

# TESIS DOCTORAL

Valencia, Octubre 2019

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

# Caracterización proteómica de la interacción y la inserción de proteínas de membrana

Natalia Mara Vera Velasco

Dirigida por:

Dr. Manuel Mateo Sánchez del Pino

Dr. Luis Martínez Gil







VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Biología, Campus Burjassot

Valencia, Octubre 2019

**Caracterización proteómica de la interacción y la  
inserción de proteínas de membrana**

Memoria realizada por D<sup>a</sup> Natalia Mara Vera Velasco para optar  
al Grado de Doctor por la Universitat de València

Dirigida por:

Dr. Manuel Mateo Sánchez del Pino

Dr. Luis Martínez Gil





Manuel Mateo Sánchez del Pino, profesor Contratado Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y Luis Martínez Gil, profesor Ayudante Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València.

#### INFORMAN

1. Que D<sup>a</sup>. Natalia Mara Vera Velasco Licenciada en Biología y Máster Universitario en Investigación en Biología Molecular, Celular y Genética por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo la dirección de ambos su trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Caracterización proteómica de la interacción y la inserción de proteínas de membrana”.
2. Que a juicio de ambos este trabajo de tesis reúne los requisitos de volumen de datos, originalidad y avance en el conocimiento adecuados para una Tesis Doctoral, y que el ámbito temático de la tesis se inscribe en el área de conocimiento de la Bioquímica y Biología Molecular, razón por la que se somete a este Departamento.
3. Que la memoria de Tesis aportada por la Dra. Vera Velasco cumple suficientemente con los requisitos expositivos, de detalle técnico y formales para ser sometida al Tribunal correspondiente con la finalidad de que la doctoranda opte al grado de Doctor.

Valencia, a 18 de Octubre de 2019

Manuel M. Sánchez del Pino  
Director

Luis Martínez Gil  
Director

Rosario Gil García  
Tutora



A mis padres, Natalia Velasco y Pedro Vera, porque todo lo que he conseguido en la vida es gracias a vosotros. Por vuestro cariño, apoyo y comprensión. Os quiero mucho.

A Alejandro, por su amor, ayuda, paciencia y ganas de mejorar todos los días.





## **OBJETIVOS**

- **Objetivo 1**

**Estudio del interactoma asociado a la inserción de proteínas de membrana.**

- **Objetivo 2**

**Estudio de las proteínas humanas incluidas en el virión del virus Nipah.**



# **Objetivo 1**

**Estudio del interactoma asociado a la inserción de proteínas de membrana.**



## CONTENIDOS OBJETIVO 1

<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
I1.1 Componentes lipídicos.....	12
I1.2 Componentes proteicos.....	12
I2. Direccionamiento de las proteínas de membrana .....	14
I2.1 Mecanismo de inserción cotraduccional.....	15
I2.2 Mecanismo de inserción postraduccional .....	17
I3. Orientación de las proteínas en la membrana .....	21
I4. Interacción proteína-proteína .....	23
I5. Espectrometría de masas.....	25
I5. 1 Tipos de adquisición de los espectros de fragmentación .....	28
I5.2 Cuantificación de proteínas.....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
M1. Biología molecular y cultivos.....	37
M1.1 Descripción de las quimeras TM y $\Delta$ TM.....	37
M1.2 Expresión de proteínas.....	37
M1.2.1 Quimeras TM y $\Delta$ TM en <i>E. coli</i> BL21 pLysS.....	37
M1.2.2 Proteínas HslU y MetH en la librería ASKA.....	38
M1.3 PCR en tiempo real (qPCR).....	39
M2. Métodos bioquímicos.....	41
M2.1 Purificación de proteínas .....	41
M2.2 Electroforesis SDS-PAGE.....	42
M2.3 Estabilidad de las proteínas quiméricas TM y $\Delta$ TM .....	43
M2.4 Fraccionamiento subcelular .....	44
M2.5 Ensayos de purificación del interactoma .....	45
M2.6 Electroforesis de dos dimensiones.....	46
M2.7 Análisis de proteína total .....	48
M2.8 Medidas de la actividad ATPasa de HslU .....	49
M2.9 Cromatografía de exclusión molecular.....	50
M2.10 Interacción proteína-proteína por dispersión de luz.....	50
M2.11 Análisis de entrecruzamiento con proteína purificada.....	51
M2.12 Construcción de la biblioteca de espectros de masas .....	53

