; Masaki y Ogawa, 2002).

La función de las mitades de tRNA aún es poco conocida. Ciertas mitades de tRNA inhiben el inicio de la traducción (Ivanov et al., 2011). Las mitades de tRNA pueden inhibir adicionalmente la apoptosis inducida por estrés al unirse al citocromo c, protegiendo así a las células de la apoptosis durante el estrés osmótico (Saikia et al., 2014a).

Los tRNAs se pueden escindir en otras posiciones y generar un conjunto diverso de fragmentos adicionales derivados de tRNA. Los tRFs son más cortos que las mitades del tRNA, con una longitud de 13 a 32 nt (Figura 12). En muchos organismos se pueden producir varios ncRNA derivados de tRNA a partir de tRNA maduro o sus precursores. La angiogenina y otros miembros de la familia de RNasa A se han implicado en la generación de 3'-tRF. Los fragmentos internos (i-tRF) se derivan de una combinación de escisiones en el *loop* anticodón y en brazo D o en el brazo T (Telonis et al., 2015).

Estudios en *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana* encontraron que cuatro nucleósidos de tRNA se modifican con metilación (Am, Cm, m¹ A y m⁷ G) como una respuesta al estrés ambiental como son: sequía, estrés por sal y bajas temperaturas. Cuyos genes relacionados codifican para enzimas metiltransferasas (MTasas) (Wang et al., 2017).

2.3.2 Estrés osmótico

El estrés osmótico es una alteración fisiológica causada por un cambio repentino en la concentración de soluto alrededor de una célula, lo que provoca un cambio rápido en el movimiento del agua a través de su membrana celular (Finan y Guilak, 2010; Kültz, 2007). El estrés osmótico ha sido estudiado fuertemente en plantas (Upadhyaya et al., 2013; Xiong y Zhu, 2002; Yang y Guo, 2018; Zhu, 2002;

Zhu et al., 1997). Sin embargo, faltan estudios que involucren a los tRNAs. Por otra parte, en células de vertebrados, se conoce que la angiogenina participa en la fragmentación de tRNAs como un mecanismo de respuesta a este tipo de estrés (Saikia et al., 2012). A través de múltiples análisis *in vitro* en fibroblastos embrionarios de ratón hiperosmóticamente estresados, se ha observado que las mitades de tRNA escindido por angiogenina interactúan con el citocromo *c*, lo que protege a las células de la apoptosis durante el estrés hiperosmótico a través de la represión de la caspasa (Mei et al., 2010; Saikia et al., 2014b).

Saccharomyces cerevisiae bajo condiciones de estrés osmótico, altera su abundancia de tRNAs para regular selectivamente la síntesis de proteínas (Torrent et al., 2018). En bacterias apenas se comienza a conocer el efecto del estrés osmótico a nivel de tRNAs. Cuando las condiciones ambientales desfavorables afectan el crecimiento celular, las bacterias formadoras de endosporas, como *Bacillus subtilis*, activan y coordinan un programa molecular temporal para ensamblar una endospora inactiva, que secuestra biomoléculas esenciales para su posterior conversión nuevamente en células en crecimiento (Eijlander et al., 2014; Higgins y Dworkin, 2012; Horsburgh et al., 2001; Khanna et al., 2020; Tan y Ramamurthi, 2014). La esporulación en *Bacillus subtilis* ha demostrado ser un sistema modelo eficiente para el estudio de las principales biomoléculas que se almacenan y protegen durante la latencia de las endosporas. El análisis de proteomas ha revelado varias categorías de proteínas que se almacenan en las endosporas inactivas de *Bacillus subtilis*, incluidas las proteínas involucradas en la biogénesis de los ribosomas, el metabolismo del carbono, el procesamiento del RNA y la síntesis de proteínas. Estos grupos de proteínas juegan un papel importante en la germinación y crecimiento de las esporas (Swarge et al., 2020).

Además, las endosporas inactivas almacenan RNA, lo que sugiere que desempeñan funciones específicas durante la inactividad o la germinación y el crecimiento o se utilizan como reservorios de ribonucleótidos para la síntesis de RNA *de novo* durante la germinación de las esporas. Algunos de los RNAs son

transcritos involucrados en el proceso de formación de endosporas, como los que codifican proteínas de membrana, transportadores, enzimas de procesamiento de RNA y proteínas involucradas en la síntesis, modificación y degradación de proteínas (Bassi et al., 2016; Keijser et al., 2007; Nagler et al., 2016b; Segev et al., 2012).

Entre estas categorías de RNA, el tRNA se ha detectado en cantidades significativas en esporas inactivas y representa un reservorio esencial (Nagler et al., 2016b). Sin embargo, el procesamiento del tRNA no se ha estudiado bien durante la germinación y el crecimiento de las endosporas. La comprensión de esos mecanismos será esencial para el estudio de la supervivencia al estrés y el posible papel de los tRNAs almacenados en la generación de células vegetativas (Deutscher, 2006; Mohanty y Kushner, 2000).

2.3.3 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso de alteración celular causado por la producción de radicales libres en el metabolismo aerobio. El concepto de estrés oxidativo puede definirse como “un desbalance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, dando lugar a una alteración del control y la señalización redox y/o daño molecular” (Sies, 2015). Generalmente, estos radicales libres constan de moléculas pequeñas llamadas especies reactivas de oxígeno (Lushchak, 2014; Sies et al., 2017). Estas moléculas presentan un arreglo de electrones desapareado en el orbital externo, dando por resultado una configuración que genera una alta inestabilidad. Estas propiedades hacen que los radicales libres se combinen con la mayoría de los componentes celulares como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos y sus diferentes derivaciones provocando diversas alteraciones y apoptosis o también muerte celular por necrosis (Hrycay y Bandiera, 2015).

Entre las principales especies reactivas de oxígeno se incluyen las siguientes: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), no radical peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (O_2) (Lushchak, 2014; Sies et al., 2017). Estas especies son producidas principalmente de manera endógena por la propia célula a través de procesos metabólicos vitales para el crecimiento y desarrollo de las células, pero también se introducen o generan al exponerse a sustancias peligrosas que se encuentran en el ambiente (Cabiscol et al., 2000). Estas moléculas reactivas están involucradas en cadenas de reacciones de radicales libres que descomponen biomoléculas, causan poliinsaturaciones en lípidos de membrana (peroxidación lipídica), depolimerización en ácidos nucleicos, y oxidación en proteínas (Imlay, 2013; Sobrino-Plata et al., 2014; Sytar et al., 2013).

Poco tiempo después de haberse descubierto las especies reactivas de oxígeno, creció el interés por entender los mecanismos por los cuales se producían. Actualmente se conoce que el 90 % de estas especies reactivas de oxígeno son generadas en las mitocondrias de las células eucariotas a través de procesos como la cadena de transporte de electrones. En procariotas este proceso tiene lugar en la membrana citoplasmática (Cabiscol et al., 2000). Los electrones que se liberan de este proceso celular pueden interactuar con O_2 para dar lugar a $O_2^{\cdot-}$, después por reacciones espontáneas o enzimáticas es convertido a H_2O_2 y OH^{\cdot} (Lushchak, 2014). Se ha observado que la producción de especies reactivas de oxígeno está poco controlada por la célula y, por lo tanto, es necesario el uso de un sistema antioxidante eficiente. Otra fuente de especies reactivas de oxígeno está en el retículo endoplásmico, en este organelo celular se llevan a cabo reacciones de hidroxilación por parte de las enzimas de la familia de los citocromos P450 (Hrycay y Bandiera, 2015).

Para contrarrestar el estrés oxidativo, las bacterias han desarrollado diversos sistemas antioxidantes, como el sistema *OxyR* y los sistemas *SoxRS* en *Escherichia coli*, para activar la transcripción de una serie de enzimas que incluyen superóxido dismutasas (Dowds, 1994; Imlay, 2013). Sin embargo, se ha visto que

la expresión de los genes de respuesta al estrés requiere 10 minutos para alcanzar los niveles máximos de producción, y la traducción de proteínas requiere tiempo adicional para la síntesis que tarda entre 20 y 30 minutos en surtir efecto en bacterias y 45 minutos en levaduras (Jozefczuk et al., 2010; Lackner et al., 2012). Por lo tanto, las células necesitan un mecanismo o mecanismos alternativos para responder a las tensiones ambientales en cuestión de minutos, es decir, a nivel de traducción (de Nadal et al., 2011).

2.3.3.1 Los tRNAs medían la adaptación al estrés regulando la expresión génica y traducción

La regulación de la traducción bajo estrés oxidativo se ha estudiado mayormente en células eucariotas. Los primeros estudios sugirieron que la traducción se inhibe globalmente en cinco minutos en las células de *Saccharomyces cerevisiae* (Shenton et al., 2006). Este proceso está mediado por escisión específica de tRNA y rRNA (Thompson et al., 2008; Yamasaki et al., 2009). El mismo fenómeno también se ha observado en líneas celulares de mamíferos (Czech et al., 2013; Fu et al., 2009; Saikia et al., 2012). La escisión de los tRNAs promueve la formación de pequeños fragmentos de RNA que pueden causar represión el inicio de la síntesis de proteínas y pueden regular funciones celulares, como la proliferación celular (Ivanov et al., 2011; Lee et al., 2009). Sin embargo, en algunos estudios se ha observado que una fracción considerable de genes se traduce más activamente bajo condiciones de estrés oxidativo en eucariotas. En *Schizosaccharomyces pombe*, 26 genes fueron sobre expresados en 15 minutos, y 191 genes fueron también sobre expresados en 60 minutos (Lackner et al., 2012). Un análisis del transcriptoma y proteoma en *Saccharomyces cerevisiae* reveló que >80 % de las proteínas divergían de sus perfiles de expresión de mRNA, lo que sugiere un mecanismo de control de la traducción de manera general que implica tanto la regulación positiva como la

regulación negativa. Aproximadamente el 25 % de las proteínas fueron reguladas positivamente con sus niveles de expresión de mRNA casi sin cambios (Vogel et al., 2011).

La decodificación de la información genética en el mRNA durante la síntesis de proteínas se basa únicamente en adaptadores de tRNA, cuya abundancia puede afectar la velocidad de decodificación y la eficiencia de la traducción. Un trabajo reciente en la levadura reveló que bajo estrés las células alteran la abundancia de tRNA para regular selectivamente la expresión de proteínas. A través de la cuantificación de los cambios en la abundancia de tRNAs individuales en diferentes tiempos y en respuesta a diversas condiciones de estrés (diáuxico, oxidativo, osmótico y por choque térmico), se observó que el conjunto de tRNA era dinámico y reorganizado, de tal manera que favorecía la traducción selectiva de transcritos relacionados con la respuesta a estrés. Esta evidencia demuestra que los cambios en la abundancia de tRNA afectan la expresión de proteínas independientemente de factores como la abundancia de mRNA, entre otros (Torrent et al., 2018).

En eucariotas superiores, algunos de los fragmentos de tRNA derivados de tRNAs asociados con proteínas específicas de la familia argonauta, tienen funciones emergentes en la regulación de la expresión génica como RNAs reguladores (Maute et al., 2013; Zamudio et al., 2014). El 5'-tRF inducido por estrés derivado del tRNA^{Val} en la arquea *Haloferox volcanii*, puede unirse directamente a las subunidades pequeñas de ribosomas y, por lo tanto, se piensa que el tRF probablemente ajusta la tasa de síntesis de proteínas para regular la expresión génica en condiciones de estrés (Gebetsberger et al., 2012). En la calabaza (*Cucurbita maxima*), se ha visto que los fragmentos de tRNA que se encuentran en la savia del floema pueden inhibir eficazmente la traducción de manera inespecífica *in vitro*, lo que indica que estos fragmentos de tRNA pueden interferir con la actividad ribosómica (Zhang et al., 2009). Por lo tanto, la acumulación de datos implica que los fragmentos son moléculas de señalización que modulan la traducción. Además, se sabe que un tRF derivado de la secuencia remolque 3' (3'

trailer) del pre-tRNA^{Ser}_{UGA} humano, promueve la proliferación celular (Lee et al., 2009), lo que sugiere que algunos fragmentos de tRNA pueden funcionar más allá de la traducción.

Datos en células de vertebrados han demostrado que tras el estrés oxidativo, la secuencia 3'-CCA es eliminada por la endonucleasa angiogenina, lo que lleva a la represión de la síntesis de proteínas. Cuando el estrés desaparece, la nucleotidil transferasa restaura la secuencia CCA, lo que permite que se vuelva a normalizar el proceso de aminoacilación y traducción (Czech et al., 2013). Por lo tanto, la inactivación de la secuencia CCA del tRNA induce una regulación rápida y reversible de la represión de la traducción bajo estrés (Wellner et al., 2018).

Por el contrario, se sabe poco sobre la regulación de la traducción en respuesta al estrés oxidativo en procariontes, aunque los datos disponibles han proporcionado información que sugiere que esta respuesta difiere sustancialmente de la de los eucariotes. A través del análisis del proteoma de cepas de *Escherichia coli* en 2015, se descubrió que la síntesis de proteínas se ralentiza intensamente bajo estrés oxidativo. Con el inicio de la traducción sin cambios, se determinó que esta desaceleración fue causada por una menor velocidad de elongación del proceso de traducción. Además, se observó por primera vez que las bacterias responden al estrés oxidativo ajustando el sistema de traducción de una manera diferente a la de los eucariotes. Las bacterias degradan de forma inespecífica e irreversible los tRNAs para bloquear la síntesis de proteínas. Después la elevación de los niveles de tRNAs aceleró la traducción protegiendo así a la célula contra el estrés oxidativo. Así que, en bacterias existen mecanismos de regulación tRNAs más simples, ya que como se vio antes, en eucariotes los tRNAs se pueden regresar al núcleo y escindir en mitades, o la terminación 3'-CCA se puede digerir de forma reversible para bloquear la traducción. Por el contrario, las bacterias degradan los tRNAs rápidamente, sin la acumulación de fragmentos o tRNAs que carecen de CCA (Zhong et al., 2015).

2.3.4 La exposición a mercurio causa estrés oxidativo

Los organismos vivos cuentan con sistemas que regulan el mantenimiento de niveles bajos de especies de oxígeno. Sin embargo, bajo ciertas condiciones este equilibrio se puede romper y generar estrés oxidativo. El incremento de compuestos endógenos o exógenos que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno, la disminución de las reservas de antioxidantes de bajo peso molecular, la inactivación de enzimas antioxidantes son las principales causas (Lushchak, 2014).

Actualmente se sabe que los metales pesados juegan un papel importante en la generación de estrés oxidativo, ya que principalmente bloquean los sistemas antioxidantes generando una alta concentración de especies reactivas de oxígeno en la célula (Jaishankar et al., 2014; Sytar et al., 2013).

2.3.5 Absorción de mercurio en los organismos vivos

Desde el punto de vista médico y ambiental, el mercurio es considerado como uno de los metales pesados más tóxicos debido a su capacidad de volatilización, persistencia y bioacumulación. En este sentido, se conocen especies químicas de mercurio que pueden ser bioacumuladas por plantas, animales y microorganismos (Li et al., 2018; Mahbub et al., 2017; Zhou et al., 2015). Un proceso clave en el inicio de la acumulación de mercurio es la absorción por parte de bacterias sulfato-reductoras donde se lleva a cabo su metilación (Mahbub et al., 2017).

En altas concentraciones, el mercurio (Hg^{2+}) entra a la célula por medio de transportadores catiónicos, que son proteínas de membrana, por lo general es utilizada la proteína de transporte MerT (*membrane mercury transport protein*). Este transportador se encuentra en Gram positivos y Gram negativos, este transportador

forma parte del operón *mer* donde se encuentran los genes que confieren resistencia a mercurio en bacterias (Barkay et al., 2003). Por otra parte, a concentraciones bajas entra por difusión a través de la membrana celular realizado por complejos de mercurio liposolubles. El HgCl_2 presenta un K_{ow} de 3.3 por lo que es soluble en octanol, en este sentido, este complejo se difunde rápidamente en la bicapa lipídica de la membrana celular. Sin embargo, otros complejos de mercurio como el $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ($K_{ow}=0.5$) difunden muy lentamente (Morel et al., 1998).

La absorción de especies orgánicas como el CH_3HgCl también se lleva a cabo mediante difusión a través de la membrana de las bacterias, cuya solubilidad lipídica es similar a la de HgCl_2 ($K_{ow}=1.7$) (Morel et al., 1998). Este es el primer paso para dar lugar a la bioacumulación de mercurio en las cadenas tróficas. En este caso, el MeHg muestra gran capacidad de almacenamiento en los tejidos adiposos, riñón y sistema nervioso de organismos superiores como peces y el humano (Bank et al., 2007; Li et al., 2018). En ambientes marinos la bioacumulación de metilmercurio representa un problema de salud, ya que los grandes depredadores pueden tener concentraciones hasta 100,000 veces más altas que el medio circundante (Genchi et al., 2017). Especies químicas como $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ y Hg^0 también difunden rápidamente en la célula, pero a diferencia del CH_3HgCl , no se biomagnifican (Morel et al., 1998).

2.3.6 Alteraciones fisiológicas causadas por mercurio

Gran diversidad de alteraciones fisiopatológicas están íntimamente relacionadas con la toxicidad que provoca el mercurio en los organismos vivos. Se sabe que el metilmercurio en exposiciones agudas es neurotóxico (Mela et al., 2012), está relacionado con daño cerebral, disfunción del sistema nervioso central (SNC), pérdida de memoria, enfermedades del corazón, daño en el hígado (Genchi et al., 2017; Houston, 2014). Por otra parte, una exposición crónica a mercurio en forma de vapor puede provocar enfermedades respiratorias, eritrismo, defectos del

SNC incluyendo Alzheimer y Parkinson. En etapa de desarrollo fetal también puede ser causa de daño neurológico, problemas del comportamiento y autismo entre otros (Mahbub et al., 2017; Rice et al., 2014).

A través de años de investigación acerca de la toxicidad de los compuestos de mercurio, se ha encontrado una estrecha relación entre la exposición crónica a mercurio y la inducción de estrés oxidativo. Experimentos con peces han demostrado fuerte evidencia de que el mercurio tiene especial afinidad con los tejidos del cerebro y del sistema nervioso en general y que además, causa estrés oxidativo (Berntssen et al., 2003; Mieiro et al., 2011). También se sabe que los metales pesados pueden causar estrés oxidativo en plantas afectando el crecimiento de la raíz y brotes. En este caso, el mercurio (y otros metales pesados como Cd, Ni y As) inducen la producción de especies reactivas de oxígeno que generan daño celular (Mahbub et al., 2017; Valko et al., 2005).

Estudios en plantas acuáticas han mostrado una correlación positiva entre la concentración de mercurio y los niveles de actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, y peroxidasa antioxidativa, todas ellas implicadas en procesos antioxidantes propios de las células (Malar et al., 2014). En *Caenorhabditis elegans* se ha observado que el mercurio tiene la capacidad de provocar alteraciones en el DNA y causar mal funcionamiento de los procesos mitocondriales (Wyatt et al., 2017) además de inducir pérdida de funcionalidad de enzimas provocando efectos en los procesos metabólicos de los organismos (Ynalvez et al., 2016).

Por otra parte, existe evidencia de que especies de mercurio como CH_3Hg^+ y Hg^{2+} presentan una gran afinidad a grupos tiol (-SH), esta interacción representa una parte del mecanismo de toxicidad potencial del mercurio y sus compuestos. Múltiples formas de mercurio pueden atacar grupos tiol de proteínas o membranas donde la función se ve reducida o bloqueada, además del agotamiento de glutatión (Allocati et al., 2009; Bjørklund et al., 2017; Valko et al., 2005).

Si bien, múltiples son los efectos negativos del mercurio y demás metales pesados en las células, también existen mecanismos de resistencia tales como bombas de expulsión, quelación, y biotransformación a especies químicas con menor toxicidad, entre otros (Figueiredo et al., 2014; Jarosławiecka y Piotrowska-Seget, 2014). Estos mecanismos de resistencia han sido investigados intensamente en bacterias o su eliminación a través de metaloproteínas, se conoce, por ejemplo, que la síntesis de proteínas y RNA es inhibida por HgCl_2 (Dixit et al., 2004). Reportes hechos con microscopia de inmunofluorescencia indican que HgCl_2 bloquea la síntesis de rRNA por la RNA Pol I, mientras que la actividad de la Pol II no cambia. En células HeLa han mostrado que la síntesis de DNA y RNA por Pol I y Pol II es inhibida con metilmercurio (Chen y Mikecz, 2000). En *Sulfolobus solfataricus*, una bacteria hipertermófila, la toxicidad ocasionada por mercurio es debida en parte por la inhibición del factor de transcripción TFB-1 bloqueando instantáneamente la división celular, provocando una respuesta citostática a concentraciones submicromolares y una respuesta citocida a concentraciones micromolares (Dixit et al., 2004).

Aunque muchos genes y vías regulatorias afectadas por metales pesados han sido identificados, en el caso de mercurio ya se está conociendo su efecto a nivel de genes de tRNA (Cruz-Hernández et al., 2013). Es importante entender de manera global las redes de regulación del metabolismo del tRNA en condiciones de estrés oxidativo y generar perfiles de moléculas de tRNAs maduras o fragmentos en estas condiciones.

2.4 Estrés oxidativo en *Bacillus subtilis*

Desde hace años se han identificado diversos mecanismos de defensa bacteriana contra las especies reactivas de oxígeno, donde se incluyen enzimas depuradoras como la superóxido dismutasa (SOD, convierte O_2^- en H_2O_2), catalasa (convierte H_2O_2 en H_2O y O_2), glutatión peroxidasa y DT-diaforasa. Además de las

enzimas, las moléculas pequeñas como el ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión, β -caroteno y ácido úrico también presentan actividad antioxidante. Las defensas secundarias incluyen sistemas de reparación del DNA y enzimas proteolíticas y lipolíticas (Demple y Harrison, 1994; Dowds, 1994; Ezraty et al., 2017; Imlay, 2013). Desde antes de los años 90's se identificó el sistema SOB en *Bacillus subtilis*, el cual es activado bajo la exposición a radiación UV y otros agentes que causan daño al DNA. Este sistema es un conjunto de genes coordinados y controlados, cuya función es la regulación de respuestas al estrés (Bol y Yasbin, 1990). Sin embargo, la investigación más reciente acerca del efecto de estrés oxidativo (y otros tipos de estrés) en *Bacillus subtilis*, va encaminada al análisis de la expresión genética global, tanto para identificar nuevos sistemas de defensa como para observar el efecto del estrés en toda la célula.

La alteración de la expresión génica inducida por estrés son importantes para la protección adquirida que permitirá que las células preprogramadas prosperen en presencia de un factor de estrés letal adicional. La mayoría de las tensiones ambientales, como el choque osmótico y los cambios de temperatura, pueden causar cebado y tienen el mayor efecto protector contra el estrés oxidativo (Andrade-Linares et al., 2016). Por lo tanto, los mecanismos de supervivencia bacteriana conservados evolutivamente, la expresión génica inducida por estrés ambiental y las proteínas involucradas en estos procesos podrían tener un significado biológico más amplio que el reconocido anteriormente.

Actualmente se sabe que *Bacillus subtilis* utiliza múltiples factores sigma (σ) para hacer frente a los cambios en su entorno (Haldenwang, 1995). Algunos factores sigma están dedicados a condiciones de estrés específicos, pero el factor sigma del estrés general, SigB (σ^B), es responsable de la adaptación al tipo más amplio de condiciones ambientales y, por lo tanto, es una proteína importante durante el cebado (Hecker et al., 2007). Las condiciones ambientales incluyen cambios bruscos de temperaturas, cambios de pH, estrés osmótico y cambios en las fuentes de carbono, niveles de ATP y estrés oxidativo (Höper et al., 2005; Völker

et al., 1999). Se ha visto, por ejemplo, que la activación de SigB conduce a la expresión diferencial de 196 genes con diversas funciones bioquímicas que confieren a las células resistencia a múltiples tipos de estrés (Nannapaneni et al., 2012; Reder et al., 2012).