M3. Proteómica .....	54
M3.1 Cromatografía líquida de péptidos (nanoHPLC) .....	54
M3.2 Espectrometría de masas DDA o <i>shotgun</i> .....	54
M3.3 Espectrometría de masas DIA o SWATH .....	55
M3.4 Identificación de proteínas.....	56
M3.5 Cuantificación de proteínas por espectrometría de masas: Top3 y SWATH. ....	56
M3.5.1 Técnica del top3.....	56
M3.5.2 SWATH .....	56
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
R1. Análisis de las quimeras .....	61
R1.1 Expresión de las proteínas quiméricas.....	61
R1.2 Estabilidad de las proteínas quiméricas.....	62
R1.3 Análisis de la inserción de las quimeras TM y $\Delta$ TM en la membrana .....	64
R2. Identificación de las proteínas asociadas a las quimeras .....	65
R2.1 Ensayos de purificación del interactoma .....	65
R2.2 Electroforesis de dos dimensiones.....	68
R3. Análisis de proteína total .....	71
R4. PCR en tiempo real (qPCR).....	73
R5. Análisis de la interacción entre TM con las proteínas HslU y MetH .....	74
R5.1 Ensayos funcionales .....	74
R5.2.1 Análisis de la actividad ATPasa .....	75
R5.2.2 Análisis de la interacción mediante luz dispersada Rayleigh .....	75
R5.2.3 Análisis de la interacción mediante cromatografía de filtración en gel.....	77
R5.2 Análisis de entrecruzamiento con proteína purificada.....	80
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>

## ABREVIATURAS

AAA - ATPases associated to a variety of cellular activities  
AdoMet - Adenosilmetionina  
AF – Ácido fórmico  
APEX - *Absolute Protein Expresion*  
BiP - *Immunoglobulin heavy chain Binding Protein*  
CAML – *Calcium Modulating cyclophilin Ligand*  
CAN - Acetonitrilo  
DDA - *Data-Dependent Acquisition*  
DIA - *Data-Independent Acquisition*  
DTSSP - *3,3'-dithiobis sulfosuccinimidyl propionate*  
DTT - Dithiothreitol  
emPAI - *exponentially modified Protein Abundance Index*  
ER - *Endoplasmic Reticulum*  
ESI - *Electrospray Ionization*  
FDR – *False Discovery Rate*  
GET3 – *Guided Entry of Tail-anchored proteins-3*  
GFP – *Green Fluorescent Protein*  
GO - Gene Ontology  
GpA – Glicoforina A  
Grp78 - *Endoplasmic reticulum chaperone BiP*  
Hcy - Homocisteína  
Hsp - *Heat Shock Protein*  
IEC – Cromatografía de intercambio iónico  
LB - medio Luria-Bertani  
LC-MS/MS – *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*  
MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*  
NBF – dominios ATPasa de SecA  
NMR - *Magnetic Resonance Spectroscopy*  
NSAF - *Normalized Spectral Abundance Index*  
PAI - *Protein Abundance Index*  
PANTHER - Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships  
pI – Punto isoelectrico  
PSA- Persulfato de amonio  
Q – *Quadrupole mass analyzer*  
RNC – *Ribosome Nascent chain Complex*  
RP – Cromatografía de fase reversa  
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
SEC – Cromatografía de exclusión por tamaño

Sec – proteína o complejo implicado en secreción de proteínas  
SILAC - *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*  
SR - *SRP Receptor*  
SRP - *Signal Recognition Particle*  
SS – *Signal Sequence*  
SWATH - *sequential window acquisition of all theoretical spectra*  
TA- *Tail-Anchored Proteins* (proteínas ancladas por el extremo C-terminal)  
TB – medio Terrific Broth  
TEMED - Tetrametilen-diamina  
TFA – Ácido trifluoroacético  
TM - Transmembrana  
TOF – *Time Of Flight mass analyzer*  
TRC40 - *TM Recognition Complex subunit of 40 kDa*  
WB – *Wash Buffer*  
WRB - *Tryptophan-Rich Basic protein*



# INTRODUCCIÓN



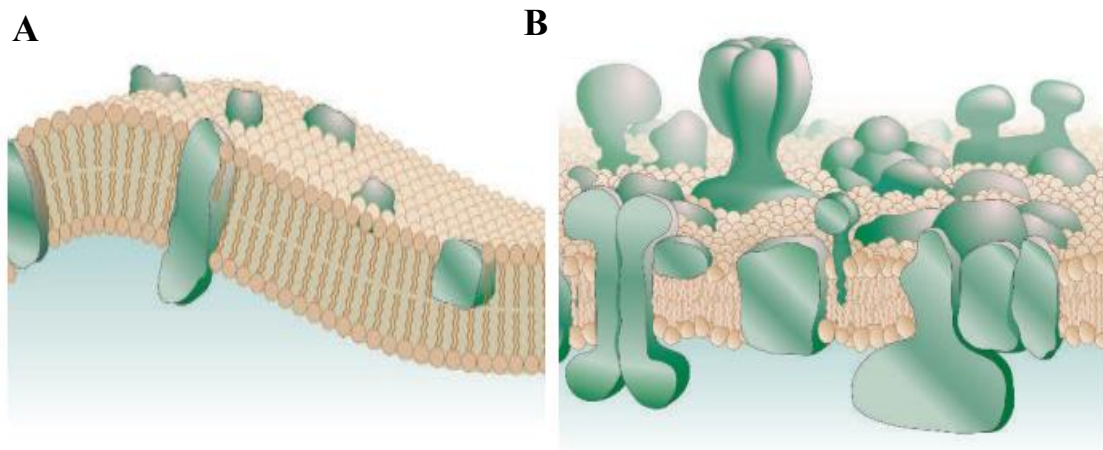
## II. Membranas biológicas

Las membranas biológicas delimitan las células separando el medio intracelular del extracelular. Además, dividen el espacio interno de las células, regulan el tráfico y la comunicación celular y participan en la obtención de energía.

El componente estructural fundamental de las membranas biológicas es la bicapa lipídica. Esta bicapa consiste en dos capas de lípidos anfipáticos cuyas cabezas polares se organizan en contacto con la fase acuosa, mientras que las colas hidrofóbicas se encuentran en el interior de las dos capas en contacto unas con otras.

En 1972, Singer y Nicolson propusieron el modelo de mosaico fluido de membrana para explicar las propiedades de la membrana desde un punto de vista termodinámico (**Figura 1**). En el modelo, los fosfolípidos se organizaban en una bicapa fluida donde las proteínas se encontraban embebidas, lo que permitía su movimiento en el mismo plano de la membrana (Singer and Nicolson, 1972).

Actualmente, el modelo se ha ido ajustando a los nuevos datos obtenidos. Se ha observado que en la membrana existen restricciones del movimiento, haciendo que no sea homogénea. También se ha encontrado que la membrana contiene mayor cantidad de proteínas de lo que se había descrito inicialmente y que su espesor es variable (Engelman, 2005) (**Figura 1**).



**Figura 1:** modelos generales para la estructura de las membranas biológicas. (A) Mosaico fluido de Singer y Nicolson. (B) Modelo actualizado. Imagen de Engelman (2005).

## **II.1 Componentes lipídicos**

Los lípidos son el principal componente de las membranas. Son muy diversos en su estructura y su distribución varía según el organismo, tipo celular y orgánulo. Sus funciones en el organismo son muy variadas. Así, se encuentran implicadas en el almacenamiento de energía, actúan como moléculas señalizadoras o incluso, cuando forman parte de la bicapa lipídica, tienen una función estructural (Harayama and Riezman, 2018).

La bicapa lipídica se forma espontáneamente a partir de lípidos anfipáticos en medios acuosos debido a fuerzas no covalentes (efecto hidrofóbico), que son lo bastante fuertes como para mantener su integridad (Yeagle, 2012). Los principales lípidos son los fosfolípidos, los esfingolípidos (fundamentalmente los glicolípidos) y los esteroides (principalmente el colesterol en mamíferos).