En un análisis exhaustivo de 94 genes dependientes de SigB individuales, se demostró una protección inicial para niveles letales de peróxido de hidrógeno. Las células que presentaban mutaciones en genes específicos fueron expuestas primero a etanol no letal, para desencadenar el cebado, seguido de niveles letales de peróxido de hidrógeno y la tolerancia inducida por estrés dependía de muchos objetivos SigB (Reder et al., 2012). También se ha demostrado que en presencia de estrés oxidativo causado por H₂O₂, se inducen genes que pertenecen al regulón SigB (Helmann et al., 2003; Mostertz et al., 2004; Rogstam et al., 2007; Völker et al., 1994), lo que sugiere que SigB se activa por la presencia de señales de estrés oxidativo (Zuber, 2009).

Los estudios transcriptómicos de *Bacillus subtilis* han revelado otros factores reguladores que gobiernan la respuesta al estrés oxidativo a parte de SigB: PerR, OhrR, YodB y MgsR (Antelmann y Helmann, 2011; Helmann et al., 2003; Martin et al., 2019). El descubrimiento de una proteína de unión a la ARN polimerasa, Spx, se agrega como un contribuyente adicional a la respuesta global del manejo del estrés (Zuber, 2004). La proteína Spx está altamente conservada entre las bacterias Gram positivas e interactúa con la holoenzima RNA Polimerasa para dirigir la activación de genes que funcionan en la homeostasis de grupos tiol en respuesta a agentes que bloquean estos grupos en proteínas (Antelmann y Helmann, 2011; Zuber, 2009). Por ejemplo, Spx regula los operones de biosíntesis de bacilitiol (BSH), el cual fue identificado como uno de los principales tioles de bajo peso molecular en *Bacillus subtilis* (Gaballa et al., 2013, 2010; Newton et al., 2009).

La respuesta de *Bacillus subtilis* a los peróxidos está dada principalmente por las proteínas PerR y OhrR. La proteína PerR se identificó como el producto del gen *ygaG*. PerR es una ametalo proteína que se une a Zn (II), que cumple una

función puramente estructural, y Fe (II) por coordinación con los residuos 3His y 2Asp de la proteína (Lee y Helmann, 2006a, 2006b). La existencia del regulador PerR se infirió por el control coordinado de genes que han sido inducidos por la exposición a H₂O₂ (Chen et al., 1995). Los genes de biosíntesis de *mrgA*, *katA* (catalasa), *ahpCF* (alquilhidroperóxido reductasa) se inducen en presencia de peróxido, pero son reprimidos por PerR cuando se agrega Mn (II). La forma unida a Fe (II) de PerR responde al H₂O₂, pero la forma unida a Mn (II) es menos sensible al peróxido y ejerce represión en presencia de niveles inductores de peróxido (Herbig y Helmann, 2001). Por lo tanto, la actividad de PerR está relacionada con la homeostasis de iones metálicos en *Bacillus subtilis*.

Los hidroperóxidos orgánicos (OHP) por su parte, representan una amenaza para las bacterias del suelo, como *Bacillus subtilis*. Los OHP pueden presentarse como contaminantes, como sustancias antimicrobianas de origen vegetal o como subproductos del metabolismo. La proteína Ohr (*organic hydroperoxide reductase*) fue descubierta por primera vez en *Xanthomonas* (Mongkolsuk et al., 1998), después se identificaron ortólogos en *Bacillus subtilis* (OhrA y OhrB) permitieron investigar como la toxicidad de los OHP son mitigados y como esta bacteria responde a estos compuestos. En *Bacillus subtilis*, el gen *ohrA* está ligado al gen que codifica para OhrR (*ohrR*), el cual es un miembro de la familia de reguladores de resistencia múltiple a antibióticos (MarR) (Fuangthong et al., 2001). OhrR funciona como un sensor de OHP basado en oxidación de grupos tiol del residuo Cys15 (Lee et al., 2007; Zuber, 2009). Estudios basados en mutación del gen *ohrR* han observado una desrepresión de *ohrA*, pero no de *ohrB*, cuya expresión está regulada por el factor SigB (Helmann et al., 2003).

Además de OhrR, *Bacillus subtilis* posee varios otros sensores redox de la familia MarR que pertenecen a la subfamilia MarR = DUF24 (Leelakriangsak et al., 2008). A diferencia de OhrR, los reguladores de la familia DUF24 responden específicamente a especies reactivas electrofílicas (*reactive electrophilic species*, RES), por ejemplo la diamida, las quinonas y aldehídos, pero no a especies

reactivas de oxígeno. Como electrófilos, las quinonas forman aductos S con tioles celulares, dicho entrecruzamiento proteína-proteína puede conducir a la agregación de muchas proteínas citoplasmáticas que contienen grupos tiol (Liebeke et al., 2008). Como consecuencia del estrés por RES, el tampón redox de tiol de la célula se agota (Antelmann y Helmann, 2011). Los factores de transcripción de tipo MarR YodB, MhqR e YvaP controlan las vías de desintoxicación específicas que confieren resistencia a diamidas y quinonas. El represor YodB está altamente conservado entre las bacterias Gram positivas de bajo contenido de GC, incluidas las especies de *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Clostridium* (Antelmann et al., 2008).

2.4.1 El procesamiento del tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis* es afectado por mercurio

Generalmente los estudios sobre el estrés oxidativo en bacterias han involucrado experimentos donde se ha expuesto a las células a agentes oxidantes como el H₂O₂ con el fin de observar el efecto en el metabolismo, en la expresión génica y hasta de cómo se modula la tasa de traducción y otros mecanismos de respuesta bajo estrés oxidativo. Sin embargo, pocos trabajos han abordado los efectos del estrés oxidativo causado por metales pesados como el mercurio en bacterias. También son escasas las investigaciones enfocadas a analizar el impacto del estrés oxidativo causado por metales pesados a nivel del procesamiento de los tRNAs. Si bien, en *Escherichia coli*, un modelo genético y metabólico por excelencia en bacterias Gram negativas y quizá el organismo más estudiado, se ha observado su adaptación al estrés oxidativo a nivel de la regulación de los tRNAs en presencia de H₂O₂ y ciprofloxacino (Zhong et al., 2015; Zhu y Dai, 2019). Por otra parte, solo se ha estudiado el efecto del mercurio y otros metales pesados a nivel de oxidación de proteínas, inducción de estrés oxidativo, resistencia en plantas, hongos y bacterias y su aplicación en biorremediación, efectos en la salud, pero no a nivel del procesamiento de tRNAs tanto en *Escherichia coli* como en organismos eucariotas

(Farina et al., 2013; Frossard et al., 2018; Gontia-Mishra et al., 2016; Huang et al., 2010; Hussein et al., 2007; Jan et al., 2011, 2009; Mahbub et al., 2017; Petro-Souza et al., 2020; Wang et al., 2009, 2013; Xu e Imlay, 2012).

En *Bacillus subtilis* se tiene el precedente de investigaciones realizadas respecto al efecto del mercurio (HgCl_2) en el procesamiento del tRNA, específicamente el de cisteína. Cruz-Hernández et al., encontraron que en fase exponencial, concentraciones superiores a 1 mg ml^{-1} de HgCl_2 es letal para *Bacillus subtilis* y, a concentraciones inferiores a $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de HgCl_2 , el crecimiento no es afectado. A través del análisis de *Northern Blot*, también mostraron que la presencia de mercurio en la cepa de tipo salvaje resultó en una acumulación de una especie de tRNA^{Cys} que es más corta que el tRNA^{Cys} maduro en cepas mutantes donde las enzimas PNPasa (*pnp*) y RNasa R (*rnr*) estuvieron ausentes. Este estudio demuestra por primera vez que el metabolismo del tRNA, particularmente para tRNA^{Cys}, se ve afectado por mercurio en *Bacillus subtilis*, y que PNPasa y RNasa R son indispensables en el control de calidad del tRNA^{Cys} en presencia de mercurio (Cruz-Hernández et al., 2013).

En una revisión posterior realizada por Campos-Guillén et al., se discute el vínculo fisiológico entre la regulación del tRNA^{Cys} y el estrés oxidativo en *Bacillus subtilis*, el cual involucra la biosíntesis de bacilitiol (Campos-Guillen et al., 2017). Ya que una de las respuestas bacterianas al estrés oxidativo implica la formación de enlaces disulfuro entre tioles proteínicos o entre tioles proteínicos y tioles de bajo peso molecular (Ezraty et al., 2017), el bacilitiol (glucósido α -anomérico de la L- cisteinil- D -glucosamina con L -ácido málico) se identificó como uno de los principales tioles de bajo peso molecular que cumplen esta función como mecanismo de protección celular bajo la oxidación de residuos de cisteína en *Bacillus*, *Staphylococcus aureus* y *Deinococcus radiodurans* (Gaballa et al., 2013, 2010; Newton et al., 2009). Aunque glutatión (GSH) es el principal tiol antioxidante en la mayoría de los organismos, en ciertas bacterias Gram positivas no está presente, por lo que existen otros tioles de bajo peso molecular que pueden

reemplazarlo (Fahey, 2001). El más conocido es el micotiol (MSH), el cual es producido por Actinobacterias (Jothivasan y Hamilton, 2008). En algunas bacterias Gram positivas con bajo contenido de G + C como *Staphylococcus aureus*, la CoA resultó ser el tiol antioxidante principal (del Cardayre et al., 1998).

De manera interesante, dentro de uno de los loci donde se encuentran los genes para la biosíntesis de bacilitiol (*bshB1* y *bshA*), en el operón *ypjD*, se encuentra el gen *cca* que codifica la enzima ATP (CTP): tRNA nucleotidiltransferasa (CCasa) (Campos-Guillen et al., 2017). Como se explicó anteriormente, la CCasa añade la secuencia 3'-CCA en los tRNAs que carecen de ella, como lo es el tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis*, dicha secuencia es indispensable en la maduración y aminoacilación de todos los tRNAs (Elliott y Ladomery, 2016; Schürer et al., 2001; Shepherd e Ibbá, 2015). El hecho de que el gen *cca* este en el operón *ypjD* podría entonces sugerir que la CCasa participe en la respuesta al estrés oxidativo.

En la revisión de Campos-Guillen et al., se plantea la posibilidad de que pueda existir una relación biológica entre la maduración o la degradación del tRNA^{Cys} y la respuesta de *Bacillus subtilis* al estrés oxidativo. Además, que el tRNA^{Cys} pueda participar en los procesos metabólicos de la célula, además de su función en la síntesis de proteínas. En este sentido, el tRNA^{Cys} podría ser un depósito de cisteína para la biosíntesis de bacilitiol o podría funcionar como protector de los residuos de cisteína de la oxidación en diversas proteínas relacionadas con el estrés (Figura 13). Estos eventos permitirían un balance rápido en los niveles de tRNA^{Cys} aminoacilado, así asegurando la integridad del tRNA para mantener la homeostasis celular (Campos Guillen et al., 2017). Sin embargo, aún no están comprobados tales planteamientos y hacen falta estudios al respecto.

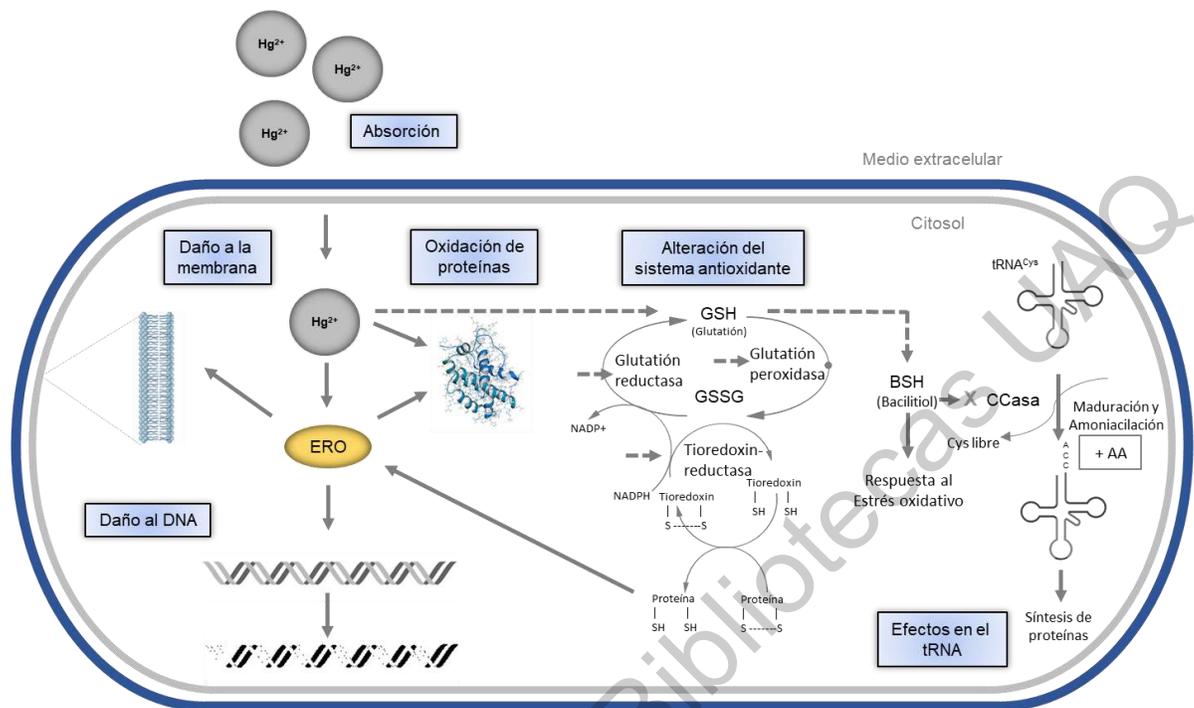


Figura 13. Modelo del efecto del mercurio en la homeostasis celular. El mercurio una vez absorbido por las células, desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través del bloqueo de los sistemas antioxidantes, por ejemplo, el glutati3n (GSH), en *Bacillus* y Firmicutes relacionados, bacilitiol (BSH). Este desbalance generando por el mercurio da lugar a estr3s oxidativo celular. Las especies reactivas de ox3geno causan diversas alteraciones a biomol3culas como a l3pidos (peroxidaci3n lip3dica), da3o al DNA y oxidaci3n en prote3nas, lo que provoca envejecimiento y hasta muerte celular. Actualmente se conoce que tambi3n puede reprimir la s3ntesis de RNA y el procesamiento de mol3culas de tRNA.

2.5 *Bacillus subtilis* como modelo de estudio

Bacillus subtilis (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872, es una bacteria del suelo, aerobia, formadora de endosporas y Gram positiva (Earl et al., 2010; Mckenney et al., 2013; Vos et al., 2009) que forma parte de los microorganismos m3s estudiados. Est3 clasificada dentro del Phylum Firmicutes y ha servido como modelo

experimental para investigaciones genéticas y bioquímicas, y ha sido el punto de inicio para estudios en muchas otras bacterias con características similares. Por ejemplo, se han estudiado los mecanismos genéticos de la formación de esporas entre otros procesos fisiológicos (Stragier y Losick, 1996).

Diversas herramientas y técnicas han sido desarrolladas para el conocimiento de su genética, de los cuales, los vectores de integración han sido uno de los más importantes (Guerout-Fleury et al., 1996; Kim et al., 1996). La manipulación de la expresión de genes representa una característica importante para los estudios genéticos sobre la regulación de genes en cada organismo. En *Bacillus subtilis*, la recombinación homóloga de plásmidos integrativos ofrece una manera simple de poner cualquier gen bajo el control de un promotor regulable que esté en el cromosoma. Su genoma fue secuenciado completamente desde 1997, revelando un cromosoma de 4.2 Mbp con aproximadamente 4,100 genes (Harwood y Wipat, 1996; Kunst et al., 1997; Moszer, 1998). Su genoma es uno de los mejor anotados, ya que desde hace más de 20 años su anotación de ha ido refinando. A través del análisis de 36 genomas completos de diversos aislados de *Bacillus subtilis*, se tiene un pangenoma (conjunto total de genes) de aproximadamente 6,250 genes y un genoma central (conjunto de genes conservados) de aproximadamente 2,500 genes (Borriss et al., 2018). Existen registros de genes esenciales obtenidos de proyectos globales, y recientemente se han identificado 257 genes necesarios para su crecimiento en medio LB a 37 °C (Koo et al., 2017). También se sabe que 300 genes son necesarios para la formación de endosporas (Errington, 2003; Errington y Aart, 2020).

Actualmente existen bases de datos disponibles de genes y genomas completos de *Bacillus subtilis*, como SubtiWiki, que está disponible desde el año 2012 (Mäder et al., 2012; Zhu y Stülke, 2017). Esta base de datos incluye un conjunto enormemente completo de datos que enumeran las unidades transcripcionales, los promotores y los RNA reguladores (Nicolas et al., 2012). SubtiList y GenoList disponibles desde 1995 y 2008 respectivamente (Lechat et al.,

2008; Moszer et al., 2002, 1995). Existen otras bases de datos interconectadas de acceso público que se actualizan simultáneamente, como son GeneBank perteneciente a NCBI (National Center for Biotechnology Information), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) y EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute), en las cuales hay información de secuencias de proteínas, de RNA, genes y genomas de diversos organismos, incluidas múltiples especies de *Bacillus* y cepas de *Bacillus subtilis* (Benson et al., 1998; Ogata et al., 1999; Squizzato et al., 2015; Tateno et al., 2002).

Bacillus subtilis es un organismo modelo para los patógenos de humanos *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus*, entre otros. *Bacillus subtilis* fue la primera bacteria Gram positiva en tener su genoma secuenciado (Barbe et al., 2009; Kunst, 1997) y es un sistema modelo importante para el estudio de la formación de biofilm y de esporas de resistencia (Cairns et al., 2014; Dubnau y Mirouze, 2013; Tan y Ramamurthi, 2014; Vlamakis et al., 2013). Muchos de los estudios transcriptómicos en *Bacillus subtilis* se han centrado en la expresión génica durante la esporulación y otras respuestas al estrés ambiental (Cao et al., 2002; De Hoon et al., 2010; Fawcett et al., 2000; Nagler et al., 2016b; Price et al., 2002). En los últimos años se han realizado modelos para estimar simultáneamente la actividad de los factores de transcripción y conocer una red reguladora transcripcional sustancialmente ampliada para esta bacteria. En un trabajo de Arrieta-Ortiz et al., encontraron 2,258 interacciones reguladoras nuevas, lo que aumentó significativamente la comprensión de varios procesos celulares, como la formación de esporas (Arrieta-Ortiz et al., 2015).

A la fecha, *Bacillus subtilis* es un sistema modelo de investigación sobre genética y metabolismo por excelencia en bacterias Gram positivas, el cual también es extremadamente útil en el estudio de la respuesta a diversos tipos de estrés a través de análisis proteómicos y transcriptómicos de todo el genoma, así como a

través de estudios estructurales detallados de los factores reguladores que gobiernan la respuesta al estrés oxidativo (Nannapaneni et al., 2012; Völker y Hecker, 2005).

2.5.1 La espora de *Bacillus subtilis* como modelo de estudio

En su hábitat natural, *Bacillus subtilis*, está expuesta a condiciones ambientales fluctuantes, principalmente a estrés osmótico y estrés por deficiencia de nutrientes, que frecuentemente ocurre en los suelos (Bremer, 2002; Lopez et al., 2009; Marles-Wright y Lewis, 2007; Nicholson, 2002; Schultz et al., 2009; Wood et al., 2001). Cuando la desecación del suelo crea condiciones hiperosmóticas, las células deben ajustar su osmolalidad interna para evitar la salida de agua y la plasmólisis (Hoffmann y Bremer, 2016; Wood et al., 2001). Por otra parte, al agotarse los nutrientes, esta bacteria genera endosporas de resistencia que después germinan para formar células vegetativas cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles en el medio (Bremer, 2002; Errington, 2003; Mckenney et al., 2013; Nicholson, 2002; Tan y Ramamurthi, 2014). Estas estructuras pueden ser resistentes a diferentes condiciones del medio como son temperatura (calor seco y calor húmedo), presión, desecación, radiación UV, radiación gamma, sustancias químicas, entre otras (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2012, 2006a). Se ha visto una relación directa entre la formación de la endospora, la germinación y el éxito de colonización de diferentes sustratos en *Bacillus* (Puzyr' et al., 2002).

La endospora, es una estructura celular de resistencia propia de las bacterias que permite la entrada de las funciones vitales en un estado de dormancia, es decir, la célula queda metabólicamente inactiva por largos periodos de tiempo, hasta millones de años y germinar sin problemas (Cano y Borucki, 1995; Setlow, 2013). Dicha capacidad confiere ventajas biológicas así como ecológicas importantes y su significancia llega también al área de epidemiología de enfermedades infecciosas, como es el caso del ántrax, causado por *Bacillus*

anthracis (Liu et al., 2004; Nicholson, 2002). Una espora inactiva está altamente organizada en estado deshidratado, la estructura de la espora de *Bacillus* consta de un núcleo que está envuelto por una membrana interna densa, una pared celular germinal, después hay una corteza seguido de una membrana externa, una cubierta de proteínas y una capa final, muy gruesa llamada exosporio (Higgins y Dworkin, 2012; Khanna et al., 2020; Mckenney et al., 2013; Setlow, 2006b, 2003). Cada componente de las esporas está formado por moléculas que desempeñan un papel importante en la protección de las esporas de una amplia gama de condiciones ambientales perjudiciales (Mckenney et al., 2013; Setlow, 2006a).

La germinación de esporas inactivas de especies de *Bacillus* es el primer paso crucial en el retorno de las esporas al crecimiento vegetativo y es inducida por nutrientes y una variedad de agentes no nutritivos. Los nutrientes ambientales son reconocidos por los receptores germinantes (RG) y promueven cambios bioquímicos como la liberación de cationes monovalentes y Ca^{2+} -dipicolinato (Ca^{2+} -DPA), y la corteza se hidroliza y rehidrata. Estos cambios moleculares inician el proceso de germinación (Eijlander et al., 2014; Setlow, 2013, 2003). Después de este primer paso, la espora entra en fase de crecimiento (outgrowth), que se define como el período de tiempo entre el inicio de la actividad metabólica y la primera división celular (Keijser et al., 2007; Setlow, 2003). A lo largo de su crecimiento, las esporas germinadas experimentan una reorganización molecular o maduración (*ripening*), después escapan de sus capas de protección y se elongan (Keijser et al., 2007; Segev et al., 2013; Setlow, 2013; Sinai et al., 2015). Se ha observado que durante la fase de crecimiento se activan al menos el 30 % de los genes de *Bacillus subtilis* y que sintetizan más de 650 proteínas antes del crecimiento vegetativo (Horsburgh et al., 2001; Keijser et al., 2007; Sinai et al., 2015).

En *Bacillus subtilis* se ha estudiado el efecto y adaptación a condiciones de hipersalinidad (Hoffmann y Bremer, 2016; Höper et al., 2006; Steil et al., 2003; Tovar-Rojo et al., 2003). Ahora conociendo las condiciones ambientales y los mecanismos moleculares que llevan a *Bacillus subtilis* a la formación de endosporas

y su germinación, se ha adoptado como modelo de estudio para evaluar el efecto del estrés osmótico que causan los ambientes hipersalinos durante la germinación y el crecimiento temprano. En este sentido, el grupo de trabajo de Ralf Moeller, experto en modelos microbianos para estudios astrobiológicos y Peter Setlow, líder en investigación sobre esporulación y germinación en *Bacillus subtilis*, han estudiado el efecto del estrés causado por altas concentraciones de NaCl en el perfil de expresión génica durante la germinación de esporas y el crecimiento posterior, a través de secuenciación de RNA (Nagler et al., 2016a, 2016b, 2015, 2014; Nagler y Moeller, 2015).

Por otra parte en el área de astrobiología, se han empleado como modelo las endosporas de *Bacillus subtilis* para explorar su supervivencia en entornos simulados de la superficie de Marte como son composición atmosférica, baja presión y baja temperatura, ya que tienen solo efectos mínimos en la viabilidad de las esporas de tipo salvaje, también el efecto de la radiación UV sobre la germinación (Cortese et al., 2019; Moeller et al., 2010; Nicholson et al., 2018; Nicholson y Schuerger, 2005; Schuerger et al., 2003) y también en meteoritos (Fajardo-Cavazos et al., 2005).

2.5.2 Importancia biológica y biotecnológica

El género *Bacillus* (Cohn, 1872), es un grupo de bacterias Gram positivas con forma de bacilo, diplobacilos u ocasionalmente filamentos. Estas bacterias generalmente se encuentran en diversos ecosistemas (Vos et al., 2009). Este género consta de 376 especies descritas hasta 2020 (LPSN, 2019) y tienen la propiedad particular de formar endosporas de resistencia frente a condiciones extremas en el ambiente. Sus diversas capacidades fisiológicas les permiten crecer en ambientes extremos, ya sea a bajas o altas temperaturas, en ambientes ácidos o básicos, o en condiciones de estrés por salinidad (halófilas). La mayoría de los miembros de este género son quimioorganótrofos, dado que la principal fuente de

aislamiento de estas bacterias es el suelo, el agua, el aire, o pueden estar relacionados con procesos infecciosos en organismos superiores (Vos et al., 2009).

Otra propiedad observada en este género es la capacidad para formar biofilm. Esta característica al igual que la formación de endosporas han sido fuertemente estudiadas en *Bacillus subtilis* (Chai et al., 2008). Un biofilm se puede definir como una estructura compleja de comunidades microbianas que se mantienen juntas en una matriz extracelular compuesta principalmente de exopolisacáridos y proteínas (KeRNAs et al., 2005). La producción de biofilm trae ventajas a la comunidad de bacterias que lo forman debido a la resistencia que les confiere frente a sustancias químicas o condiciones físicas extremas, también puede inducir la síntesis de metabolitos secundarios por parte de sus miembros (Morikawa, 2006).

Además de tener ciertas ventajas ecológicas como protección contra los cambios ambientales tales como toxinas, radiación UV, cambios de pH, choque osmótico y desecación (Davey y Toole, 2000; Flemming, 1993); disponibilidad de nutrientes; adquisición de nuevas características genéticas por transferencia horizontal; el biofilm tiene una estrecha relación con patogenicidad y es bien conocida su función en *Pseudomonas aeruginosa* (Davey y Toole, 2000).

La gran mayoría de las especies de *Bacillus* no están relacionadas con patogenicidad en humanos u otros animales. Solamente la excepción se encuentra en *Bacillus anthracis* (Goel, 2015; Spencer, 2003), *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* ambas relacionadas con intoxicación por alimentos contaminados (Bottone, 2010; Granum et al., 2013; Majed et al., 2016) y *Bacillus thuringiensis* relacionada con patogenicidad de invertebrados (Chattopadhyay et al., 2017; Hatting et al., 2018).

Diversas son las aplicaciones biotecnológicas que se les ha dado a los miembros de esta familia, una muy importante tiene que ver con la capacidad para formar péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés). Estos péptidos

generan poros a través de la membrana citoplasmática de otras bacterias. Se conocen lipopéptidos y bacteriocinas de la mayoría de las especies de *Bacillus* y se han propuesto como alternativas para hacer frente a la resistencia a antibióticos (Sang y Blecha, 2008; Sumi et al., 2015).

Otra característica con importancia biotecnológica es la capacidad para crecer en presencia de compuestos xenobióticos que son tóxicos para los organismos realizando biotransformación. Por ejemplo, se ha observado un alto nivel de degradación de benzo(a)pireno (compuesto mutagénico y carcinogénico) a través del citocromo P450 por hidroxilación en *Bacillus thuringiensis* (Lu et al., 2019). También se ha reportado la degradación de insecticidas como γ -hexaclorociclohexano o lindano (compuesto acumulable en el ambiente que causa serios problemas en la salud) por parte cepas de *Bacillus sp.* (Pannu y Kumar, 2017). El naproxeno es un fármaco utilizado ampliamente, se ha observado que tiene una actividad tóxica en organismos acuáticos. Debido a este problema ambiental se han empleado cepas de *Bacillus thuringiensis* para la biorremediación de sitios contaminados con este compuesto (Górny et al., 2019).

Debido a las características de *Bacillus spp.* antes mencionadas, se han empleado diversas como biofertilizantes, biopesticidas y como biofungicidas en agricultura. Se ha utilizado *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* como antagonistas para el control de *Cercospora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, entre otros patógenos de plantas (Pérez-García et al., 2011).

El género *Bacillus* también ha sido relacionado con resistencia a metales pesados. Múltiples aplicaciones ambientales de esta característica han tenido lugar en el área de la biorremediación de zonas contaminadas con metales pesados. *Bacillus* ha servido como una alternativa para la remoción de metales tóxicos en aguas de origen industrial como Cd, Cr, Mn y Pb (García et al., 2016; Ren et al., 2015). Se ha observado una alta tolerancia y una alta bioadsorción de metales pesados por parte de *Bacillus circulans* y *Bacillus thuringiensis* (Oves et al., 2013;

Yilmaz, 2003). *Bacillus cereus* ha mostrado bioadsorción de Cd(II) en suelos contaminados (Huang et al., 2013; Yin et al., 2019). También se ha visto resistencia y bioadsorción de Pb en cepas de *Bacillus pumilus* y *Bacillus cereus* (Çolak et al., 2011).

2.6 Contaminación del suelo con metales pesados

El suelo es un componente ambiental que por su origen, formación y evolución no es un recurso natural renovable, al menos a corto plazo. Por lo general se encuentra cubierto por vegetación que le aporta materia orgánica y nutrientes (Brevik et al., 2015; Kalev y Toor, 2018). El suelo provee servicios ambientales como el de desempeñar un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos, además de albergar gran parte de la diversidad de organismos en del planeta (Smith et al., 2015). En condiciones naturales el suelo tiende a un estado de equilibrio bajo un lento proceso de formación llamado edafogénesis. La meteorización química y mecánica de las rocas y la interacción con microorganismos forman el suelo (Kalev and Toor, 2018). Este estado natural de equilibrio del suelo se puede romper debido a las actividades humanas como son: agricultura, industria, minería, ganadería, urbanización, entre otras (Andrade-Herrera et al., 2019; Mcclintock, 2015; Mileusnić et al., 2014; Ostermann et al., 2014; Rachwał et al., 2015). Este tipo de modificación negativa se denomina degradación de suelos (Lal, 2015).

Generalmente la presencia de compuestos químicos o elementos a concentraciones tóxicas en los suelos es un tipo especial de contaminación (Kumar et al., 2019). El termino contaminación se refiere a la introducción o incremento anormal de sustancias o materiales que impactan negativamente en el estado natural del medio, generalmente causando daño a organismos vivos y su ecosistema (Motuzova et al., 2014). Su origen puede ser geogénico o antropogénico. La primera tiene relación directa con procesos basados en la roca madre de la que se formó el suelo, del vulcanismo, o del lixiviado de

mineralizaciones. Sin embargo, los antropogénicos son debido a la producción y desecho de residuos peligrosos provenientes de las actividades humanas antes mencionadas (Lal, 2015).

Se han observado fenómenos de volatilización, disolución, lixiviación o erosión de diversos contaminantes como procesos de abandono o remoción, pero también procesos de interacción directa con organismos vivos cuando se hacen solubles y por lo tanto bioasimilables (Liu et al., 2019). Un contaminante puede presentar potencial para ser capturado o absorbido por un organismo, a este estado se le llama biodisponibilidad (Mortensen et al., 2018). Este estado biodisponible está en función de la forma química y física del contaminante y de la capacidad de los organismos para absorberlo (Adamo et al., 2014). Estos compuestos y elementos a su vez pueden bioacumularse varios órdenes de magnitud por encima de la concentración del medio donde se desarrollan los seres vivos afectados (Mortensen et al., 2018; Schneider et al., 2009).

En este sentido, los contaminantes más relevantes del suelo por su alta toxicidad son los metales pesados. Químicamente un metal pesado se define principalmente como aquellos elementos metálicos cuyo peso es mayor a 5 g cm^{-3} o con un número atómico superior a 20 (Li et al., 2014; Oves et al., 2012). La contaminación del suelo por metales pesados representa un riesgo potencial y real para la integridad del ambiente y para la seguridad humana y del resto de la diversidad biológica (Motuzova et al., 2014). Los metales pesados que se encuentran comúnmente como contaminantes en el suelo son Pb, Cr, As, Zn, Cd, Cu, Hg y Ni los cuales persisten por largos periodos de tiempo después de su introducción (Wuana y Okieimen, 2011).

2.6.1 Fuentes de los metales pesados en suelos contaminados

Los metales pesados pueden aparecer en el suelo naturalmente por procesos pedogenéticos o litogenéticos al intemperizarse el material parental, generalmente estos metales quedan expuestos en concentraciones llamadas traza ($<1 \text{ g kg}^{-1}$) y son raramente tóxicos gracias a que se encuentran en formas químicas no asimilables por los organismos. Sin embargo, debido a la perturbación de los ciclos geoquímicos de los metales provocados por el hombre, puede haber acumulación de estos hasta alcanzar concentraciones que pueden afectar plantas, animales, microorganismos, al humano y a los ecosistemas (Wuana y Okieimen, 2011).

Los metales pesados en el suelo provenientes de las actividades humanas tienden a estar en mayor cantidad, en una mayor biodisponibilidad. La aplicación de fertilizantes y pesticidas en tierras de cultivo ha jugado un papel importante en el aporte de metales pesados. Se ha observado un incremento significativo de la concentración de Cd, Pb y As en cultivos debido a la aplicación de fertilizantes (Atafar et al., 2010; Gonçalves et al., 2014). En décadas pasadas los pesticidas también contribuyeron a la contaminación del suelo con metales, ya que las formulaciones estaban hechas a partir de compuestos que tenían Cu, Hg, Mn, Pb, o Zn. Por ejemplo, algunos de estos pesticidas funcionaban como fungicidas que contenían sulfato de cobre como ingrediente activo, u otros como el arsenato de plomo que se usaba como control de insectos parasíticos en los cultivos de frutos (Wuana y Okieimen, 2011).

La minería y los procesos metalúrgicos también han provocado una extensa contaminación por metales en el suelo, agua y aire. Se han encontrado concentraciones más altas de As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, y Hg respecto a los niveles máximos permisibles en los estándares de calidad de los suelos (Li et al., 2014; Xiao et al., 2017).

Se ha observado la participación del aire contaminado con metales pesados en la subsecuente contaminación de los suelos. En este sentido, las fuentes de metales en el aire incluyen las emisiones de chimeneas o conductos de corrientes

de aire, gas o vapor donde los metales se liberan en partículas a la atmósfera. Metales como As, Cd y Pb se pueden volatilizar cuando están a altas temperaturas y en la atmósfera pueden reaccionar, después convertirse en óxidos y así condensarse para finalmente precipitar en el suelo (Wuana y Okieimen, 2011).

2.6.2 Contaminación del suelo por mercurio

El mercurio es un metal líquido que pertenece al mismo grupo que el Zn y el Cd en la tabla periódica. Tiene un número atómico de 80, masa atómica de 200.59 g mol⁻¹, densidad de 13.6 g cm⁻³, punto de fusión de -13.6 °C, punto de ebullición de 357 °C (Wuana y Okieimen, 2011). Desde la era postindustrial se ha observado un aumento en las concentraciones de este metal en suelo, agua y aire de 3 a 10 veces mayor. Además de las fuentes naturales de mercurio, las actividades antropogénicas han favorecido su extensa distribución a nivel mundial. La mayoría de sus formas químicas son altamente tóxicas para el humano, inclusive a bajas concentraciones causando problemas en el sistema nervioso central (Nance et al., 2012).

En un estado natural el mercurio se encuentra como cinabrio, un mineral formado por cristales de HgS, pero también se puede encontrar en el suelo en otras formas químicas orgánicas (metilmercurio, fenilmercurio, etilmercurio), inorgánicas (sales de Hg⁺ y Hg²⁺) y en su forma elemental (Hg⁰) (Nance et al., 2012). Se ha observado que el mercurio sufre transformaciones de forma continua a manera de un ciclo. La forma elemental comúnmente se encuentra en un 95 % como contaminante de la atmósfera, este después es oxidado al estado Hg²⁺ (Morel et al., 1998). Consecuentemente, casi un 60 % de la forma Hg²⁺ disuelta se precipita hacia la superficie del suelo donde es más persistente que en otros compartimentos; el otro 40 % es depositado en el agua oceánica. Las biotransformaciones en los océanos convierten las formas Hg²⁺ a Hg⁰ que se volatiliza y regresa nuevamente a

la atmósfera. Un proceso similar ocurre en el suelo, pero en este caso es menor la cantidad de mercurio reducido la que regresa a la atmósfera (Lindberg et al., 1995).

El mercurio se libera principalmente por procesos geogénicos naturales como volcanismo y meteorización de rocas ricas en mercurio, se liberan de 80-600 Ton año⁻¹ de mercurio por fuentes naturales (Mason et al., 2012; Xu et al., 2015). Las fuentes antropogénicas de mercurio son principalmente: la minería y producción de metales, industria química, manejo y tratamiento de desechos, combustión de carbón y madera y producción de cemento. Hasta el año 2016 se liberaron aproximadamente 1,960 Ton año⁻¹ por actividades humanas (Hu y Cheng, 2016; Male et al., 2013; Xu et al., 2015).

2.6.3 Factores que influyen en la movilidad y biodisponibilidad del mercurio en el suelo

El comportamiento del mercurio en el suelo depende de factores físicos y químicos que influyen en su redistribución. Las principales formas en las que se encuentra el mercurio en suelo son las siguientes: disuelto (iones o complejos solubles), absorbido no específicamente (uniéndose por fuerzas electrostáticas), absorbido específicamente (enlaces covalentes o coordinados), quelado (unido a sustancias orgánicas) y precipitado (sulfuro, carbonato, hidróxido) (Schuster, 1991).

Los principales factores que intervienen en el movimiento y disponibilidad de mercurio son los diferentes acarreadores químicos, las transformaciones, el pH y el potencial redox. Se sabe que de manera natural el mercurio es acomplejado con iones Cl^- , OH^- , S^{2-} , se ha visto que la materia orgánica juega un rol importante como factor dominante que controla la movilidad de mercurio en suelos ácidos, mientras que, en suelos básicos a alcalinos, son los minerales principalmente. Se ha observado afinidad de mercurio con grupos funcionales en sustancias húmicas como OH, COOH, aromáticos y con SH. En este sentido, el mercurio será móvil si la materia orgánica del suelo también lo es, es decir, se puede absorber por

partículas inmovilizadas, lo que consecuentemente también se inmovilizará al mercurio; por otro lado, se pueden formar complejos de materia orgánica y mercurio haciéndose soluble y moverse a través del agua del suelo (Xu et al., 2015).

En el caso de los minerales de arcilla, hidróxidos de Fe, Mn, Al y FeS amorfo son absorbentes muy importantes de mercurio que permiten su inmovilización. Por otra parte, la interacción con iones de Cl^- al formar HgCl_2 aumenta su solubilidad y por lo tanto su movilización (Zhang et al., 2015).

Como se mencionó antes, las transformaciones del mercurio también influyen en su movilización. Existen procesos de metilación y demetilación de mercurio que son llevados a cabo principalmente por bacterias, la metilación consiste en la unión de un grupo metilo a mercurio inorgánico para dar lugar a metilmercurio $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$. La desmetilación por su parte, reduce la biodisponibilidad de mercurio en suelo ya que al realizarse una reacción reductiva se producen Hg^0 que se volatiliza a la atmosfera y CH_4 , mientras que CO_2 y Hg^{2+} se producen por una reacción oxidativa (Lu et al., 2016; Mason et al., 2012; Xu et al., 2015).

El potencial redox interfiere con la movilización de mercurio. Se ha observado que en condiciones anóxicas con potencial redox se induce la metilación de mercurio por bacterias sulfato-reductoras y por su parte un ambiente reductor puede incrementar la solubilidad del mercurio pasando de Hg^{2+} en forma de HgS a Hg^0 que se volatiliza y se libera a la atmósfera (Xu et al., 2015). El pH por su lado juega también un papel importante en la movilización del mercurio ya que se ha reportado que a pH 3 hay una mínima disolución de mercurio, mientras que a pH 5 u 11 hay mayor solubilidad (Xu et al., 2014).

3 HIPÓTESIS

Al someter la bacteria *Bacillus subtilis* a condiciones de estrés oxidativo, habrá cambios en la estructura y densidad de las moléculas del tRNA^{Cys} las cuales son susceptibles de ser analizadas a través de secuenciación masiva y herramientas de análisis de datos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis* bajo condiciones de estrés oxidativo generado por mercurio utilizando el método de secuenciación masiva para su uso como modelo de estudio.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar diferentes perfiles transcriptómicos de *Bacillus subtilis* para establecer condiciones de análisis y uso del tRNA^{Cys} como modelo de estudio en condiciones de estrés oxidativo.
2. Establecer las condiciones de germinación de esporas de *Bacillus subtilis* bajo estrés oxidativo inducido por mercurio, para analizar perfiles transcriptómicos del tRNA^{Cys} a través de RNA-seq.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

La bacteria *Bacillus subtilis* cepa PY79, fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) y fue mantenida en medio LB (fórmula por litro: extracto de levadura 5 g, peptona 10 g y NaCl 10 g) solo o suplementado con 1.5% de agar a 37°C en condiciones aeróbicas. El cultivo stock y experimentales fueron preservados a -80°C. En el caso de las esporas, estas se mantuvieron suspendidas en dH₂O estéril a 4 °C.

5.2 Evaluación de los perfiles transcriptómicos del tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis* a partir de bases de datos en NCBI

En este proyecto se evaluaron metodologías de purificación de moléculas de RNA y secuenciación para poder visualizar cambios en frecuencia de fragmentos del tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis* y después aplicarlas en su uso como modelo de estudio. Es por lo anterior que como primer paso se utilizaron los transcriptomas disponibles las librerías en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus Database) de NCBI (Clough y Barrett, 2016). En el Cuadro 2 se muestra la descripción correspondiente de las librerías utilizadas con números de acceso GSE100263 (Schwartz et al., 2018), GSE81238 (Nagler et al., 2016b) y GSE120050 (Liu et al., 2014). Se determinó la calidad de las secuencias de RNA mediante el programa FastQC, para lo cual se requirieron los datos de secuenciación en archivos fastq. Después se hizo un alineamiento al genoma de referencia de *Bacillus subtilis* cepa 168 obtenido de la base de datos GenoList (Lechat et al., 2008) de cada corrida de secuenciación (SRR-n) en el programa BWA (Li y Durbin, 2009).

De forma paralela se realizó otro alineamiento en BWA con los datos de cada corrida de secuenciación con respecto a la secuencia del gen para tRNA^{Cys} obtenida de la base de datos SubtiList (Moszer et al., 2002). Esta región incluye el gen del tRNA^{Gly}, tRNA^{Leu} y el terminador con un tamaño total de 337 pb (región del genoma de *Bacillus subtilis* cepa 168 de 952.035 a 952.371 Kb). Para visualizar dichos alineamientos y observar ciertos cambios en la secuencia de los fragmentos que se alineen con la región del tRNA^{Cys}, se utilizó el visor genómico IGV (Robinson et al., 2011).

5.3 Análisis de moléculas de tRNA^{Cys} en el transcriptoma de Nagler et al., 2016b

Los datos de RNA-seq corresponden a un experimento de la evaluación del efecto del estrés salino en la expresión genética de *Bacillus subtilis* en diferentes tiempos de germinación y crecimiento de esporas. Estos datos corresponden a t_0 min (espora inactiva), germinación y crecimiento de esporas durante 30, 60 y 90 minutos (t_{30} min, t_{60} min, y t_{90} min), en presencia y ausencia de NaCl 1.2 M en medio de germinación. Cada muestra fue secuenciada por duplicado. Para evitar la confusión y el sesgo de los isoacceptores de tRNA que no codifican 3'-CCA en *Bacillus subtilis*, se aprovechó el análisis del procesamiento para el gen tRNA^{Cys} que, como se mencionó antes, está presente en una sola copia en el genoma de *Bacillus subtilis* y se encuentra en el extremo distal del operón *rrnD*. Al no codificarse la secuencia CCA al final del extremo 3', debe agregarse después de la transcripción.

Para el análisis fino de las lecturas y el mapeo de secuencias, se utilizó el programa CLC Genomics Work Bench versión 12.0.2 (Qiagen, CLC Bio, Aarhus, Denmark). Las lecturas fueron mapeadas con la región del gen para tRNA^{Cys}, esta secuencia de referencia fue descargada de la base de datos SubtiWiki (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de>) (Mäder et al., 2012). Se utilizó un alineador local para lecturas cortas y se usaron los parámetros que arroja el programa por default.

Se consideraron los alineamientos con una fracción de tamaño de 0.8 y una fracción de similitud de 0.8. Dos *mismatches* y tres inserciones y deleciones por cada lectura fueron permitidos. Los resultados del mapeo para todos los experimentos fueron de 243 a 1,141 lecturas. Así, las lecturas mapeadas fueron extraídas y analizadas utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) a través del programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013), se alinearon a una secuencia del gen para tRNA^{Cys}. Las secuencias alineadas fueron revisadas manualmente y se categorizaron en los siguientes grupos: I) precursores (contiene nucleótidos codificados genómicamente en los extremos 5' y 3'); II) tRNA inmaduro (consta de 71 nucleótidos); III) tRNA inmaduro (CCA en el 3'); IV) tRNA inmaduro (con 3'-CC). Para el caso de los fragmentos de tRNA (tRFs), se contaron y sumaron todos los diferentes tamaños de fragmento y se categorizaron en los siguientes grupos: V) fragmentos del extremo 3' (3'-tRF) con la secuencia CCA; VI) fragmentos 3'-tRF con CC; VII) todos los fragmentos detectados como 5'-tRF (71 bases – n, donde n > 0, del extremo 3') o fragmentos internos (de la posición 2 a la 70 como referencia); VIII) tRNA^{Cys} completo pero con adiciones incorrectas en el extremo 3'; y IX) fragmentos 3'-tRF con adiciones incorrectas en el 3'.

Una vez delimitados estos grupos de moléculas de tRNA^{Cys}, se realizó el análisis del contenido total de moléculas en la espora t_0 min. Después, se comparó el perfil de moléculas maduras, inmaduras y fragmentos en cada uno de los tiempos de germinación y posterior crecimiento de la espora (t_{30} min, t_{60} min, y t_{90} min). Este análisis de la distribución de moléculas de tRNA^{Cys} fue realizado en el programa JPM 7 a través del algoritmo de frecuencias por grupo. También se evaluó la dinámica de estas moléculas de tRNA^{Cys} en los nueve grupos delimitados en función del tiempo de germinación y crecimiento antes mencionados. Los gráficos de tendencia fueron construidos en el software SigmaPlot versión 14.0.

Cuadro 2. Descripción de las librerías de RNA-seq de *Bacillus subtilis* disponibles en NCBI

Acceso GEO	Corrida	BioMuestra	Muestra	Experimento	Instrumento	MBases	MBytes	Fuente	Tratamiento	Diseño	Referencia
GSE100263	SRR7475394	SAMN09615572	GSM3258512	SRX4344891	Illumina HiSeq 2000	4,498	1,890	Cultivo	Demetilasa	Paired	Schwartz et al., 2018
	SRR7475393	SAMN09615575	GSM3258511	SRX4344890	Illumina HiSeq 2000	4,323	1,846	Cultivo	Demetilasa	Paired	
	SRR7475390	SAMN09615494	GSM3258508	SRX4344887	Illumina HiSeq 2000	3,695	1,635	Cultivo	No demetilasa	Paired	
GSE81238	SRR3488635	SAMN04962911	GSM2147025	SRX1750673	Ion Torrent	1,506	1,206	NaCl T90	Sal	Single	Nagler et al., 2016b
	SRR3488634	SAMN04962910	GSM2147024	SRX1750672	Ion Torrent	1,094	877	NaCl T60	Sal	Single	
	SRR3488633	SAMN04962909	GSM2147023	SRX1750671	Ion Torrent	1,658	1,326	No NaCl T90	No Sal	Single	
	SRR3488632	SAMN04962908	GSM2147022	SRX1750670	Ion Torrent	1,297	1,039	No NaCl T60	No Sal	Single	
	SRR3488631	SAMN04962907	GSM2147021	SRX1750669	Ion Torrent	1,446	1,155	No NaCl T30	No Sal	Single	
	SRR3488630	SAMN04962906	GSM2147020	SRX1750668	Ion Torrent	996	798	No NaCl T90	No Sal	Single	
	SRR3488629	SAMN04962905	GSM2147019	SRX1750667	Ion Torrent	1,349	1,076	No NaCl T60	No Sal	Single	
	SRR3488628	SAMN04962904	GSM2147018	SRX1750666	Ion Torrent	1,087	871	No NaCl T30	No Sal	Single	
	SRR3488627	SAMN04962903	GSM2147017	SRX1750665	Ion Torrent	913	734	Espora T0	Dormancia	Single	
	SRR3488626	SAMN04962902	GSM2147016	SRX1750664	Ion Torrent	1,214	969	NaCl T90	Sal	Single	
	SRR3488625	SAMN04962901	GSM2147015	SRX1750663	Ion Torrent	1,252	1,000	NaCl T60	Sal	Single	
	SRR3488624	SAMN04962900	GSM2147014	SRX1750662	Ion Torrent	1,320	1,056	NaCl T30	Sal	Single	
	SRR3488623	SAMN04962899	GSM2147013	SRX1750661	Ion Torrent	1,173	940	Espora T0	Dormancia	Single	
	SRR3488622	SAMN04962898	GSM2147012	SRX1750660	Ion Torrent	1,251	1,002	NaCl T30	Sal	Single	
GSE120050	SRR7852779	SAMN10079110	GSM3392543	SRX4703440	Illumina HiSeq 2000	2,203	1,110	Δpnp		Single	Liu et al., 2014
	SRR7852778	SAMN10079112	GSM3392542	SRX4703439	Illumina HiSeq 2000	2,473	1,236	Δpnp		Single	
	SRR7852777	SAMN10079054	GSM3392541	SRX4703438	Illumina HiSeq 2000	7,854	3,941	Δpnp		Single	
	SRR7852776	SAMN10079056	GSM3392540	SRX4703437	Illumina HiSeq 2000	2,405	1,210	Cepa silvestre		Single	
	SRR7852775	SAMN10079057	GSM3392539	SRX4703436	Illumina HiSeq 2000	2,213	1,116	Cepa silvestre		Single	
	SRR7852774	SAMN10079059	GSM3392538	SRX4703435	Illumina HiSeq 2000	1,499	757	Cepa silvestre		Single	

Datos tomados de NCBI, base de datos: Gene Expression Omnibus Database (GEO).

5.4 Establecimiento de las condiciones de germinación y crecimiento de esporas bajo estrés oxidativo usando HgCl₂.

5.4.1 Producción y purificación de esporas

Para analizar perfiles transcriptómicos del tRNA^{Cys} a través de RNA-seq, es necesario el establecimiento preliminar de las condiciones experimentales de germinación de esporas, el medio a utilizar y el grado de estrés inducido por HgCl₂. El primer paso fue la producción y purificación de esporas a grandes cantidades, las cuales después se utilizaron en las cinéticas de germinación. Las esporas de *Bacillus subtilis* PY79 fueron producidas en cultivo líquido en medio de esporulación de Schaeffer modificado con glucosa (2x SG; como se describe en Nicholson y Setlow, 1990), ver apartado de anexos. El medio fue inoculado asépticamente con una asada de biomasa proveniente de un cultivo axénico de 18 horas. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de medio para asegurar buena agitación y oxigenación del cultivo. Estos cultivos para esporulación fueron incubados a 37 °C por siete días y agitación de 150 rpm. Como control, se utilizó un matraz con medio sin inocular. Las esporas fueron recolectadas y lavadas con dH₂O estéril al menos siete veces por centrifugación a 10,000 rpm (5 min). La pureza de los stocks de esporas fue revisada por microscopía (≥ 99 %).

Para evaluar la concentración de esporas (número de esporas por mL⁻¹), se realizó un recuento en placa. Se hicieron diluciones seriadas por duplicado (se usó diluyente de peptona), se tomó 1 mL del stock de esporas para la primera dilución y se inoculó 100 µL de las diluciones 10⁻⁷, 10⁻⁸ y 10⁻⁹ en agar LB, el sembrado se realizó por extensión en placa. La incubación fue a 37 °C por 24 horas, pasado este tiempo se contaron las UFC y se realizó el cálculo considerando el factor de dilución utilizado.

5.4.2 Cinéticas de germinación de esporas y crecimiento

Para realizar los experimentos del efecto del HgCl_2 en la germinación de esporas y crecimiento posterior, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio para germinación compuesto de Medio Mínimo Spizizen (SMM; como se describe en Nicholson y Setlow, 1990) con y sin HgCl_2 , y adicionalmente se añadió al medio L-alanina 10 mM para desencadenar la germinación (Nagler et al., 2014). Antes de inocular el medio mínimo, las esporas fueron activadas por calor a 70°C por 30 min para asegurar una germinación sincronizada (Nicholson y Setlow, 1990). Estos experimentos fueron realizados en 40 mL de medio de germinación (en matraces de 250 mL). Para encontrar la concentración mínima que causa un efecto en la germinación se utilizaron concentraciones de 0.5, 1, 10, 15 y $20\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de HgCl_2 . Se utilizó como control un cultivo de germinación sin HgCl_2 y un blanco sin esporas ni HgCl_2 . El medio fue inoculado con 9.95×10^9 esporas en total y muestras de 700 μL fueron tomadas después de la inoculación a $t_{0\ \text{min}}$, $t_{30\ \text{min}}$, $t_{60\ \text{min}}$ sucesivamente por cuatro horas de incubación para la medición del crecimiento. Para las mediciones espectrofotométricas, la germinación fue llevada a cabo por triplicado y las lecturas de absorbancia fueron hechas a 600 nm ($\text{DO}_{600\ \text{nm}}$) en un espectrofotómetro Dynamica HALO XB-10. Los datos de $\text{DO}_{600\ \text{nm}}$ fueron normalizados por la división de cada lectura entre el primer valor obtenido en $t_{0\ \text{min}}$, resultando en $\text{DO}_{600\ \text{nm}}$ relativa dada en %. Un decremento del 60 % en $\text{DO}_{600\ \text{nm}}$ corresponde a la germinación de la población de esporas completa (Atluri et al., 2006; Nagler et al., 2014).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Perfiles transcriptómicos del tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis* a partir de bases de datos en NCBI

Gran parte de los estudios del tRNA se han basado en el seguimiento de los niveles de tRNA a través de hibridación tipo Northern blot. Las técnicas de hibridación pueden mostrar una cuantificación en masa para algunos tRNAs con el mismo anticodón. Sin embargo, no son capaces de distinguir ciertos grupos anticodón e isodecodificadores que se diferencian sólo por una o unas pocas bases (Dittamar et al., 2006; Fujishima y Kanai, 2014; Goodenbour y Pan, 2006). Además, las matrices y las transferencias Northern no proporcionan información sobre posibles modificaciones de los tRNAs, que se consideran vitales para su función. Con la finalidad de conocer metodologías de purificación y secuenciación de RNA que permitan el análisis fino de moléculas relacionadas con el tRNA^{Cys}, en este trabajo se evaluaron tres transcriptomas de *Bacillus subtilis* disponibles en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus Database) de NCBI, presentadas en el cuadro 2.

A través del alineamiento masivo de lecturas de todas las corridas de secuenciación de RNA reportadas por Schwartz et al., y Liu et al., para *Bacillus subtilis* al genoma de referencia, en ninguna se detectaron lecturas correspondientes al tRNA^{Cys}. La metodología de purificación de RNA del trabajo de Schwartz et al., está diseñada específicamente para la amplificación y secuenciación de tRNAs a través del tratamiento con demetilinas (DM-tRNA-seq) (Schwartz et al., 2018). Se sabe que el tRNA, debido a sus abundantes modificaciones postranscripcionales y su estructura secundaria estable, no se ha secuenciado adecuadamente mediante métodos estándar, ya que estas características interfieren con la síntesis de cDNA y la ligación de adaptadores antes de la secuenciación (Pang et al., 2014a; Zheng et al., 2015). Para solucionar estos problemas, los métodos publicados emplean estrategias de preparación de bibliotecas inteligentes y diversas. DM-tRNA-seq fue el primer protocolo publicado por Zheng et al., específicamente con el propósito de

secuenciar el tRNA (Zheng et al., 2015). Este protocolo utiliza una retrotranscriptasa más procesiva y una demetilasa procariota purificada, AlkB, para eliminar los grupos metilo del tRNA que estropean la actividad de la enzima, aumentando así la abundancia de cadenas de cDNA más largas. Gogakos et al., desarrollaron Hydro-tRNA-seq para aumentar la uniformidad de cobertura a través de la transcripción de tRNA dada a través de una fragmentación limitada de tRNA durante la preparación de la biblioteca para evitar bases modificadas (Gogakos et al., 2017). Shigematsu et al., diseñaron YAMAT-seq, en este protocolo se utiliza un adaptador de doble hebra ligado a los extremos 5' y 3' del tRNA maduro que difiere de la ligación del adaptador no específico (Shigematsu et al., 2017). Pinkard et al., desarrollaron QuantM-tRNA-seq (*Quantitative Mature tRNA sequencing*), el protocolo para secuenciación de tRNA más reciente. Como su nombre lo indica, es una técnica ideada para la secuenciación y análisis de abundancia de tRNAs maduros. Esta técnica aprovecha el 3'-CCA terminal del tRNA funcional, donde se liga con férula para unir un adaptador bicatenario complementario a los terminales 5' y 3', dichos adaptadores son específicos para tRNAs en el rango previsto de 65 a 95 ribonucleótidos y depende tanto de la ligasa como de los adaptadores (Pinkard et al., 2020).

A pesar de estas estrategias innovadoras, todavía existen importantes limitaciones al estado actual de la técnica. Por ejemplo, DM-tRNA-seq se basa en la purificación en gel de tRNA, un paso con potencial para introducir sesgo (Xu et al., 2019). En el trabajo de Schwartz et al., donde utilizaron la misma técnica, se observó además que ciertas familias de tRNAs de bacterias con modificaciones que van del extremo 3' hacia el sitio anticodón no pueden ser amplificadas, ya que tales modificaciones no pueden ser eliminadas por las demetilasas y, por tanto, detienen la transcriptasa inversa termófila y la síntesis de cDNA se anula. Un ejemplo de esto es la modificación ms² i⁶ A37 del tRNA^{Phe} encontrada en *Escherichia coli*. Un trabajo reciente indica que tal modificación también está en ciertos tRNAs de *Bacillus subtilis*, pero en el caso del tRNA^{Cys} no se ha identificado tal modificación, solo metilaciones (de Crécy-Lagard et al., 2020); por lo que no es probable que por esta razón el tRNA^{Cys} no pueda ser amplificado. Sin embargo, se sabe que en *Bacillus subtilis* y

Firmicutes relacionados, existe solamente una copia del gen para tRNA^{Cys} (Campos-Guillén et al., 2010; Hernández-Flores et al., 2020; Zhu y Stülke, 2017), lo que puede sugerir que a diferencia de otros tRNAs, hay menor abundancia de tRNA^{Cys} que pueden ser fácilmente perdidos durante el proceso de purificación de RNA.

Los otros métodos disponibles como el Hydro-tRNA-seq, por su diseño, genera lecturas más cortas que son difíciles de mapear y, por lo tanto, puede estar sesgada la información. Por su parte, YAMAT-seq es incapaz de cuantificar un gran número de tRNA debido al requisito de cDNA de longitud completa, por lo que se selecciona tRNA altamente estructurado y modificado que la retrotranscriptasa no puede amplificar. Por último, el método QuantM-tRNA-seq está diseñado para tRNAs maduros únicamente, por lo que no habría detección de fragmentos de tRNA 5'-tRFs, itRFs, modificaciones incorrectas en el 3' y precursores para los que el CCA no está codificado genéticamente.

El otro transcriptoma evaluado tuvo como objetivo utilizar el análisis RNA-seq para sondear el recambio en el mRNA a nivel global en cepas silvestres y mutantes en PNPasa (Δpnp) de *Bacillus subtilis* (Liu et al., 2014). El mapeo de lecturas de secuenciación de ambas condiciones no arrojó ningún alineamiento para la región del gen de tRNA^{Cys} del genoma de referencia. En ese trabajo se utilizó el protocolo de fenol caliente para la purificación de RNA y después se utilizó el *kit* Ribo-Zero rRNA (Epicentre) para eliminar el rRNA. Aquí la secuenciación estuvo dirigida al mRNA a través de la plataforma Illumina Hiseq 2000, por lo que no se hizo un tratamiento especial para la eliminación de modificaciones de nucleósidos presentes en el tRNA que no permitan la síntesis de cDNA. Otra posible explicación sería, al igual que el caso anterior, por la abundancia de transcritos del gen de tRNA^{Cys} no se recuperan durante la extracción y purificación de RNA, por tanto, no se ven reflejados en la secuenciación.

Por otra parte, en el trabajo de Nagler et al., el mapeo al genoma de referencia si mostró alineamiento de lecturas de secuenciación con el tRNA^{Cys} en todas las corridas de secuenciación y para todas las condiciones de estrés por NaCl

investigadas. En ese trabajo el aislamiento de RNA fue hecho con el método de extracción fenol-cloroformo y tratado con DNAsas, la secuenciación fue a través de la plataforma Ion Torrent. La secuenciación por Ion Torrent es un método de secuenciación de DNA basado en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del DNA. Por tanto, este método se guía a través de la adición de nucleótidos en las cadenas simples de DNA en estudio. Como se puede observar, tal método utilizado no describe la utilización de enzimas especiales para eliminar modificaciones de bases, ya que el protocolo está dirigido para el análisis de transcriptomas a partir de mRNA principalmente y no tanto de tRNAs. Sin embargo, en ese trabajo se encontraron transcritos de ncRNA de al menos 20 genes diferentes que muy probablemente provienen de genes de tRNA, incluido el tRNA^{Cys} (Nagler et al., 2016b). Tales resultados sugieren que el diseño de secuenciación utilizado, de un solo extremo (*single ends*), impactaron en la detección de tRNAs, ya que la secuenciación de un solo extremo produce una lectura por fragmento. Además, se sabe que este diseño de secuenciación puede ser bueno para cuantificar la expresión de RNA pequeño o la expresión a nivel de gen cuando las variantes de corte y empalme no son una preocupación (Hendrix, 2019).

Para proporcionar una visión profunda del procesamiento de tRNA^{Cys} en la espora inactiva y durante el crecimiento en *Bacillus subtilis*, se utilizó la metodología RNA-Seq y la base de datos GEO (GSE81238). El número total de lecturas para todos los experimentos varió de ~7 a ~12 millones, pero un hallazgo interesante es que existe una distribución de lecturas mapeadas para tRNA^{Cys} en todas las condiciones experimentales probadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lecturas mapeadas correspondientes al tRNA^{Cys}

GEO database	Experimento	Total Lecturas	Lecturas mapeadas
SRR3488627	T0	7,395,066	243
SRR3488623	T0	9,593,083	349
SRR3488631	No NaCl T30	11,077,704	414
SRR3488628	No NaCl T30	8,808,097	566
SRR3488632	No NaCl T60	10,264,883	785
SRR3488629	No NaCl T60	10,487,594	823
SRR3488633	No NaCl T90	12,877,261	1,141
SRR3488630	No NaCl T90	8,069,190	683
SRR3488624	NaCl T30	10,215,022	462
SRR3488622	NaCl T30	10,294,457	882
SRR3488634	NaCl T60	9,182,674	760
SRR3488625	NaCl T60	9,468,524	530
SRR3488635	NaCl T90	12,497,964	813
SRR3488626	NaCl T90	9,377,023	712

6.2 Lecturas mapeadas para el tRNA^{Cys} en la espora

Las lecturas asignadas a la región del gen tRNA^{Cys} se usaron para distinguir entre las diferentes etapas del procesamiento de tRNA^{Cys}. Para reducir las contribuciones al análisis por la caída de la polimerasa inducida por las modificaciones durante la metodología de RNA-seq y debido al alto porcentaje de fragmentos cortos de RNA derivados del tRNA^{Cys} (5'-tRFs o 3'-tRFs) que se observaron en el análisis, se caracterizaron todas las lecturas mapeadas para fines estadístico.

Los resultados muestran que la espora latente almacena una población diversa de moléculas de tRNA^{Cys}. Se analizaron un promedio de 296 lecturas mapeadas en esporas inactivas (T0), y al menos nueve categorías se caracterizaron y se representan en la Figura 14.

categoría con el porcentaje más bajo de lecturas (0.34 %) representó tRNAs con el extremo 3' incompleto (categoría II). Las lecturas más abundantes (22.85 %) fueron tRNAs con el CCA correcto en el extremo 3' (categoría III). Un hallazgo interesante fue el porcentaje relativamente alto de lecturas mapeadas (9.47 %) que representan tRNAs con CC en el extremo 3' (categoría IV), lo que sugiere que son tRNAs inmaduros. Se contó un alto porcentaje de lecturas con fragmentos del tipo 3'-tRF con CCA o CC en el extremo 3' (23.19 %) para las categorías V y VI.

Debido al alto número de lecturas mapeadas correspondientes a fragmentos observados en el $t_{0\ min}$ (esporas inactivas) y en comparación con el menor número de lecturas mapeadas en los otros tiempos analizados (ver resultados a continuación), se sugiere que estas lecturas son probablemente fragmentos generados durante la formación de la espora. Si estos fragmentos se degradan posteriormente, podrían soportar la síntesis de RNA de *novο* durante el crecimiento. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que un porcentaje de ellos puedan ser subproductos de caída de polimerasa inducidos por modificación resultantes de la metodología de RNA-seq.

Se observó un porcentaje considerable de lecturas (30.46 %) de fragmentos 5'-tRF y fragmentos internos, que se representan como la categoría VII. Las últimas categorías observadas, VIII y IX, fueron lecturas con colas incorrectas agregadas postranscripcionalmente en moléculas de tRNA^{Cys} completos o fragmentos tipo 3'-tRF. El porcentaje total de estas lecturas fue del 12.16 % y las adiciones se muestran en la Figura 14 (tabla en el lado derecho). Se observó que ambas categorías de moléculas de tRNA^{Cys}, completas o fragmentos 3'-tRF con CCA en el extremo 3', portan nucleótidos adicionales como C o ambos CA, y algunos de ellos con un segundo terminal CCA, también algunos de ellos con colas de poli(A).

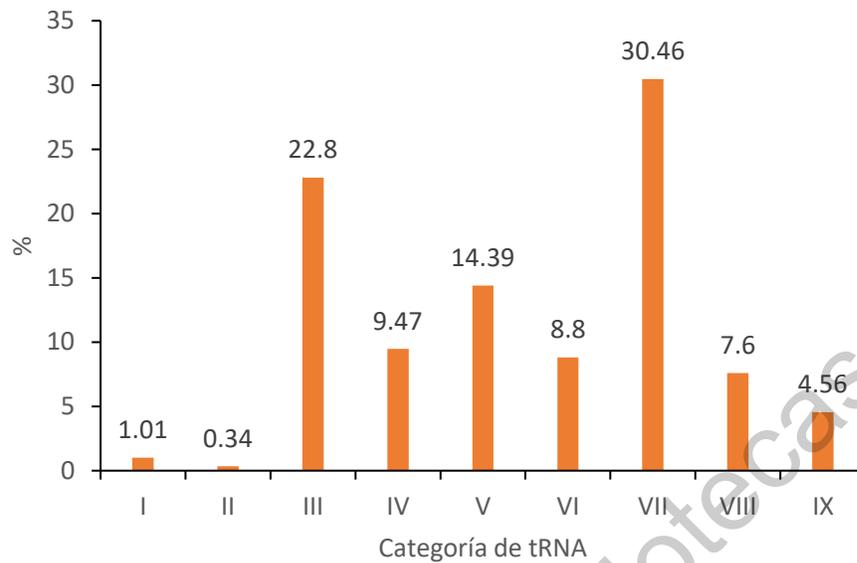


Figura 15. Porcentaje de lecturas almacenadas en endosporas inactivas.

En *Bacillus subtilis*, los genes que codifican para tRNAs están dentro de operones y, por lo tanto, los tRNAs se sintetizan como precursores que experimentan modificaciones postranscripcionales para dar a moléculas funcionales. Estas modificaciones incluyen el procesamiento de 5' y 3' por ribonucleasas, la adición de la secuencia CCA en el extremo 3' de aquellos tRNA que no codifican esta secuencia y la edición postranscripcional de ribonucleósidos.

El gen de tRNA^{Cys} está presente en una única copia en el genoma de *Bacillus subtilis* y está localizado en la parte distal del operón *rmD*. Aquí se encuentran los genes que codifican para moléculas de rRNA (16S, 23S y 5S), además de un *cluster* de genes encontrado río abajo del rRNA 5S (Vold, 1985; Wawrousek et al., 1984). La regulación de la expresión del operón *rmD* está mediada por dos secuencias promotoras consenso σA asociadas (P1 y P2) río abajo del gen para rRNA 16S (Koga et al., 2006). Un tercer promotor consenso σA está localizado en el espacio intergénico 23S-5S y está asociado con mecanismos de respuesta estricta (Vold, 1985; Wawrousek et al., 1984). Diversos informes han revelado que la regulación de la expresión de P1 y P2 se mantiene durante la formación de esporas, y que estos

promotores permanecen activos incluso durante las últimas etapas de la esporulación (De Hoon et al., 2010; Koga et al., 2006; Rosenberg et al., 2012). Otros trabajos han observado ligeras diferencias en la expresión de los promotores P1 y P2 bajo estrés nutricional en células vegetativas (Natori et al., 2009; Samarraï et al., 2011).

En base a estos datos reportados, está claro que la expresión de tRNA^{Cys} bajo el control de los promotores P1 y P2 tiene lugar durante la esporulación y que diversas subpoblaciones de moléculas de tRNA^{Cys} podrían acumularse en esporas latentes. Para ampliar nuestro conocimiento sobre el procesamiento del tRNA en esporas de *Bacillus subtilis* latentes y germinantes, se utilizó la metodología RNA-seq para mostrar la diversidad de moléculas de tRNA^{Cys} que estaban presentes en estas condiciones y en las esporas germinadas en presencia de alta salinidad. Nuestros resultados muestran por primera vez la diversidad de las subpoblaciones de tRNA^{Cys} almacenadas en esporas latentes en *Bacillus subtilis* (Figura 14) y contribuyen al conocimiento del procesamiento de tRNA^{Cys} durante las fases de latencia y crecimiento.

6.3 Distribución de moléculas de tRNA^{Cys} durante la germinación y crecimiento bajo estrés salino

Los resultados muestran que la espora inactiva almacena moléculas de tRNA^{Cys} maduras, lo que podría soportar las fases iniciales de traducción mientras que el proceso de transcripción y el procesamiento de tRNA^{Cys} progresan durante la fase de crecimiento. Por otro lado, los fragmentos pueden degradarse para que los ribonucleótidos obtenidos puedan estar disponibles para la síntesis de ARN de *novo* durante la fase de crecimiento. Por lo tanto, es razonable sugerir que durante la fase de maduración el procesamiento de tRNA progresará y, con el tiempo, la frecuencia de la población de moléculas de tRNA^{Cys} almacenadas en esporas cambiará.

Para comprender la dinámica de la densidad de las moléculas de tRNA^{Cys} durante el proceso de crecimiento, se analizaron las lecturas mapeadas para tRNA^{Cys} a los $t_{30\text{ min}}$, $t_{60\text{ min}}$ y $t_{90\text{ min}}$ después del inicio de la germinación en ausencia y presencia de 1.2 M de NaCl en medio de cultivo. De un total de 9,163 lecturas mapeadas obtenidas durante 90 minutos de crecimiento en ambas condiciones (Cuadro 3), se obtuvo la distribución de cada subpoblación de moléculas de tRNA^{Cys}, representada como el promedio en cada tiempo de muestra y visualizada en la Figura 16.

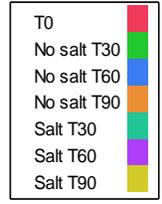
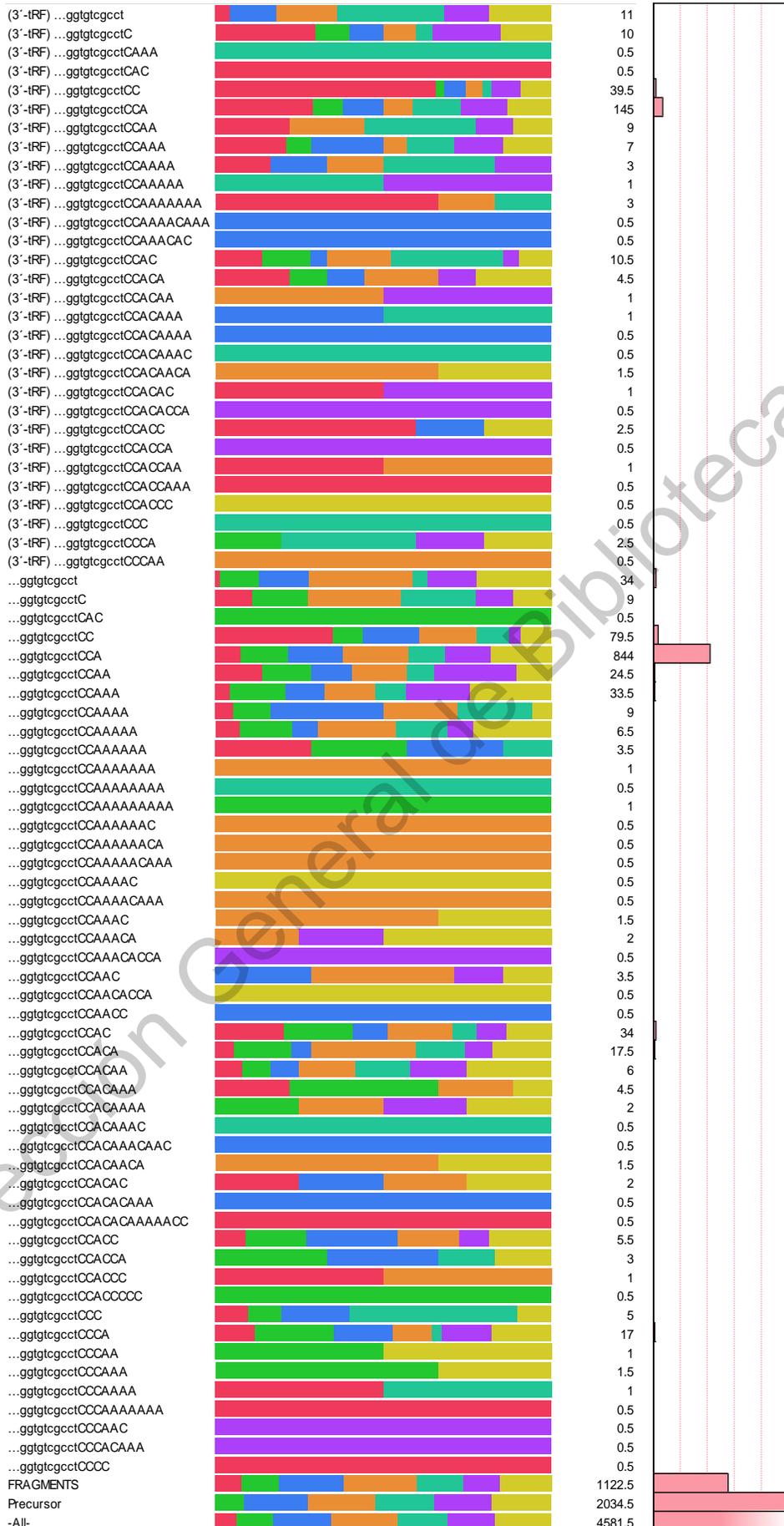
Mientras que algunas subpoblaciones de estas moléculas se observaron con menor frecuencia y se detectaron en al menos una muestra de RNA y en un momento de muestreo, otras subpoblaciones estuvieron presentes en todos los puntos de tiempo analizados. De acuerdo con informes anteriores, se indujo una transcripción robusta durante el crecimiento. Por lo tanto, la subpoblación de precursores de tRNA^{Cys} se acumula en todos los puntos de tiempo analizados y representa una alta frecuencia de moléculas de tRNA de las lecturas mapeadas con un promedio de 2034.5 lecturas mapeadas.

Durante la fase de maduración de la espora (*repening*), es razonable suponer que una alta acumulación de la subpoblación de precursores durante el crecimiento cambiará la subpoblación de formas inmaduras de tRNA^{Cys} (categoría II). Sin embargo, el análisis de lecturas mapeadas muestra una frecuencia más baja con un promedio de 34 lecturas mapeadas. Estos resultados pueden indicar que el procesamiento de tRNA^{Cys} a partir de precursores a través de la actividad de endo o exo-ribonucleasas progresa, en cierta medida, durante la fase de crecimiento para producir las formas inmaduras de tRNA^{Cys} que después están disponibles para la adición de la secuencia CCA. De hecho, la forma madura del tRNA^{Cys} con CCA en su extremo 3' aumentó en abundancia durante la fase de crecimiento, con un promedio de 844 lecturas mapeadas, lo que significa que la actividad de adición de CCA se manifiesta durante la fase de maduración. Nuestros resultados indican que una fracción significativa de las subpoblaciones de tRNA^{Cys} sin extremo CCA, o con extremos C o CC se convierten en tRNA^{Cys} maduros durante el crecimiento.

Moléculas de tRNA^{Cys}

Frecuencia

Media



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Figura 16. Distribución de subpoblaciones de moléculas de tRNA^{Cys} respecto al tiempo. Esporas latentes ($t_0 \text{ min}$) y durante el proceso de crecimiento ($t_{30 \text{ min}}$, $t_{60 \text{ min}}$ y $t_{90 \text{ min}}$) después del inicio de la germinación en ausencia y presencia de 1.2 M de NaCl. En esta gráfica se muestran los últimos diez nucleótidos del tRNA^{Cys} hasta la posición 71, con adiciones correctas o incorrectas en la terminación 3'. Los fragmentos (total 5'-tRF y fragmentos internos), 3'-tRF y precursores se indican en el lado izquierdo. El promedio de lecturas mapeadas para cada subpoblación se indica mediante un número y mediante el gráfico de barras en el lado derecho y su presencia en cada momento muestreado mediante una barra de color en el gráfico.

Sin embargo, se observaron algunas especies inmaduras sin extremos de CCA completos en todos los puntos temporales de crecimiento.

Se observó una subpoblación interesante de moléculas de tRNA^{Cys}, representada por fragmentos o 3'-tRF con diferentes adiciones al final de 3'; juntas estas subpoblaciones representan un promedio de 1365.5 lecturas mapeadas. Estos resultados indican que durante la fase de maduración, la degradación por RNasas es un mecanismo importante para obtener ribonucleótidos para la síntesis de RNA. También es posible que un mecanismo de control de calidad de RNA está operando en esta fase. A este respecto, se observó un promedio de 194 lecturas mapeadas para moléculas de tRNA^{Cys} completas y un promedio de 57 lecturas mapeadas para fragmentos de 3'-tRF con adiciones incorrectas al final del 3'.

6.4 Dinámica de las moléculas de tRNA^{Cys} durante el crecimiento en alta salinidad

Se han reportado efectos sobre la expresión génica en condiciones de alta salinidad para las esporas en crecimiento (Nagler et al., 2016b). Por lo tanto, para comprender si el procesamiento y la degradación de tRNA^{Cys} podrían verse afectados por el crecimiento en presencia de NaCl 1.2 M, las lecturas mapeadas para cada categoría mencionada anteriormente en función de los diversos tiempos de muestra

se compararon con las lecturas mapeadas de los datos obtenidos en ausencia de NaCl. Los resultados de este análisis para lecturas mapeadas mostraron notablemente que los precursores (categoría I) para tRNA^{Cys} aumentaron fuertemente a los 30 minutos después del inicio de la germinación en ambas condiciones investigadas y, en comparación con las lecturas de esporas latentes (*t_{0 min}*). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas en presencia de NaCl. A los 60 y 90 minutos, la acumulación de precursores permanece relativamente estable y ambas condiciones muestran promedios similares de lecturas mapeadas (Figura 17).

Estos resultados significan que durante la fase de maduración de las esporas en crecimiento, la expresión del gen tRNA^{Cys} está sobre regulada. Dada esta observación, se investigó si el aumento de la transcripción de tRNA^{Cys} afectaría diferencialmente una subpoblación particular de moléculas de tRNA^{Cys} relacionadas con los mecanismos de procesamiento. Comenzando con la categoría II, nuestros resultados muestran que para la forma inmadura de tRNA^{Cys} hubo un aumento en la abundancia durante el crecimiento, pero la frecuencia de las lecturas mapeadas no cambia significativamente en presencia o ausencia de NaCl en ningún momento (Figura 17).

El siguiente paso fue investigar si la subpoblación de tRNA^{Cys} con CCA en el extremo 3' (categoría III) se vería afectada durante el estrés salino. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de especies de categoría III en presencia o ausencia de NaCl en ningún momento (Figura 17).

Se obtuvo un resultado intrigante en el análisis de tRNA inmaduro con CC en el extremo 3' (categoría IV). Si bien esa subpoblación de moléculas de tRNA^{Cys} disminuyó drásticamente durante los primeros 30 minutos después del inicio de la germinación en ambas condiciones. En presencia de NaCl la abundancia de esta especie continuó disminuyendo, mientras que en ausencia de NaCl a los 60 minutos esta subpoblación de moléculas de tRNA^{Cys} aumentó algo en abundancia. Estos resultados sugieren que los mecanismos de reparación de CCA pueden estar

operando en ausencia de NaCl para producir tRNA^{Cys} maduros durante esta fase. Si consideramos los resultados para tRNA^{Cys} almacenados en esporas inactivas en t_0 min, las categorías III más IV representan un promedio de 95.5 ± 16 lecturas mapeadas, en comparación con un promedio de 93 ± 1 y 119 ± 12 lecturas mapeadas, respectivamente, para tRNA^{Cys} con CCA en la presencia y ausencia de NaCl a los 30 minutos después del inicio de la germinación. Estas observaciones sugieren que los mecanismos de adición de CCA son operativos en presencia de NaCl, aunque de manera menos eficiente que en su ausencia. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que, en presencia de NaCl, la actividad de la RNasa se pueda redirigir como un mecanismo para obtener ribonucleótidos para apoyar la transcripción en lugar de la reparación de CCA.

Esta última interpretación se correlaciona con los resultados para las subpoblaciones de fragmentos tRNA^{Cys} 3'-tRF con adición de CCA o CC en el extremo 3'. Los niveles para ambas subpoblaciones (categorías V y VI) disminuyeron significativamente, a casi cero en el caso de la Categoría VI, en ambas condiciones durante la fase de crecimiento (Figura 17). La Figura 17 muestra además que los fragmentos de categoría VII aumentaron en abundancia durante el crecimiento en presencia y ausencia de NaCl, pero a un nivel más bajo en presencia de NaCl que el observado en su ausencia.

La abundancia de moléculas de la Categoría VIII aumentó en $t_{30 \text{ min}}$ y luego disminuyó un poco a partir de entonces en ausencia de NaCl, mientras que se observó un aumento continuo en estas moléculas durante el crecimiento en presencia de NaCl. En $t_{90 \text{ min}}$, los niveles de la categoría VIII fueron esencialmente los mismos en presencia y ausencia de NaCl. Los niveles de la Categoría IX disminuyeron durante el crecimiento, inicialmente más dramáticamente en ausencia de NaCl que en su presencia.

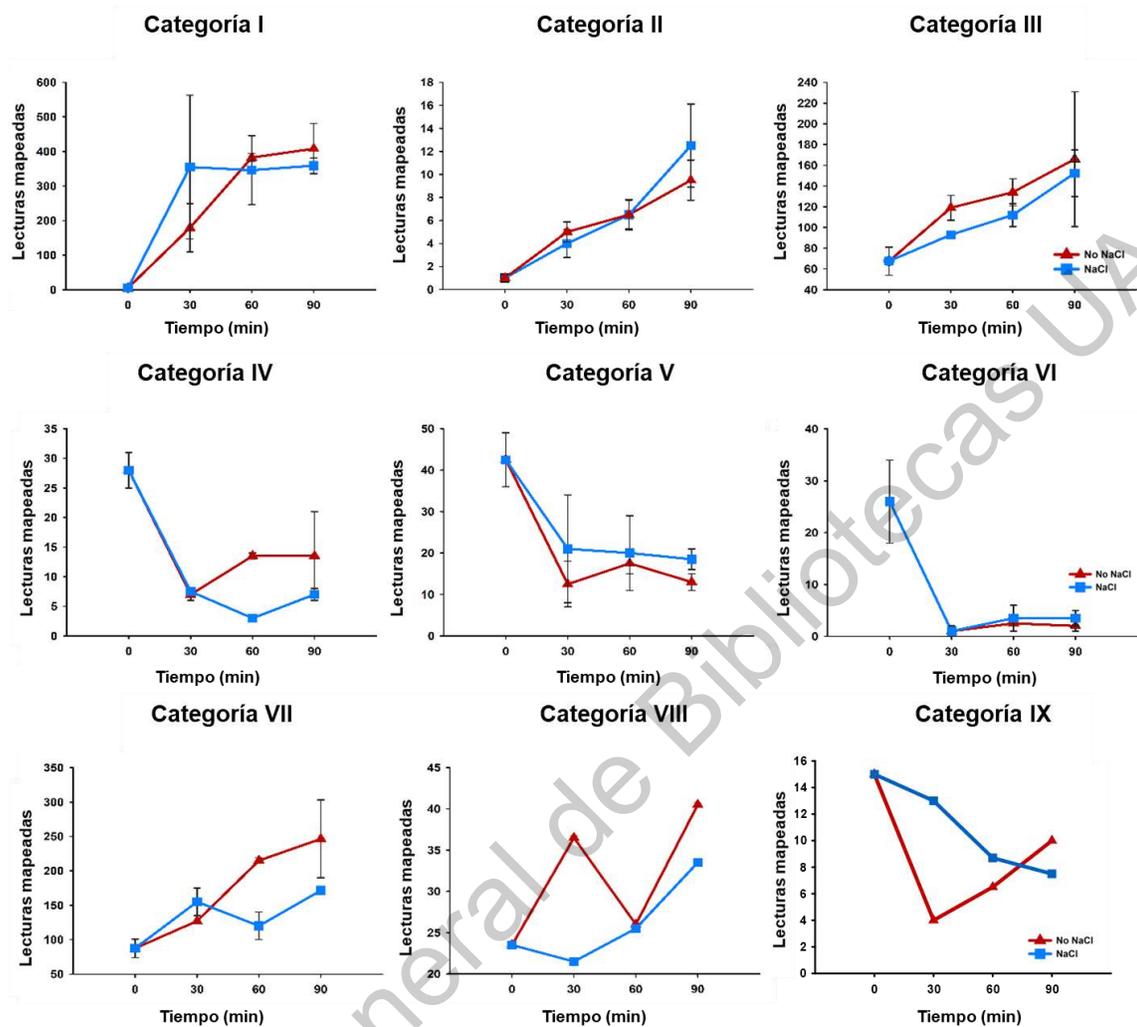


Figura 17. Descripción general de la dinámica de las subpoblaciones de moléculas de tRNA^{Cys} respecto al tiempo de crecimiento en presencia y ausencia de NaCl 1.2 M. Se trazó el promedio de lecturas mapeadas para cada categoría. Las líneas de error representan errores estándar de medias.

Los resultados muestran una generación progresiva y degradación de los fragmentos de tRNA^{Cys} (Figura 17), lo que sugiere que las RNasas están presentes y activas en los diferentes tiempos de muestreo empleados en estos experimentos. De hecho, un reporte reciente de Swarge et al., demostró a través del análisis del proteoma que varias exo-ribonucleasas están presentes en las esporas latentes, incluidas PNPasa, RNasa R, RNasa PH, YhaM, RNasa Y y otras. Mientras que su expresión transcripcional fue reportada a los 15 minutos para PNPasa, YhaM y RNasa Y, y 30 minutos para RNasa R y RNasa PH después del inicio de la germinación (Swarge et al., 2020). Por lo tanto, es probable que estas exo-ribonucleasas restantes de la esporulación desempeñen papeles esenciales en las vías de degradación y/o procesamiento del tRNA durante las fases de esporulación y maduración.

En el caso particular del procesamiento del tRNA en *Bacillus subtilis*, estudios *in vitro* e *in vivo* de las vías endonucleolíticas de RNasa P (Evans et al., 2006; Kurtz et al., 1998) o RNasa Z (Pellegrini et al., 2003) y las rutas exonucleolíticas de RNasa PH, PNPasa, RNasa R o YhaM han sido estudiadas (Oussenko et al., 2005, 2002). De estos estudios queda claro que los precursores de tRNA con extensiones en el extremo 5' son eliminados por RNasa P, mientras que RNasa Z procesa el extremo 3' de casi todos los tRNA que carecen de la secuencia CCA codificada (Pellegrini et al., 2003), y la exonucleasa RNasa PH procesa precursores de tRNA que contienen CCA (Oussenko et al., 2002; Oussenko et al., 2005). El motivo CCA en el extremo 3' es una característica clave de todos los tRNAs maduros y es esencial para el proceso de aminoacilación durante la síntesis de proteínas (Hou, 2010; Wellner et al., 2018). Tales resultados muestran que una subpoblación importante de tRNA maduro con CCA en su extremo 3' se almacena en la espora latente y sus niveles aumentan durante el crecimiento. Se observó un retraso en este aumento en presencia de NaCl, debido quizás a un efecto de la sal sobre la actividad de las enzimas relacionadas con el procesamiento del tRNA^{Cys}. De hecho, hay informes que demuestran los efectos sobre la adición de CCA a tRNA^{Cys} a través de RNasa Z, PNPasa, RNasa R y CCAasa (Campos-Guillén et al., 2019, 2010).

Queda por estudiar cómo se ven afectadas estas enzimas en condiciones de estrés salino durante el crecimiento de esporas, pero Nagler et al., informaron de la interesante observación de que el gen *cca* estaba regulado negativamente durante 90 minutos de crecimiento en presencia de NaCl (Nagler et al., 2016b). Una característica relevante es que el gen *cca* está inmerso en el operón que contiene genes codificantes para bacilitiol (un regulador redox y un glucósido α -anomérico de L-cisteinil-D-glucosamina con ácido L-málico). Estos genes biosintéticos están bajo control del promotor dependiente de σ A. Esto sugiere que la expresión de *cca* y la integridad de la terminación 3' de los tRNAs pueden ser importantes durante el estrés salino (Campos Guillen et al., 2017; Gaballa et al., 2013, 2010).

De acuerdo con reportes anteriores, se detectaron adiciones incorrectas en el extremo 3' del tRNA^{Cys} de *Bacillus subtilis*, lo que sugiere que pueden existir vías alternativas de reparación o degradación en esta bacteria (Campos-Guillén et al., 2010; Campos Guillén et al., 2019). Aunque se observó un alto porcentaje de tRNA maduro con CCA en el extremo 3' en esporas inactivas, se desconoce cuáles moléculas estarían disponibles para apoyar la síntesis inicial de proteínas durante el crecimiento, aún queda también por determinar si este tRNA^{Cys} almacenado está unido a cisteína. Cabe señalar a este respecto que la cisteinil-tRNA sintetasa se detectó en esporas inactivas y su expresión también se detectó a los 60 minutos después del inicio de la germinación (Nagler et al., 2016b; Swarge et al., 2020).

Las respuestas al estrés salino durante la germinación de esporas de *Bacillus subtilis* se han analizado previamente (Nagler et al., 2016b, 2015, 2014; Nagler y Moeller, 2015). A partir de estos estudios, 402 genes relacionados con la respuesta al estrés salino se regulan positivamente, algunos de ellos bajo el control del promotor dependiente de σ A (Nagler et al., 2016b). Por lo tanto, la acumulación observada de precursores de tRNA^{Cys} durante los 90 minutos de crecimiento en nuestro estudio, sugiere que la regulación positiva del operón *rrnD*, gobernada por promotores dependientes de σ A, es importante para la síntesis macromolecular durante el crecimiento. Una pregunta sin respuesta es cuál de los tres promotores de *rrnD* es responsable de esta regulación positiva.

6.5 Establecimiento de las condiciones de germinación y crecimiento de esporas de *Bacillus subtilis* bajo estrés oxidativo

El crecimiento exponencial de *Bacillus subtilis* en presencia de mercurio se ha investigado anteriormente (Cruz-Hernández et al., 2013), pero se sabe poco sobre los efectos del estrés oxidativo causado por mercurio en la germinación y crecimiento de esporas. En nuestro estudio, las esporas de *Bacillus subtilis* PY79 se germinaron con L-alanina en el medio mínimo Spizizen con y sin suplemento de LB al 50 % y con diferentes concentraciones de HgCl₂. Estas concentraciones de HgCl₂ se eligieron de acuerdo con el estudio anterior de Cruz-Hernández et al., sobre la respuesta al mercurio en células vegetativas de *Bacillus subtilis*. En la Figura 18 A se muestra la cinética de germinación de esporas realizada en medio mínimo en DO_{600 nm} relativa en porcentaje en función del tiempo. Se observa una disminución del 60 % de la DO_{600 nm} de acuerdo con resultados de trabajos realizados con estrés salino, donde la disminución fue ligeramente más lenta en presencia de NaCl 1.2 M (Nagler et al., 2014). Tal decremento del 60 % en la DO_{600 nm} relativa corresponde a la germinación de casi toda la población de esporas (Atluri et al., 2006; Nagler et al., 2014), por lo que finalmente casi toda la población completa de esporas germinó exitosamente en el $t_{60 min}$. Durante la germinación, las esporas liberan iones y Ca²⁺-dipicolinato (Ca²⁺-DPA), hidrolizan su corteza y se rehidratan, lo que provoca la pérdida de sus propiedades de refractividad y resistencia (Setlow, 2013), es por ello que hay un decremento del 60 % en la densidad óptica.

En este primer experimento se analizó el efecto del HgCl₂ en concentraciones de 10, 15 y 20 µg mL⁻¹ en el medio mínimo (Figura 18A). Se puede observar un retraso en el tiempo de germinación de las esporas cuando hay HgCl₂ en el medio en comparación del control. Entre más alta es la concentración de HgCl₂, más retraso en germinación hubo. Debido al bajo contenido de nutrientes en el medio mínimo, no se pudo observar crecimiento mediante OD_{600 nm} durante los 180 minutos medidos. El segundo experimento tuvo como objetivo no solo ver el efecto en la germinación y el crecimiento de esporas, sino también ver si la población de células podía

adaptarse y recuperar el crecimiento en presencia de HgCl_2 . Para observar más crecimiento, se le añadió LB 50 % al medio de germinación (Figura 18B). Tal concentración de medio LB, ya ha sido utilizada anteriormente por Cruz-Hernández et al., para estudiar el efecto del mercurio en la fase de crecimiento exponencial de *Bacillus subtilis*, debido principalmente a la biodisponibilidad del mercurio en presencia de componentes complejos como el extracto de levadura y peptona (Cruz Hernández et al., 2013).

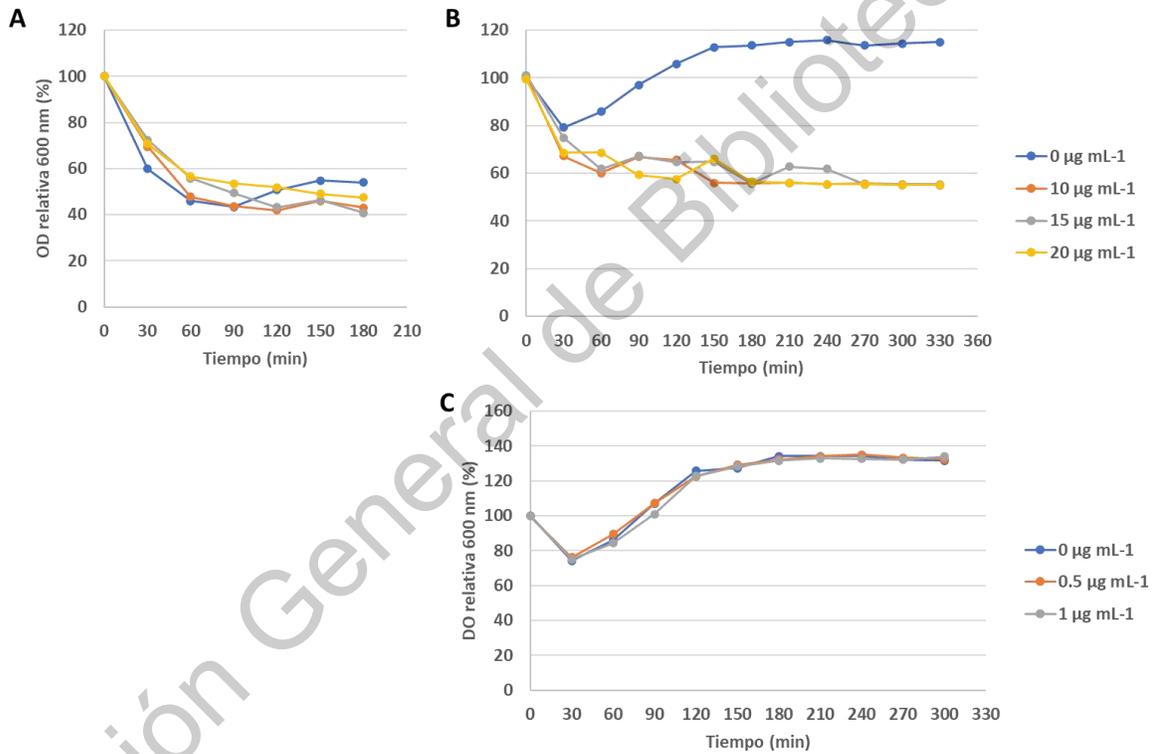


Figura 18. Cinéticas de germinación y crecimiento de esporas de *Bacillus subtilis* en presencia de mercurio. A) germinación en medio mínimo 10, 15 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HgCl_2 . B) germinación y crecimiento en medio mínimo suplementado con LB 50 % 10, 15 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HgCl_2 . C) germinación y crecimiento en medio mínimo suplementado con LB 50 % con 0.5 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HgCl_2 .

En este segundo experimento, así como en el anterior, solamente el control sin HgCl₂ tuvo crecimiento vegetativo. Curiosamente, aquí la germinación no tuvo lugar a un porcentaje cercano al 100 %, ya que en todas las concentraciones probadas aparte del control, la densidad óptica solo tuvo una disminución de poco más del 40 % (excepto el control que solo disminuyó poco más de 20 %) (Figura 18B), por lo que se puede inferir que no toda la población de esporas en el t_0 min germinaron. Aquí, las concentraciones de HgCl₂ tuvieron un efecto citotóxico en las esporas germinadas, por lo que no hubo recuperación del crecimiento. Sin embargo, se realizó un tercer experimento utilizando las mismas condiciones de incubación y la misma formulación del medio Spizizen con LB 50 % pero concentraciones de HgCl₂ más bajas (0.5 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Aquí aparentemente las concentraciones usadas no tuvieron ningún efecto en la germinación de las esporas y el crecimiento posterior, ya que los tratamientos con mercurio siguen el mismo patrón de crecimiento que el control. En el trabajo de Cruz-Hernández et al., la concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de HgCl₂ causó un efecto letal en las células, por lo que el crecimiento exponencial se interrumpió (Cruz Hernández et al., 2013), aquí, tal concentración no afectó el crecimiento (Figura 18C).

En esta parte del establecimiento de las condiciones de germinación y crecimiento de esporas de *Bacillus subtilis* bajo estrés oxidativo, queda por encontrar una concentración de HgCl₂ que afecte el crecimiento, pero que también las células puedan adaptarse y volver al crecimiento. Se busca una concentración que no sea letal pero también que tenga un efecto citostático en *Bacillus subtilis*.

7 CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que las diferentes metodologías de extracción, purificación y secuenciación de RNA impactan en los resultados, aquí, la tecnología de Ion Torren con secuenciación *single ends* tuvo buenos resultados. La capacidad de monitorear cuantitativamente los cambios en la abundancia del tRNA^{Cys} desde la espora inactiva hasta la germinación y el crecimiento es fundamental para comprender estos procesos y las funciones de la transcripción, la modificación postranscripcional y la traducción en ellos. Los resultados reportados aquí usando RNA-seq y análisis de datos, brindan nuevos conocimientos sobre los cambios dinámicos en las subpoblaciones de especies de RNA relacionadas con las moléculas tRNA^{Cys} en las esporas inactivas y durante la germinación y el crecimiento en presencia y ausencia de NaCl 1.2 M. Una pregunta importante sin respuesta es qué papel juegan estas diversas subpoblaciones en la economía metabólica de la espora y en los procesos de germinación y desarrollo. Aquí se mostró por primera vez la diversidad de las subpoblaciones de tRNA^{Cys} almacenadas en esporas de *Bacillus subtilis*.

Las moléculas de tRNA^{Cys} residentes en las esporas se someten a un procesamiento dinámico para producir moléculas funcionales que pueden desempeñar un papel esencial durante la síntesis de proteínas. Se detectaron adiciones incorrectas en el 3' de tRNA^{Cys} en *Bacillus subtilis*, lo que sugiere que pueden existir vías alternativas de reparación o degradación que no se conocen. Los tRNA^{Cys} de esporas se someten a un procesamiento dinámico para producir moléculas funcionales y para sintetizar RNA *de novo*.

El estrés salino produjo solo un efecto modesto sobre la expresión de tRNA^{Cys} y la acumulación de especies relacionadas con tRNA^{Cys}. Los resultados del establecimiento de las condiciones de germinación de esporas y crecimiento demuestran el efecto nocivo del mercurio en estos procesos vitales. El retardo en la germinación sugiere cierta adaptación al estrés oxidativo el cual queda por estudiar.

8 REFERENCIAS

- Abelson, J., Trotta, C.R., Li, H., 1998. tRNA Splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 12685–12688.
- Adamo, P., Iavazzo, P., Albanese, S., Agrelli, D., Vivo, B. De, Lima, A., 2014. Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. *Science of the Total Environment* 500, 11–22.
- Alberts, B., Johnson, A.D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed. Garland Science.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Ilio, C.D., 2009. Glutathione transferases in bacteria. *The FEBS Journal* 276, 58–75.
- Altman, S., 1975. Biosynthesis of transfer RNA in *Escherichia coli*. *Cell* 4, 21–29.
- Altman, S., 1971. Isolation of tyrosine tRNA precursor molecules. *Nature: New Biology* 229, 19–21.
- Altman, S., Kirsebom, L., 1999. Ribonuclease P, in: *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 351–380.
- Altman, S., Smith, J.D., 1971. Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence. *Nature: New Biology* 233, 35–39.
- Andersen, K.R., Jensen, T.H., Brodersen, D.E., 2008. Take the “A” tail-quality control of ribosomal and transfer RNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779, 532–537.
- Anderson, K.L., Dunman, P.M., 2009. Messenger RNA Turnover Processes in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Emerging Studies in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Microbiology* 2009, 525491.
- Anderson, P., Ivanov, P., 2014. tRNA fragments in human health and disease. *FEBS Letters* 588, 4297–4304.

- Andrade-Herrera, M., Escalona-Segura, G., González-Jáuregui, M., Reina-Hurtado, R.A., Vargas-Contreras, J.A., Rendón-Von-Osten, J., 2019. Presence of Pesticides and Toxicity Assessment of Agricultural Soils in the Quintana Roo Mayan Zone , Mexico Using Biomarkers in Earthworms (*Eisenia fetida*). *Water Air Soil Pollution* 230, 1–13.
- Andrade-Linares, D.R., Lehmann, A., Rilling, M.C., 2016. Microbial stress priming: a meta-analysis. *Environmental Microbiology* 18, 1277–1288.
- Antelmann, H., Hecker, M., Zuber, P., 2008. Proteomic signatures uncover thiol-specific electrophile resistance mechanisms in *Bacillus subtilis*. *Expert Review of Proteomics* 5, 77–90.
- Antelmann, H., Helmann, J.D., 2011. Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation. *Antioxidants and Redox Signaling* 14, 1049–1063.
- Apirion, D., Miczak, A., 1993. RNA processing in prokariotic cells. *Bioessays* 15, 113–120.
- Arrieta-Ortiz, M.L., Hafemeister, C., Bate, A.R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., Barry, S.N., Gallitto, M. et al., 2015. An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Molecular Systems Biology* 11, 1–17.
- Asha, P.K., Blouin, R.T., Zaniewski, R. et al., 1983. Ribonuclease BN: identification and partial characterization of a new tRNA processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 3301–3304.
- Asha, P.K., Deutscher, M.P., 1983. *Escherichia coli* CAN lacks a tRNA-processing nuclease. *Journal of Bacteriology* 156, 419–420.
- Atafar, Z., Homae, M., Mahvi, A.H., Mesdaghinia, A., Ahmadimoghaddam, M., Yunesian, M., Nouri, J., 2010. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental Monitoring and Assessment* 160, 83–89.
- Atluri, S., Ragkousi, K., Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2006. Cooperativity between

different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *Journal of Bacteriology* 188, 28–36.

Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N.M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S.S., Ibba, M., 2010. tRNAs: cellular barcodes for amino acids. *FEBS Letters* 584, 387–395.

Bank, M.S., Chesney, E., Shine, J.P., Maage, A., Senn, D.B., 2007. Mercury Bioaccumulation and Trophic Transfer in Sympatric Snapper Species From The Gulf of Mexico. *Ecological Applications* 17, 2100–2110.

Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C., Danchin, A., 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* 155, 1758–1775.

Barciszewska, M.Z., Perrigue, P.M., Barciszewski, J., 2016. tRNA– the golden standard in molecular biology. *Molecular BioSystems* 12, 12–17.

Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 355–384.

Bassi, D., Colla, F., Gazzola, S., Puglisi, E., Delledonne, M., Cocconcelli, S., 2016. Transcriptome analysis of *Bacillus thuringiensis* spore life, germination and cell outgrowth in a vegetable-based food model. *Food Microbiology* 55, 72–85.

Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, B.F., Ouellette, F., 1998. GenBank. *Nucleic Acids Research* 26, 1–7.

Beppu, T., Arima, K., 1969. Induction by mercuric ion of extensive degradation of cellular ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 98, 888–897.

Berntssen, M.H.G., Aatland, A., Handy, R.D., 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology* 65, 55–72.

- Betat, H., Mörl, M., 2015. The CCA-adding enzyme: a central scrutinizer in tRNA quality control. *Bioessays* 37, 975–982.
- Bjork, G.R., 1995. Biosynthesis and function of modified nucleosides, in: Söll, D., RajBhandary, U.L. (Eds.), *TRNA, Structure, Biosynthesis and Function*. ASM Press, Washington, DC., pp. 165–205.
- Bjork, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E., 1987. Transfer RNA modification. *Annual Reviews of Biochemistry* 56, 263–287.
- Bjørklund, G., Dadar, M., Mutter, J., Aaseth, J., 2017. The toxicology of mercury : Current research and emerging trends. *Environmental Research* 159, 545–554.
- Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J.V., Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., Popis, M., Kellner, S., Hölter, S.M., Garrett, L., Wurst, W., Becker, L., Klopstock, T., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabě de Angelis, M. Káradóttir, R.T., Helm, M., Ule, J., Gleeson, J.G., Odom, D.T., Frye, M., 2014. Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO Journal* 33, 2020–2039.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Al., E., 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1474.
- Bloom-Ackermann, Z., Navon, S., Gingold, H., Towers, R., Pilpel, Y., Dahan, O., 2014. A comprehensive tRNA deletion library unravels the genetic architecture of the tRNA pool. *PLoS Genetics* 10, e1004084.
- Bol, D.K., Yasbin, R.E., 1990. Characterization of an Inducible Oxidative Stress System in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 172, 3503–3506.
- Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C.R., Médigue, C., Rocha, E.P.C., Sekowska, A., Vallenet, D., 2018. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial Biotechnology* 11, 3–17.
- Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology*

Reviews 23, 382–398.

Bralley, P., Chang, S.A., Jones, G.H., 2005. A phylogeni of bacterial RNA nucleotidyltransferases: *Bacillus halodurans* contains two RNA nucleotidyltransferases. *Journal of Bacteriology* 187, 5927–5936.

Brännvall, M., Pettersson, B.M.F., Kirsebom, L.A., 2003. Importance of the +73/294 interaction in *Escherichia coli* RNase P RNA substrate complexes for cleavage and metal ion coordination. *Journal of Molecular Biology* 325, 697–709.

Bremer, E., 2002. Adaptation to changing osmolarity, in: Sonnenshein, A.L., Losick, R.M., Hoch, J.A. (Eds.), *Bacillus Subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells. ASM Press, Washington, DC., pp. 385–391.

Brevik, E.C., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., Pereg, L., Quinton, J.N., Six, J., Van Oost, K., 2015. The interdisciplinary nature of Soil. *Soil* 1, 117–129. doi:10.5194/soil-1-117-2015

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3, 3–8.

Cairns, L.S., Hogley, L., Stanley-Wall, N.R., 2014. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology* 93, 587–598.

Cairrão, F., Cruz, A., Mori, H., Arraiano, C.M., 2033. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Molecular Microbiology* 50, 1349–1360.

Campos-Guillén, J., Arvizu-Gómez, J.L., Jones, G.H., Hernández-Flores, J.L., Ramos-López, M.A., Cruz Hernández, A., Romero Gómez, S., 2019. Analysis of tRNACys processing in the absence of CCAase in *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 50, 613–618.

Campos-Guillén, J., Arvizu-Gómez, J.L., Jones, G.H., Olmedo-Alvarez, G., 2010. Characterization of tRNACys processing in a conditional *Bacillus subtilis* CCase

mutant reveals the participation of RNase R in its quality control. *Microbiology* 156, 2102–2111.

Campos-Guillen, J., Bralley, P., Jones, G.H., Bechhofer, D.H., Olmedo-Alvarez, G., 2005. Addition of Poly (A) and Heteropolymeric 3' Ends in *Bacillus subtilis* Wild-Type and Polynucleotide Phosphorylase-Deficient Strains. *Journal of Bacteriology* 187, 4698–4706.

Campos Guillen, J., Jones, G., Saldaña Gutiérrez, C., Hernández-Flores, J., Cruz Medina, J., Valenzuela Soto, J., Pacheco Hernández, S., Romero Gómez, S., Morales Tlalpan, V., 2017. Critical Minireview: The Fate of tRNACys during Oxidative Stress in *Bacillus subtilis*. *Biomolecules* 7, 6.

Cano, R.J., Borucki, M.K., 1995. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. *Science* 268, 1060–1064.

Cao, M., Wang, T., Ye, R., Helmann, J.D., 2002. Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* SigW and SigM regulons. *Molecular Microbiology* 45, 1267–1276.

Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., Losick, R., 2008. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 67, 254–263.

Chattopadhyay, P., Banerjee, G., Mukherjee, S., 2017. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. *Biotechnology* 7, 1–11.

Chen, L., Keramati, L., Helmann, J.D., 1995. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 8190–8194.

Chen, M., Mikecz, A. Von, 2000. Specific Inhibition of rRNA Transcription and Dynamic Relocation of Fibrillarins Induced by Mercury. *Experimental Cell Research* 238, 225–238.

Cheng, Z.F., Deutscher, M.P., 2002. Purification and characterization of the

- Escherichia coli exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. Journal of Biological Chemistry 277, 21624–21629.
- Clarkson, T., Magos, L., Myers, G., 2003. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. New Engl J Med 349, 1731–1737.
- Clough, E., Barrett, T., 2016. The Gene Expression Omnibus database. Methods in Molecular Biology 1418, 93–110.
- Çolak, F., Atar, N., Yazicioğlu, D., Olgun, A., 2011. Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. Chemical Engineering Journal 173, 422–428.
- Condon, C., 2003. RNA Processing and Degradation in *Bacillus subtilis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, 157–174.
- Cortés, M., Fuchs, F.M., Commichau, F.M., Eichenberger, P., Schuerger, A.C., Nicholson, W.L., Setlow, P., Moeller, R., 2019. *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Simulated Mars Surface Conditions. Frontiers in Microbiology 10, 1–16.
- Cruz Hernández, A., Millán, E.S., De Jesús Romero Gómez, S., Antonio Cervantes Chávez, J., García Martínez, R., Pastrana Martínez, X., Gómez, J.L.A., Jones, G.H., Guillén, J.C., 2013. Exposure of *Bacillus subtilis* to mercury induces accumulation of shorter tRNACys species. Metallomics 5, 398–403.
- Cudny, H., Deutscher, M.P., 1980. Apparent involvement of ribonuclease D in the 3' processing of tRNA precursors. Proceedings of the National Academy of Sciences 77, 837–841.
- Cummings, N.J., Connerton, I.F., 1997. The *Bacillus subtilis* 168 chromosome from *sspE* to *katA*. Microbiology 143, 1855–1859.
- Czech, A., Wende, S., Mörl, M., Pan, T., Ignatova, Z., 2013. Reversible and rapid transfer-RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress. PLoS Genetics 9, e1003767.
- Davey, M.E., Toole, G.A.O., 2000. Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular

- Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 847–867.
- de Crécy-Lagard, V., Ross, R.L., Jaroch, M., Marchand, V., Eisenhart, C., Brégeon, D., Motorin, Y., Limbach, P.A., 2020. Survey and Validation of tRNA Modifications and Their Corresponding Genes in *Bacillus subtilis* sp. *Subtilis* Strain 168. *Biomolecules* 10, 977.
- De Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Current Biology* 20, R735–R745.
- de Nadal, E., Ammerer, G., Posas, F., 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics* 12, 833–845.
- del Cardayre, S.B., Stock, K.P., Newton, G.L., Fahey, R.C., Davies, J.E., 1998. Coenzyme A disulfide reductase, the primary low molecular weight disulfide reductase from *Staphylococcus aureus*. Purification and characterization of the native enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5744–5751.
- Demple, B., Harrison, L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual Reviews of Biochemistry* 63, 915–948.
- Deutscher, M.P., 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Research* 34, 659–666.
- Deutscher, M.P., 2003. Degradation of stable RNA in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45041–45044.
- Deutscher, M.P., Lin, J.J., Evans, J.A., 1977. Transfer RNA metabolism in *Escherichia coli* cells deficient in tRNA nucleotidyltransferase. *Journal of Molecular Biology* 117, 1081–1094.
- Deutscher, M.P., Marlor, C.W., 1985. Purification and characterization of *Escherichia coli* RNase T. *Journal of Biological Chemistry* 260, 7067–7071.
- Deutscher, M.P., Marlor, C.W., Zaiewski, R., 1985. RNase T is responsible for the end-turnover of tRNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 6424–6430.

- Deutscher, M.P., Marlor, C.W., Zaiewski, R., 1984. Ribonuclease T: new exoribonuclease possibly involved in end-turnover of tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 4290–4293.
- Dittamar, K.A., Goodenbour, J.M., Pan, T., 2006. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS Genetics* 2, e221.
- Dittamar, K.A., Mobley, E.M., Radek, A.J., Pan, T., 2004. Exploring the regulation of tRNA distribution on the genomic scale. *Journal of Molecular Biology* 337, 31–47.
- Dixit, V., Bini, E., Drozda, M., Blum, P., 2004. Mercury Inactivates Transcription and the Generalized Transcription Factor TFB in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1993–1999.
- Dowds, B.C.A., 1994. The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 124, 255–264.
- Dubnau, D., Mirouze, N., 2013. Chance and necessity in *Bacillus subtilis* development. *Microbiology Spectrum* 1, TBS-0004-2012.
- Duechler, M., Leszczynska, G., Sochacka, E., Nawrot, B., 2016. Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 3075–3095.
- Dupasquier, M., Kim, S., Halkidis, K., Gamper, H., Hou, Y.M., 2008. tRNA integrity is a prerequisite for rapid CCA addition: implication for quality control. *Journal of Molecular Biology* 379, 579–588.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2010. *NIH Public Access* 16, 1–11.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Eijlander, R.T., De Jong, A., Krawczyk, A.O., Holsappel, S., Kuipers, O.P., 2014. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 42, D685–D691.

- El Yacoubi, B., Bailly, M., de Crecy-Lagard, V., 2012. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual Reviews of Genetics* 46, 69–95.
- Elliott, D., Lodomery, M., 2016. *Molecular Biology of RNA*, 2nd ed. Oxford University Press, UK.
- Emera, M.M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G.F., Anderson, P., 2010. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *Journal of Biological Chemistry* 285, 10959–10968.
- Errington, J., 2003. Regulation of Endospore Formation in *Bacillus Subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117–126.
- Errington, J., Aart, L.T., 2020. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology* 166, 425–427.
- Evans, D., Marquez, S.M., Pace, N.R., 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends in Biochemical Sciences* 31, 333–341.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 15, 385–396.
- Fahey, R.C., 2001. Novel thiols of prokaryotes. *Annual Reviews of Microbiology* 55, 333–356.
- Fajardo-Cavazos, P., Link, L., Melosh, H.J., Nicholson, W.L., 2005. *Bacillus subtilis* spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: implications for Lithopanspermia. *Astrobiology* 5, 726–736.
- Farina, M., Avila, D.S., Da Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International* 62, 575–594.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., Youngman, P., 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97, 8063–8068.

Figueiredo, N.L.L., Areias, A., Mendes, R., Canário, J., Duarte, A., Carvalho, C., 2014. Resistant Bacteria From Salt Marsh of Tagus Estuary : The Influence of Plants Presence and Mercury Contamination Levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 77, 959–971.

Finan, J.D., Guilak, F., 2010. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *Journal of Cell Biochemistry* 109, 460–467.

Flemming, H., 1993. Biofilms and Environmental Protection. *Water Science and Technology* 27, 1–10.

Foretek, D., Wu, J., Hopper, A.K., Boguta, M., 2016. Control of *Saccharomyces cerevisiae* pre-tRNA processing by environmental conditions. *RNA* 22, 339–349.

Frank, D.N., Pace, N.R., 1998. Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annual Reviews of Biochemistry* 67, 153–180.

Frossard, A., Donhauser, J., Mestrot, A., Gygax, S., Baath, E., Frey, B., 2018. Long- and short-term effects of mercury pollution on the soil microbiome. *Soil Biology and Biochemistry* 120, 191–199.

Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., Zheng, X., 2009. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* 583, 437–442.

Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., Helmann, J.D., 2001. OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183, 4134–4141.

Fujishima, K., Kanai, A., 2014. tRNA gene diversity in the three domains of life. *Frontiers in Genetics* 5, 1–11.

Gaballa, A., Antelmann, H., Hamilton, C.J., Helmann, J.D., 2013. Regulation of *Bacillus subtilis* bacillithiol biosynthesis operons by Spx. *Microbiology* 159(Pt 10), 2025–2035.

- Gaballa, A., Newton, G.L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R.C., Helmann, J.D., 2010. Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107, 6482–6486.
- García, R., Cruz, J.A., Campos, J., Raynal, M.E., Calderón, M.E., Buitrón, G., 2016. Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp. strains isolated from industrial waste activate sludge. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 19, 5–14.
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Kunzi, A., Polacek, N., 2012. tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. Archaea 2012, 1–11.
- Genchi, G., Sinicropi, M.S., Carocci, A., Lauria, G., Catalano, A., 2017. Mercury Exposure and Heart Diseases. International Journal of Environmental Research and Public Health 14, 1–13.
- Giegé, R., 2006. The early history of tRNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. Journal of Biosciences 31, 477–488.
- Giegé, R., Springer, M., 2016. Aminoacyl-tRNA Synthetases in the Bacterial World. EcoSal Plus 7.
- Gingold, H., Pilpel, Y., 2011. Determinants of translation efficiency and accuracy. Molecular Systems Biology 7, 481.
- Goel, A.K., 2015. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. World Journal of Clinical Cases 3, 20–33.
- Gogakos, T., Brown, M., Garzia, A., Meyer, C., Hafner, M., Tuschl, T., 2017. Characterizing expression and processing of precursor and mature human tRNAs by hydro-tRNA-seq and PAR-CLIP. Cell Reports 20, 1463–1475.
- Gonçalves, C., Nacke, H., Schwantes, D., Ferreira-Coelho, G., 2014. Heavy Metal Contamination in Brazilian Agricultural Soils due to Application of Fertilizers, in:

- Hernandez-Soriano, M.C. (Ed.), Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. IntechOpen, United Kingdom, pp. 105–135.
- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., Tiwari, S., 2016. Alleviation of mercury toxicity in wheat by the interaction of mercury-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 35, 1000–1012.
- Goodenbour, J.M., Pan, T., 2006. Diversity of tRNA genes in eukariotes. *Nucleic Acids Research* 34, 6137–6146.
- Górny, D., Guzik, U., Hupert-kocurek, K., Wojcieszynska, D., 2019. Ecotoxicology and Environmental Safety Naproxen ecotoxicity and biodegradation by *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 167, 505–512.
- Granum, P.E., Stenfors Arnesen, L., From, C., 2013. Bacteria: *Bacillus cereus* and Other Pathogenic *Bacillus* Species, *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier Ltd.
- Grosjean, H., 2009. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution, 1st ed. Landes Bioscience, Austin, TX.
- Guerout-Fleury, A.M., Frandsen, N., Stragier, P., 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180, 57–61.
- Haldenwang, W.G., 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews* 59, 1–30.
- Hartmann, R.K., Göbringer, M., Späth, B., Fischer, S., Marchfelder, A., 2009. The making of tRNAs and more - RNase P and tRNase Z. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 85C, 319–368.
- Harwood, C.R., Wipat, A., 1996. Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters* 389, 84–87.
- Hatting, J.L., Moore, S.D., Malan, A.P., 2018. Microbial control of phytophagous invertebrate pests in South Africa : Current status and future prospects. *Journal of Invertebrate Pathology* 1–13.

- Hayakawa, H., Kuwano, M., Sekiguchi, M., 2001. Specific binding of 8-oxoguanine-containing RNA to polynucleotide phosphorylase protein. *Biochemistry* 40, 9977–9982.
- Hayakawa, H., Sekiguchi, M., 2006. Human polynucleotide phosphorylase protein in response to oxidative stress. *Biochemistry* 45, 6749–6755.
- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U., 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 61, 215–236.
- Helmann, J.D., Wu, M.F., Gaballa, A., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Fawcett, P., Paddon, C., 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *Journal of Bacteriology* 185, 243–253.
- Hendrix, D.A., 2019. *Applied Bioinformatics*, 1st ed. Oregon State University, Oregon, USA.
- Herbig, A.F., Helmann, J.D., 2001. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Molecular Microbiology* 41, 849–859.
- Hernández-Flores, J.L., Salinas-Landaverde, D., Pacheco-Huerta, Y., Guerra-Castillo, V.L., Barrios-Sanchez, M.A., Arvizu-Hernández, I., Ramos-López, M.A., Álvarez-Hidalgo, E., Jones, G.H., Campos-Guillén, J., 2020. Phylogenetic Analysis of *Bacillus cereus* sensu lato Isolates from Commercial Bee Pollen Using tRNACys-PCR. *Microorganisms* 8, 1–12.
- Higgins, D., Dworkin, J., 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 131–148.
- Ho, J.M., Bakalbasi, E., Söll, D., Miller, C.A., 2018. Drugging tRNA aminoacylation. *RNA Biology* 15, 667–677.
- Hoffmann, T., Bremer, E., 2016. Management of osmotic stress by *Bacillus subtilis*:

genetics and physiology, in: de Bruijn, F. (Ed.), Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria. Wiley/Blackwell, Hoboken, NJ., pp. 657–676.

Holmes, P., Hames, K., Levy, L., 2009. Is low-level mercury exposure of concern to human health?. *Sci Total Environ.* 408, 171–182.

Honda, S. et al, 2015. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 3816–3825.

Höper, D., Bernhardt, J., Hecker, M., 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* 6, 1550–1562.

Höper, D., Völker, U., Hecker, M., 2005. Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187, 2810–2826.

Hopper, A.K., 2013. Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 43–67.

Hopper, A.K., Phizicky, E.M., 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes and Development* 17, 162–180.

Horsburgh, M.J., Thackray, P.D., Moir, A., 2001. Transcriptional responses during outgrowth of *Bacillus subtilis* endospores. *Microbiology* 147, 2933–2941.

Hou, Y.M., 2010. CCA addition to tRNA: implications for tRNA quality control. *IUBMB Life* 62, 251–260.

Houston, M.C., 2014. The role of mercury in cardiovascular disease. *Cardiovascular Diseases & Diagnosis* 2, 1–11.

Hrycay, E.G., Bandiera, S.M., 2015. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer, in: Hardwick, J.P. (Ed.), *Advances in Pharmacology*. Academic Press, New, pp. 35–84.

- Hu, Y., Cheng, H., 2016. Control of mercury emissions from stationary coal combustion sources in China: Current status and recommendations. *Environmental Pollution* 218, 1209–1221.
- Huang, C.C., Chien, M.F., Lin, K.H., 2010. Bacterial mercury resistance of TnMER11 and its application in bioremediation. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry* 3, 21–29.
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C.L., Lu, G.N., Gu, R.R., Liu, H.J., Zhang, H., 2013. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 107, 11–18.
- Hussein, H.S., Ruis, O.N., Terry, N., Daniell, H., 2007. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. *Environmental Science and Technology* 41, 8439–8446.
- Ibba, M., Söll, D., 2000. Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Reviews of Biochemistry* 69, 617–650.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 11, 443–454.
- Inokuchi, H., Yamao, F., 1995. Structure and expression of prokaryotic tRNA genes, in: Söll, D., RajBhandary, U. (Eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. ASM Press, Washington, pp. 456–489.
- Ivanov, P., Emera, M.M., Villen, J., Gygi, S.P., Anderson, P., 2011. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Molecular Cell* 185, 613–623.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7, 60–72.

- Jan, A.T., Ali, A., Haq, Q.M.R., 2011. Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Journal of postgraduate medicine* 57, 72.
- Jan, A.T., Murtaza, I., Ali, A., Haq, Q.M.R., 2009. Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1529–1537.
- Jarosławiecka, A., Piotrowska-Seget, Z., 2014. Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology* 12–25.
- Jothivasan, V.K., Hamilton, C.J., 2008. Mycothiol: synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes. *Natural Product Reports* 25, 1091–1117.
- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A. et al., 2010. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology* 6, 364.
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. k., Sprinzl, M., Stadler, P.F., Pütz, J., 2009. tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Research* 37, D159-162.
- Kalev, S.D., Toor, G.S., 2018. The Composition of Soils and Sediments, in: *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. pp. 339–357.
- Kapp, L.D., Lorsch, J.R., 2004. The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annual Review of Biochemistry* 73, 657–704.
- Kaufmann, G., 2000. Anticodon nucleases. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 70–74.
- Keam, S.P., Hutvagner, G., 2015. tRNA-Derived Fragments (tRFs): Emerging New Roles for an Ancient RNA in the Regulation of Gene Expression. *Life* 5, 1638–1651.
- Kearns, D.B., Chu, F., Branda, S.S., Kolter, R., Losick, R., 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 55, 739–749.

- Keijser, B.J.F., Ter Beek, A., Rauwerda, H., Schuren, F., Montijn, R., van der Spek, H. et al., 2007. Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *Journal of Bacteriology* 189, 3624–3634.
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Pogliano, K., 2020. Shaping an Endospore: Architectural Transformations During *Bacillus subtilis* Sporulation. *Annual Review of Microbiology* 75, 361–386.
- Kim, L., Mogk, A., Schumann, W., 1996. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* 181, 71–76.
- Kirchner, S., Ignatova, Z., 2015. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nature Reviews Genetics* 16, 98–112.
- Klassen, R., Paluszynski, J.P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J., Meinhardt, F., 2008. The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA(Gln). *Molecular Microbiology* 69, 681–697.
- Koga, K., Ikegami, A., Nakasone, K., 2006. Construction of *Bacillus subtilis* strains carrying the transcriptional *bgaB* fusion with the promoter region of each *rrn* operon and their differential transcription during spore development. *The Journal of General and Applied Microbiology* 52, 119–124.
- Koo, B.M., Kritikos, G., Farelli, J.D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J.M., Hachmann, A.B., Rudner, D.Z., Allen, K.N., Typas, A., Gross, C.A., 2017. Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Systems* 4, 291–305.
- Krebs, J.E., Goldstein, E.S., Kilpatrick, S.T., 2018. *Lewin's Genes*, 12th ed. Jones and Bartlett Publishers, Burlington, Massachusetts, USA.
- Krebs, J.E., Kilpatrick, S.T., Goldstein, E.S., 2009. *Lewin's Essential Genes*, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, New York.
- Kubyshkin, V., Acevedo-Rocha, C.G., Budisa, N., 2018. On universal coding events in protein biogenesis. *Biosystems* 164, 16–25.

- Kuhn, C.-D., 2016. RNA versatility governs tRNA function: why tRNA flexibility is essential beyond the translation cycle. *Bioessays* 38, 465–473.
- Kuhn, D.-D., Wilusz, J.E., Zheng, Y., Beal, P.A., Joshua-Tor, L., 2015. On-enzyme refolding permits small RNA and tRNA surveillance by the CCA-adding enzyme. *Cell* 160, 644–658.
- Kültz, D., 2007. Osmotic stress sensing and signaling in animals. *The FEBS Journal* 274, 5781–5781.
- Kumar, P., Mudunuri, S.B., Anaya, J., Dutta, A., 2015. tRFdb: A database for transfer RNA fragments. *Nucleic Acids Research* 43, 141–145.
- Kumar, V., Sharma, A., Kaur, P., Preet, G., Sidhu, S., Bali, A.S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., Cerda, A., 2019. Pollution assessment of heavy metals in soils of India and ecological risk assessment: A state-of-the-art. *Chemosphere* 449–462.
- Kunst, F. et. a., 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *nature* 390, 249–256.
- Kurtz, J.C., Niranjankumari, S., Fierke, C.A., 1998. Protein component of *Bacillus subtilis* RNase P specifically enhances the affinity for precursor-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* 37, 2393–2400.
- Lackner, D.H., Schmidt, M.W., Wu, S., Wolf, D.A., Bahler, J., 2012. Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biology* 13, R25.
- Lal, R., 2015. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability* 7, 5875–5895.
- Lechat, P., Hummel, L., Rousseau, S., Moszer, I., 2008. GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes. *Nucleic Acids Research* 36, 469–474.
- Lee, J.W., Helmann, J.D., 2006a. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363–367.

- Lee, J.W., Helmann, J.D., 2006b. Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *Journal of Biological Chemistry* 281, 23567–23578.
- Lee, J.W., Soonsanga, S., Helmann, J.D., 2007. A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 8743–8748.
- Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., A, D., 2009. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes and Development* 23, 2639–2649.
- Leelakriangsak, M., Huyen, N.T., Towe, S., van Duy, N., Becher, D., Hecker, M., Antelmann, H., Zuber, P., 2008. Regulation of quinone detoxification by the thiol stress sensing DUF24=MarR-like repressor, YodB in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 67, 1108–1124.
- Li, H., 2007. Complexes of tRNA and maturation enzymes: shaping up for translation. *Current Opinion in Structural Biology* 17, 293–301.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Li, P., Du, B., Chan, H.M., Feng, X., Li, B., 2018. Mercury bioaccumulation and its toxic effects in rats fed with methylmercury polluted rice. *Science of the Total Environment* 633, 93–99.
- Li, Y., Zhou, H., 2009. tRNAs as regulators in gene expression. *Science China Life Sciences* 52, 245–252.
- Li, Z., Deutscher, M.P., 2002. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* 8, 97–109.
- Li, Z., Deutscher, M.P., 1996. Maturation pathways for *E. coli* tRNA precursors: A random multienzyme process in vivo. *Cell* 86, 503–512.
- Li, Z., Deutscher, M.P., 1995. The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92,

6883–5886.

- Li, Z., Ma, Z., Jan, T., Kuijp, V. Der, Yuan, Z., Huang, L., 2014. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. *Science of the Total Environment* 468–469, 843–853.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M.P., 1999. Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA* 5, 139–146.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M.P., 1998a. Polyadenylation of stable RNA precursors in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 12158–12162.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M.P., 1998b. 3' exoribonucleotic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 2656–2861.
- Li, Z., Reimers, S., Pandit, S., Deutscher, M.P., 2002. RNA quality control: degradation of defective transfer RNA. *The EMBO Journal* 21, 1132–1138.
- Li, Z., X., G., Joshi, V., Li, M., 2005. Co-evolution of tRNA 3' trailer sequences with 3' processing enzymes in bacteria. *RNA* 11, 567–577.
- Liebeke, M., Pother, D.C., van Duy, N., Albrecht, D., Becher, D., Hochgrafe, F., Lalk, M., Hecker, M., Antelmann, H., 2008. Depletion of thiol-containing proteins in response to quinones in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 69, 1513–1529.
- Lindberg, S.E., Kim, K., Munthe, J., 1995. The Precise Measurement of Concentration Gradients of Mercury in Air Over Soils: A Review of Past and Recent Measurements. *Water, Air, and Soil Pollution* 80, 383–392.
- Liu, B., Deikus, G., Bree, A., Durand, S., Kearns, D.B., Bechhofer, D.H., 2014. Global analysis of mRNA decay intermediates in *Bacillus subtilis* wild-type and polynucleotide phosphorylase-deletion strains. *Molecular Microbiology* 94, 41–55.
- Liu, H., Bergman, N.H., Thomason, B., Shallom, S., Hazen, A., Crossno, J., Rasko, D.A., Ravel, J., Read, T.D., Peterson, S.N., Iii, J.Y., Hanna, P.C., 2004.

- Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore. *Journal of Bacteriology* 186, 164–178.
- Liu, H., Zhou, J., Li, M., Hu, Y., Liu, X., Zhou, J., 2019. Study of the bioavailability of heavy metals from atmospheric deposition on the soil-pakchoi (*Brassica chinensis* L.) system. *Journal of Hazardous Materials* 362, 9–16.
- Loher, P., Telonis, A.G., Rigoutsos, I., 2017. MINTmap: fast and exhaustive profiling of nuclear and mitochondrial tRNA fragments from short RNA-seq data. *Scientific Reports* 7, 1–20.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 152–163.
- Lorenz, C., Lünse, C., Mörl, M., 2017. tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules* 7.
- Lu, Q., Chen, K., Long, Y., Liang, X., He, B., Yu, L., Ye, J., 2019. Benzo(a)pyrene degradation by cytochrome P450 hydroxylase and the functional metabolism network of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Hazardous Materials* 366, 329–337.
- Lu, X., Liu, Y., Johs, A., Zhao, L., Wang, T., Yang, Z., Lin, H., Elias, D.A., Pierce, E.M., Liang, L., Barkay, T., Gu, B., 2016. Anaerobic Mercury Methylation and Demethylation by *Geobacter bemidjensis* Bem. *Environmental Science and Technology* 50, 4366–4373.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 224, 164–175.
- Mäder, U., Schmeisky, A.G., Flórez, L.A., Stülke, J., 2012. SubtiWiki—a comprehensive community resource for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 40, D-1278-1287.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Naidu, R., Andrews, S., Megharaj, M., 2017. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecological Indicators* 74, 451–462.
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., Gohar, M., 2016. *Bacillus cereus* Biofilms-same,

only different. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16.

Malar, S., Sahi, S.V., Favas, P.J.C., Venkatachalam, P., 2014. Mercury heavy-metal-induced physiochemical changes and genotoxic alterations in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4597–4608.

Male, Y.T., Reichelt-Brushett, A.J., Pocock, M., Nanlohy, A., 2013. Recent mercury contamination from artisanal gold mining on Buru Island, Indonesia – Potential future risks to environmental health and food safety. *Marine Pollution Bulletin* 77, 428–433.

Marck, C., Grosjean, H., 2002. tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* 8, 1189–1232.

Marles-Wright, J., Lewis, R.J., 2007. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology* 17, 755–760.

Martin, H.A., Porter, K.E., Vallin, C., Ermi, T., Contreras, N., Pedraza-Reyes, M., Robledo, E.A., 2019. Mfd protects against oxidative stress in *Bacillus subtilis* independently of its canonical function in DNA repair. *BMC Microbiology* 19.

Masaki, H., Ogawa, T., 2002. The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie* 84, 433–438.

Mason, R.P., Choi, A.L., Fitzgerald, W.F., Hammerschmidt, C.R., Lamborg, C.H., Soerensen, A.L., Sunderland, E.M., 2012. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environmental Research* 119, 101–117.

Maute, R.L., Schneider, C., Sumazin, P., Califano, A., Basso, K., Dalla-Favera, R., 2013. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 1404–1409.

McClintock, N., 2015. A critical physical geography of urban soil contamination.

Geoforum 65, 69–85.

McDowall, K.J., Lin-Chao, S., Cohen, S.N., 1994. A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 269, 10790–10796.

Mckenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33–44.

Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., Yang, X., 2010. tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Molecular Cell* 37, 668–678.

Meineke, B., Schwer, B., Schaffrath, R., Shuman, S., 2011. Determinants of eukaryal cell killing by the bacterial ribotoxin PrrC. *Nucleic Acids Research* 39, 687–700.

Mela, M., Rrötzner, S.R., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Massabuau, J.-C., Ventura, D.F., Oliverira-Ribeiro, C.A. de, 2012. NeuroToxicology Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. *NeuroToxicology* 33, 407–415.

Mieiro, C.L., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Pacheco, M., 2011. Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*)—Bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquatic Toxicology* 103, 233–240.

Mileusnić, M., Mapani, B.S., Kamona, A.F., Ružičić, S., Mapaure, I., Chimwamurombe, P.M., 2014. Assessment of agricultural soil contamination by potentially toxic metals dispersed from improperly disposed tailings, Kombat mine, Namibia. *Journal of Geochemical Exploration* 144, 409–420.

Moeller, R., Rohde, M., Reitz, G., 2010. Effects of ionizing radiation on the survival of bacterial spores in artificial martian regolith. *Icarus* 206, 783–786.

Mohanty, B.K., Kushner, S.R., 2019. New Insights into the Relationship between tRNA Processing and Polyadenylation in *Echerichia coli*. *Trends in Genetics* 35,

434–445.

Mohanty, B.K., Kushner, S.R., 2000. Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3'→5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 11966–11971.

Mohanty, B.K., Maples, V.F., Kushner, S.R., 2012. Polyadenylation helps regulate functional tRNA levels in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research 40, 4589–4603.

Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M., Chamnongpol, S., 1998. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*. Journal of Bacteriology 180, 2636–2643.

Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. Water Air Soil Pollut 29, 543–566.

Morikawa, M., 2006. Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. Journal of Bioscience and Bioengineering 101, 1–8.

Mörl, M., Marchfelder, A., 2001. The final cut. The importance of tRNA 3'-processing. EMBO Reports 2, 4934–4944.

Mortensen, L.H., Rønn, R., Vestergård, M., 2018. Bioaccumulation of cadmium in soil organisms – With focus on wood ash application. Ecotoxicology and Environmental Safety 156, 452–462.

Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., Homuth, G., 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. Microbiology 150, 497–512.

Moszer, I., 1998. The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. FEBS Letters 430, 28–36.

Moszer, I., Glaser, P., Danchin, A., 1995. SubtiList: a relational database for the

Bacillus subtilis genome. Microbiology (reading) 141, 261–268.

Moszer, I., Jones, L.M., Moreira, S., Fabry, C., Danchin, A., 2002. SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. Nucleic Acids Research 30, 62–65.

Motuzova, G. V., Minkina, T.M., Karpova, E.A., Barsova, N.U., Mandzhieva, S.S., 2014. Soil contamination with heavy metals as a potential and real risk to the environment. Journal of Geochemical Exploration 144, 241–246.

Muralitharan, G., Thajuddin, N., 2008. Evidence of the presence of tRNA^{fMet} group I intron in the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Journal of Microbiological Biotechnology 18, 23–27.

Nagler, K., Julius, C., Moeller, R., 2016a. Germination of spores of astrobiologically relevant *Bacillus* species in high-salinity environments. Astrobiology 16, 500–512.

Nagler, K., Krawczyk, A.O., De Jong, A., Madela, K., Hoffmann, T., Laue, M., Kuipers, O.P., Bremer, E., Moeller, R., 2016b. Identification of differentially expressed genes during *Bacillus subtilis* spore outgrowth in high-salinity environments using RNA sequencing. Frontiers in Microbiology 7, 1–15.

Nagler, K., Moeller, R., 2015. Systematic investigation of germination responses of *Bacillus subtilis* spores in different high-salinity environments. FEMS Microbiology Ecology 91, fiv023.

Nagler, K., Setlow, P., Li, Y.Q., Moeller, R., 2014. High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* with nutrient and nonnutrient germinants. Applied and Environmental Microbiology 80, 1314–1321.

Nagler, K., Setlow, P., Reineke, K., Driks, A., Moeller, R., 2015. Involvement of coat proteins in *Bacillus subtilis* spore germination in high-salinity environments. Applied and Environmental Microbiology 81, 6725–6735.

Nance, P., Patterson, J., Willis, A., Foronda, N., Dourson, M., 2012. Human health

risks from mercury exposure from broken compact fluorescent lamps (CFLs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 62, 542–552.

Nannapaneni, P., Hertwig, F., Depke, M., Hecker, M., Mader, U., Völker, U., Steil, L., van Hijum, S.A., 2012. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology* 158, 696–707.

Natori, Y., Tagamai, K., Murakami, K., 2009. Transcription activity of individual *rrn* operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient in (p)ppGpp synthetase genes *relA*, *yjbM*, and *ywaC*. *Journal of Bacteriology* 191, 4555–4561.

Nawrot, B., Sochack, E., Döchler, M., 2011. tRNA structural and functional changes induced by oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 4023–4403.

Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T., Hamilton, C.J., Claiborne, A., Helmann, J.D., Fahey, R.C., 2009. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nature Chemical Biology* 5, 625–627.

Nicholson, A.W., 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 371–390.

Nicholson, W.L., 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 410–416.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 548–572.

Nicholson, W.L., Schuerger, A.C., 2005. *Bacillus subtilis* spore survival and expression of germination-induced bioluminescence after prolonged incubation under simulated Mars atmospheric pressure and composition: implications for planetary protection and lithopanspermia. *Astrobiology* 5, 536–544.

Nicholson, W.L., Schuerger, A.C., Douki, T., 2018. The photochemistry of unprotected DNA and DNA inside *Bacillus subtilis* spores exposed to simulated

- Martian surface conditions of atmospheric composition, temperature, pressure, and solar radiation. *Astrobiology* 18, 393–402.
- Nicholson, W.L., Setlow, P., 1990. Sporulation, germination and outgrowth, in: Harwood, C.R., Cutting, S.M. (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., New York, USA, pp. 391–429.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Biden, E. et al., 2012. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103–1106.
- Novoa, E.M., Pavon-Aternod, M., Pan, T., Ribas de Pouplana, L., 2012. A Role for tRNA Modifications in Genome Structure and Codon Usage. *Cell* 149, 202–213.
- Novoa, E.M., Ribas de Pouplana, L., 2012. Speeding with control: Codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends in Genetics* 28, 574–581.
- O'Donoghue, P., Ling, J., Söll, D., 2018. Transfer RNA function and evolution. *RNA Biology* 15, 423–426.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M., 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 29–34.
- Ostermann, A., Gao, J., Welp, G., Siemens, J., Roelcke, M., Heimann, L., Nieder, R., Sandhage-hofmann, A., Amelung, W., 2014. Identification of soil contamination hotspots with veterinary antibiotics using heavy metal concentrations and leaching data — a field study in China. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 7693–7707.
- Oussenko, I.A., Abe, T., Ujiie, H., 2005. Participation of 3'-to-5' exoribonucleases in the turnover of *Bacillus subtilis* mRNA. *Journal of Bacteriology* 187, 2758–2767.
- Oussenko, I.A., Sanchez, R., Bechhofer, D.H., 2002. *Bacillus subtilis* YhaM, a member of a new family of 3'-to-5' exonucleases in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 184, 6250–6259.

- Oves, M., Khan, M.S., Zaidi, A., 2013. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 121–129.
- Oves, M., Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E., 2012. Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation., in: A., Z., P., W., M., K. (Eds.), *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*. Springer, Viena, pp. 1–27.
- Ow, M.C., Kushner, S.R., 2002. Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes and Development* 16, 1102–1115.
- Pang, Y.L.J., Abo, R., Levine, S.S., Dedon, P.C., 2014a. Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic Acids Research* 42, e170.
- Pang, Y.L.J., Poruri, K., Martinis, S.A., 2014b. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wires RNA* 5, 461–480.
- Pannu, R., Kumar, D., 2017. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Process optimization of γ - Hexachlorocyclohexane degradation using three novel *Bacillus* sp. strains. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 11, 97–107.
- Pellegrini, O., Nezzar, J., Marchfelder, A., Putzer, H., Condon, C., 2003. Endonucleolytic processing of CCA-less tRNA precursors by RNase Z in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal* 22, 4534–4543.
- Pérez-García, A., Romero, D., De-Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms:biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 187–193.
- Petro-Souza, W., de Campos Pereira, F., Mello, I.S., Stachack, F.F.F., Terezo, A.J., da Cunha, C.N., Soares, M.A., 2020. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. *Chemosphere* 240, 124874.
- Pinkard, O., McFarland, S., Sweet, T., Coller, J., 2020. Quantitative tRNA-sequencing uncovers metazoan tissue-specific tRNA regulation. *Nature Communications* 11,

1–15.

Price, C. W., Fawcett, P., C  r  monie, H., Su, N., Murphy, C.K., Youngman, P., 2002. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 41, 757–774.

Puzyr', A., Mogil'naya, O., Krylova, T.Y.Y., Popova, L.Y.Y., Puzyr, A.P., Mogil, O.A., 2002. The architectonics of colonies of *Bacillus subtilis* 2335. *Microbiology* 71, 57–64.

Rachwa , M., Magiera, T., Wawer, M., 2015. Coke industry and steel metallurgy as the source of soil contamination by technogenic magnetic particles , heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 131, 863–873.

Raina, M., Ibba, M., 2014. tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in Genetics* 5, 1–14.

Rana, S., 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol* 22, 262–284.

Ray, B.K., Apirion, D., 1981. Transfer RNA precursors are accumulated in *Escherichia coli* in the absence of RNase E. *European Journal of Biochemistry* 114, 517–524.

Raynal, L.C., Krisch, H.M., Carpousis, A.J., 1998. The *Bacillus subtilis* Nucleotidyltransferase Is a tRNA CCA-Adding Enzyme. *Journal of Bacteriology* 180, 6276–6282.

Reder, A., Hoper, D., Gerth, U., Hecker, M., 2012. Contributions of individual sigmaB-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 194, 3601–3610.

Ren, G., Jin, Y., Qu, J., Gu, H., Zhang, C., 2015. Characteristics of *Bacillus sp.* PZ-1 and its biosorption to Pb(II). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 117, 141–148.

Reuven, N.B., Deutscher, M.P., 1993. Multiple exoribonucleases are required for

- 3' processing of *Escherichia coli* tRNA precursors in vivo. The FASEB Journal 7, 143–148.
- Reuven, N.B., Zhou, Z., Deutscher, M.P., 1997. Functional Overlap of tRNA Nucleotidyltransferase, Poly(A) Polymerase I, and Polynucleotide Phosphorylase. The Journal of Biological Chemistry 272, 3255–33259.
- Rice, K.M., Jr, E.M.W., Wu, M., Gillette, C., Blough, E.R., 2014. Environmental Mercury and Its Toxic Effects. Journal of Preventive Medicine & Public Health 47, 74–83.
- Robinson, J.T., Helga Thorvaldsdóttir, W.W., Guttman, M., Lander, E.S., Gad Getz, J., Mesiro, ill P., 2011. Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 29, 24–26.
- Rogstam, A., Larsson, J.T., Kjølgaard, P., von Wachenfeldt, C., 2007. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 189, 3063–3071.
- Rosenberg, A., Sinai, L., Smith, Y., 2012. Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. PLoS One 7, e41921.
- Saikia, M., Jobava, R., Parisien, M., Putnam, A., Krokowski, D., Gao, X.H., Guan, B.J., Yuan, Y., Jankowsky, E., Feng, Z., Hu, G.F., Pusztai-Carey, M., Gorla, M., Sepuri, N.B., Pan, T., Hatzoglou, M., 2014. Angiogenin-Cleaved tRNA Halves Interact with Cytochrome c, Protecting Cells from Apoptosis during Osmotic Stress. Molecular Cell Biology 34, 2450–2463.
- Saikia, M., Krokowski, D., Guan, B.J., Ivanov, P., Parisien, M., Hu, G.F., Anderson, P., Pan, T., Hatzoglou, M., 2012a. Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. Journal of Biological Chemistry 287, 42708–42725.
- Saikia, M., Krokowski, D., Guan, B.J., Ivanov, P., Parisien, M. et al., 2012b. Genome-

wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *Journal of Biological Chemistry* 287, 42708–42725.

Saikia, M., Krokowski, D., Guan, B.J., Ivanov, P., Parisien, M., Hu, G.F., Anderson, P., Pan, T., Hatzoglou, M., 2012c. Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *Journal of Biological Chemistry* 287, 42708–42725.

Sakano, H., Shimura, Y., 1978. Characterization and in vitro processing of transfer RNA precursors accumulated in a temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 123, 287–326.

Sakano, H., Shimura, Y., 1975. Sequential processing of precursor tRNA molecules in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 3369–3373.

Samarrai, W., Liu, D.X., White, A.M., 2011. Differential responses of *Bacillus subtilis* rRNA promoters to nutritional stress. *Journal of Bacteriology* 193, 723–733.

Sang, Y., Blecha, F., 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins : alternatives to traditional Antimicrobial. *Animal Health Research Reviews* 9, 227–235.

Saxena, S.K., Sirdeshmukh, R., Ardelt, W., Mikulski, S.M., Shogen, K., Youle, R.J., 2002. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15142–15146.

Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., Lyko, F., 2010. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes and Development* 24, 1590–1595.

Schimmel, P., 2018. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 45–58.

Schneider, L., Belger, L., Burger, J., Vogt, R.C., 2009. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae : Testudines) as a function of water parameters. *Science of the Total Environment* 407, 1048–1054.

- Schuerger, A.C., Mancinelli, R.L., Kern, R.G., Rothschild, L.J., McKay, C.P., 2003. Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated martian environments: implications for the forward contamination of Mars. *Icarus* 165, 253–276.
- Schultz, D., Wolynes, P.G., Jacob, E.B., Onuchic, J.N., 2009. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 21027–21034.
- Schürer, H., Schiffer, S., Marchfelder, A., Mörl, M., 2001. This Is the End : Processing , Editing and Repair at the tRNA 3' -Terminus. *Biological Chemistry* 382, 1147–1156.
- Schuster, E., 1991. El comportamiento del mercurio en el suelo con especial énfasis en los procesos de complejación y adsorción. Una revisión de la literatura. *Water Air & Soil Pollution* 50, 667–680.
- Schwartz, M.H., Wang, H., Pan, J.N., Clark, W.C., Cui, S., Eckwahl, M.J., Pan, D.W., Parisien, M., Owens, S.M., Cheng, B.L., Martinez, K., Xu, J., Chang, E.B., Pan, T., Eren, A.M., 2018. Microbiome characterization by high-throughput transfer RNA sequencing and modification analysis. *Nature Communications* 9, 1–13.
- Segev, E., Rosenberg, A., Mamou, G., Ben-Yehuda, S., 2013. Molecular kinetics of reviving bacterial spores. *Journal of Bacteriology* 195, 1875–1882.
- Segev, E., Smith, Y., Ben-Yehuda, S., 2012. RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores. *Cell* 148, 139–149.
- Setlow, P., 2013. Summer meeting 2013 – when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 115, 1251–1268.
- Setlow, P., 2012. Resistance of bacterial spores to chemical agents, in: Maillard, J.Y., Fraise, A., Sattar, S. (Eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 121–130.
- Setlow, P., 2006a. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to radiation, heat and

- chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514–525.
- Setlow, P., 2006b. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514–525.
- Setlow, P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550–556.
- Shenton, D., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Carroll, K., Hubbard, S.J. et al., 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29011–29021.
- Shepherd, J., Ibba, M., 2015. Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 280–300.
- Shigematsu, M., Honda, S., Loher, P., Telonis, A.G., Rigoutsos, I., Kirino, Y., 2017. YAMAT-seq: an efficient method. *Nucleic Acids Research* 45, e70–e70.
- Sies, H., 2015. Redox Biology Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180–183.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry* 86, 715–748.
- Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., Ben-Yehuda, S., 2015. The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Molecular Cell* 57, 685–707.
- Smith, P., Cotrufo, M.F., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P.J., Elliott, J.A., McDowell, R., Griffiths, R.I., Asakawa, S., Bustamante, M., House, J.I., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P.C., Gerber, J.S., Clark, J.M., Adhya, T., Scholes, R.J., Scholes, M.C., 2015. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. *Soil Discussions* 2, 537–586.
- Sobrinho-Plata, J., Meyssen, D., Cuyper, A., Escobar, C., Hernández, L.E., 2014. Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant Soil* 377, 369–381.
- Söll, D., RajBhandary, U.L., 1995. tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function. ASM

Press, Washington, DC.

Spencer, R.C., 2003. *Bacillus anthracis*. Journal of Clinical Pathology 56, 182–187.

Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Gur, T., Cowley, A., Li, W., Uludag, M., Pundir, S., Cham, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., 2015. The EBI Search engine: providing search and retrieval functionality for biological data from EMBL-EBI. Nucleic Acids Research 43, W585–W588.

Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U., Bremer, E., 2003. Genomewide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. Journal of Bacteriology 185, 6358–6370.

Stragier, P., Losick, R., 1996. Molecular Genetics . Annual Reviews in Genetics. 30, 297–341.

Su, Z., Kuscu, C., Malik, A., Shibata, E., Dutta, A., 2019. Angiogenin generates specific stress-induced tRNA halves and is not involved in tRF³-mediated gene silencing. Journal of Biological Chemistry 294, 16930–16941.

Sumi, C.D., Yang, B.W., Yeo, I., Hahm, Y.T., 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus* : a new era for antibiotics. Canadian Journal of Microbiology 61, 93–103.

Sun, L., Campbell, F.E., Zahler, N.H., Harris, M.E., 2006. Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P. The EMBO Journal 25, 3998–4007.

Swarge, B., Abhyankar, W., Jonker, M., Hoefsloot, H., Kramer, G., Setlow, P., Brul, S., de Koning, L.J., 2020. Integrative Analysis of Proteome and Transcriptome Dynamics during *Bacillus subtilis* Spore Revival. mSphere 5, e00463-20.

Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., Prasad, M.N. V., 2013. Heavy metal-induced oxidative damage , defense reactions , and detoxification mechanisms in plants. Acta Physiol Plant 35, 985–999.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA 6:

Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729.

Tan, I.S., Ramamurthi, K.S., 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* 6, 212–225.

Tateno, Y., Imanishi, T., Miyazaki, S., Fukami-Kobayashi, K., Saitou, N., Sugawara, H., Gojobori, T., 2002. DNA Data Bank of Japan (DDBJ) for genome scale research in life science. *Nucleic Acids Research* 30, 27–30.

Telonis, A.G., Loher, P., Honda, S., Jing, Y., Palazzo, J., Kirino, Y., Rigoutsos, I., 2015. Dissecting tRNA-derived fragment complexities using personalized transcriptomes reveals novel fragment classes and unexpected dependencies. *Oncotarget* 6, 24792–27822.

Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., Parker, R., 2008. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* 14, 2095–2103.

Thompson, D.M., Parker, R., 2009a. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* 138, 215–219.

Thompson, D.M., Parker, R., 2009b. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 185, 43–50.

Toh, Y., Hori, H., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., 2009. Transfer RNA Synthesis and Regulation, in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons.

Tomita, K., Ogawa, T., Uotzumi, T., Watanabe, K., MAsaki, H., 2000. A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8278–8283.

Torrent, M., Chalacon, G., de Groot, N.S., Wuster, A., Babu, M.M., 2018. Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. *Science Signaling* 11, 1–9.

- Tovar-Rojo, F., Cabrera-Martinez, R.M., Setlow, B., Setlow, P., 2003. Studies on the mechanism of the osmoresistance of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 167–179.
- Trotta, C.R., Abelson, J., 1999. tRNA splicing: an RNA world add-on or an ancient reaction?, in: Gesteland, R.F., Cech, T.R., Atkins, J.F. (Eds.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 471.
- Upadhyaya, H., Sahoo, L., Panda, S.K., 2013. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants, in: Rout, G., Das, A. (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer, India, pp. 179–192.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals , Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161–1208.
- Väre, V.Y.P., Eruysal, E.R., Narendran, A., Sarachan, K.L., Agris, P.F., 2017. Chemical and Conformational Diversity of Modified Nucleosides Affects tRNA Structure and Function. *Biomolecules* 7, 1–32.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., Kolter, R., 2013. Sticking together:building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology* 11, 157–168.
- Vogel, C., Silva, G.M., Marcotte, E.M., 2011. Protein expression regulation under oxidative stress. *Molecular and Celular Proteomics* 10, M1111.
- Vold, B.S., 1985. Structure and organization of genes for transfer ribonucleic acid in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews* 49, 71–80.
- Vold, B.S., Green, C.J., 1988. Processing of a Multimeric tRNA Precursor from *Bacillus subtilis* by the RNA Component of RNase P. *Journal of Biological Chemistry* 263, 14390–14396.
- Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., A., V., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M., 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 741–752.

- Völker, U., Hecker, M., 2005. From genomics via proteomics to cellular physiology of the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*. *Cellular Microbiology* 7, 1077–1085.
- Völker, U., Maul, B., Hecker, M., 1999. Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181, 3942–3948.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, New York.
- Wang, L., Xie, J., Schultz, P.G., 2006. Expanding the genetic code. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 35, 225–29.
- Wang, Y., Freedman, Z., Lu-Irving, P., Kaletsky, R., Barkay, T., 2009. An initial characterization of the mercury resistance (mer) system of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiology Ecology* 67, 118–129.
- Wang, Y., Pang, C., Li, X., Hu, Z., Lv, Z., Zheng, B., Chen, P., 2017. Identification of tRNA nucleoside modification genes critical for stress response and development in rice and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 17, 1–15.
- Wang, Y., Robinson, T., Wiatrowski, H., 2013. The impact of ionic mercury on antioxidant defenses in two mercury-sensitive anaerobic bacteria. *Biometals* 26, 1023–1031.
- Wawrousek, E.F., Narasimhan, N., Hansen, J.N., 1984. Two large clusters with thirty-seven transfer RNA genes adjacent to ribosomal RNA gene sets in *Bacillus subtilis*. Sequence and organization of trnD and trnE gene clusters. *Journal of Biological Chemistry* 259, 3697–3702.
- Wellner, K., Betat, H., Mörl, M., 2018. A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation. *BBA- Gene Regulatory Mechanisms* 1861, 433–

441.

Wellner, K., Czech, A., Ignatova, H., Betat, H., Mörl, M., 2017. Examining tRNA 3'-ends in *Escherichia coli*: a teamwork between CCA-adding enzyme, RNase T and RNase R. *RNA* 24, 361–370.

Wen, T., Oussenko, I.A., Pallegriani, O., Bechhofer, D.H., Condon, C., 2005. Ribonuclease PH plays a major role in the exonucleolytic maturation of CCA-containing tRNA precursors in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 33, 3636–3643.

Wilusz, J.E., 2015. Controlling translation via modulation of tRNA levels. *RNA* 6, 453–470.

Wilusz, J.E., Whipple, J.M., Phizicky, E.M., Sharp, P.A., 2011. tRNAs marked with CCACCA are targeted for degradation. *Science* 334, 817–821.

Wood, J., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T. et al., 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 130, 437–460.

Wu, J., Jiang, Z., Liu, M., Gong, X., Wu, S., Burns, C.M., Li, Z., 2009. Polynucleotide Phosphorylase Protects *Escherichia coli* against Oxidative Stress. *Biochemistry* 48, 2012–2020.

Wu, J., Li, Z., 2008. Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, 288–292.

Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks, and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network* 2011, 1–20.

Wyatt, L.H., Luz, A.L., Cao, X., Maurer, L.L., Blawas, A.M., Aballay, A., Pan, W.K.Y., Meyer, J.N., 2017. Effects of methyl and inorganic mercury exposure on genome homeostasis and mitochondrial function in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Repair*

52, 31–48.

- Xiao, R., Wang, S., Li, R., Wang, J.J., Zhang, Z., 2017. Soil heavy metal contamination and health risks associated with artisanal gold mining in Tongguan, Shaanxi, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141, 17–24.
- Xiong, L., Zhu, J.K., 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25, 131–139.
- Xu, F.F., Imlay, J.A., 2012. Silver(I), Mercury(II), Cadmium(II), and Zinc(II) Target Exposed Enzymic Iron-Sulfur Clusters when They Toxicify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3614–3621.
- Xu, H., Yao, J., Wu, D.C., Lambowitz, A.M., 2019. Improved TGIRT-seq methods for comprehensive transcriptome profiling with decreased adapter dimer formation and bias correction. *Scientific Reports* 9, 7953.
- Xu, J., Garcia, A., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J., 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environment International* 74, 42–53.
- Xu, J., Kleja, D.B., Biester, H., Lagerkvist, A., Kumpiene, J., 2014. Influence of particle size distribution, organic carbon, pH and chlorides on washing of mercury contaminated soil. *Chemosphere* 109, 99–105.
- Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F., Anderson, P., 2009. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *Journal of Cell Biology* 185, 35–42.
- Yang, Y., Guo, Y., 2018. Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 60, 796–804.
- Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M., Schuster, G., 2001. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Molecular Cell Biology* 21, 5408–5416.

- Yeung, M.L., Bennasser, Y., Watashi, K., Le, S.Y., Houzet, L., Jeang, K.T., 2009. Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Research* 37, 6575–6586.
- Yilmaz, E.I., 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology* 154, 409–415.
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., Chen, L., 2019. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal* 360, 1553–1563.
- Ynalvez, R., Gutierrez, J., Gonzalez-Cantu, H., 2016. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. *Biometals* 29, 781–788.
- Zamudio, J.R., Kelly, T.J., Sharp, P.A., 2014. Argonaute-bound small RNAs from promoter-proximal RNA polymerase II. *Cell* 156, 920–934.
- Zhang, S., Sun, L., Kragler, F., 2009. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiology* 150, 378–387.
- Zhang, Y., Wang, R., Xue, T., Ge, X., Liu, J., 2015. Effects of Soil Properties and Flooding on the Mobility and Transformation of Mercury in a Temperate Riparian Wetland. *Journal Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 24, 191–205.
- Zheng, G., Qin, Y., Clark, W.C., Dai, Q., Yi, C., He, C., Lambowitz, A.M., Pan, T., 2015. Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nature Methods* 12, 835–837.
- Zhong, J., Xiao, C., Gu, W., Du, G., Sun, X., He, Q.Y., Zhang, G., 2015. Transfer RNAs Mediate the Rapid Adaptation of *Escherichia coli* to Oxidative Stress. *PLoS Genetics* 11, e1005302.
- Zhou, J., Liu, H., Du, B., Shang, L., Yang, J., Wang, Y., 2015. Influence of soil mercury concentration and fraction on bioaccumulation process of inorganic mercury and methylmercury in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution*

Research 22, 6144–6154.

Zhou, M., Guo, J., Cha, J., Chae, M., Chen, S., Barral, J.M., Sachs, M.S., Liu, Y., 2013. Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. *nature* 459, 111–115.

Zhu, B., Stülke, J., 2017. SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 46, 743–748.

Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247–273.

Zhu, J.K., Hasegawa, M., Bressan, R.A., Bohnert, H.J., 1997. Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. *Critical Reviews in Plant, Sciences* 16, 253–277.

Zhu, M., Dai, X., 2019. Maintenance of translational elongation rate underlies the survival of *Escherichia coli* during oxidative stress. *Nucleic Acids Research* 47, 7592–7604.

Zuber, P., 2009. Management of Oxidative Stress in *Bacillus*. *Annual Reviews of Microbiology* 63, 575–597.

Zuber, P., 2004. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *Journal of Bacteriology* 186, 1911–1918.

Zuo, Y., Deutscher, M.P., 2002. The physiological role of RNase T can be explained by its unusual substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 277, 29654–29661.

Zuo, Y., Deutscher, M.P., 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research* 29, 1017–1026.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9 ANEXOS

➤ **Medio de esporulación de Schaeffer modificado (2x SG). Fórmula por litro:**

Bacto caldo nutritivo.....16 g
KCl2 g
MgSO₄ (7H₂O)..... 0.5 g

Ajustar a pH 7 con NaOH 1 M, esterilizar en autoclave (15 psi, 15 minutos), enfriar a >55 °C y añadir 1 mL de soluciones* más 2 mL de glucosa 50 % (m/v) estéril por filtración o en autoclave a 10 psi por 10 minutos.

-*Solución de Ca(NO₃)₂ 1 M (estéril por filtración).

-*Solución de MnCl₂ 10 mM (estéril por filtración).

-*Solución de FeSO₄ 1 mM (estéril por filtración).

➤ **Medio de germinación (Spizizen medio mínimo, SMM). Composición por litro:**

(NH₄)₂SO₄2 g
K₂HPO₄14 g
KH₂PO₄6 g
Na₃ citrato (2H₂O)....1 g
MgSO₄ (7H₂O).....0.2 g

Esterilizar en autoclave a 15 psi por 15 minutos. Adicionalmente añadir las siguientes soluciones a un litro de SMM:

D-glucosa 50% (w/v).....10 mL

L-triptófano 5 mg mL⁻¹.....10 mL

L-alanina 10 mM (En caso de requerirse para desencadenar la germinación, tal como se describe en Nagler et al., 2014 y Nagler et al., 2016b).

Nota: La glucosa se esteriliza por filtración o en autoclave a 10 psi por 10 minutos, el L-triptófano y L-alanina solamente por filtración.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