Por ejemplo, *Escherichia coli* es una bacteria gram negativa que tiene membrana interna y externa, las cuales contienen predominantemente fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina. Sin embargo, en la membrana plasmática de las células eucariotas, la fosfatidilcolina y la esfingomiélin son el glicerofosfolípido y el esfingolípid más abundantes, respectivamente. Además, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y el colesterol (ergosterol en levaduras) están presentes en cantidades importantes. Los orgánulos intracelulares de las células eucariotas como el RE, el aparato de Golgi, mitocondria, cloroplastos, peroxisomas, lisosomas y núcleo contienen diferentes mezclas de lípidos. Por ejemplo, en contraste con la membrana plasmática, la membrana del RE contiene pequeñas cantidades de esfingolípidos y colesterol (Reithinger, 2013).

## **II.2 Componentes proteicos**

La mayor parte de las funciones específicas de las membranas biológicas están desempeñadas por proteínas, por lo que el tipo y la cantidad de proteínas que encontremos, son indicativos de su función (Chou and Shen, 2007).

Las proteínas de membrana se dividen en periféricas, cuando se unen solo a la superficie de la membrana e integrales, cuando tienen una o más regiones dentro de la membrana y

dominios a uno o los dos lados de la misma. Los dominios situados en la superficie de la membrana extracelular generalmente están implicados en señalización o interacción entre células. Algunos dominios que se encuentran dentro de la membrana forman canales y poros, permitiendo el movimiento de partículas a través de la membrana. Los dominios que se sitúan en la cara citosólica tienen una gran variedad de funciones como el anclaje de proteínas del citoesqueleto o la activación de vías de señalización intracelulares (Lodish et al., 2000).

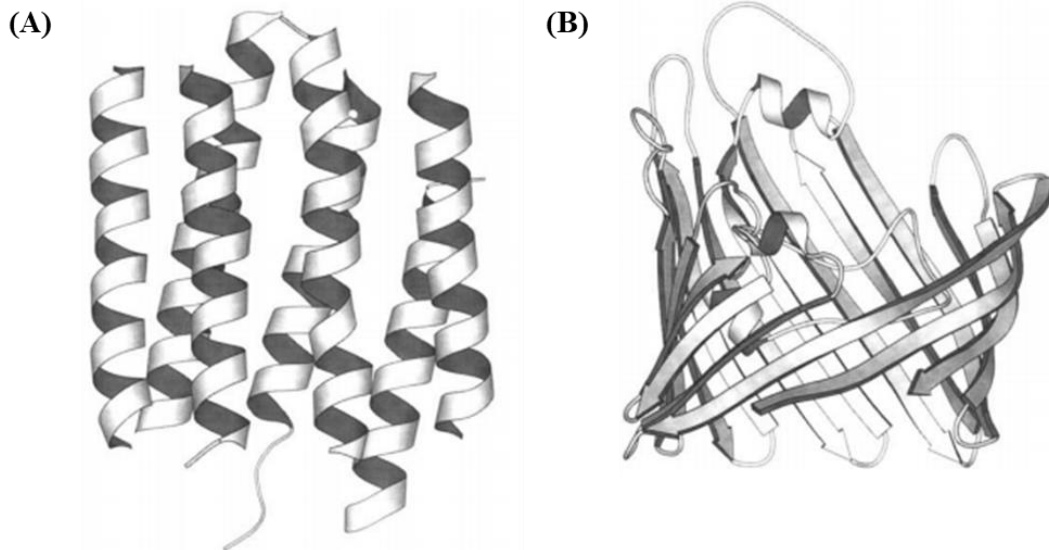
Las proteínas de membrana periféricas interactúan con las cabezas polares de los lípidos de membrana mediante puentes de hidrógeno y/o con otras proteínas de membrana. Debido a las relativamente débiles interacciones que poseen, pueden ser separadas de la membrana mediante un tratamiento con carbonatos. En cambio, las proteínas integrales están ancladas profundamente a la bicapa lipídica. Estas proteínas sólo pueden ser extraídas por la aplicación de solventes o detergentes (Reithinger, 2013).

**Debido al enfoque de este trabajo, con el término “proteínas de membrana” nos vamos a referir a las proteínas integrales transmembrana.**

La mayoría de las proteínas de membrana se encuentran dentro de tres ambientes químicamente diferentes. Parte de la proteína se encuentra en el núcleo hidrofóbico de la bicapa, rodeada por cadenas no polares de fosfolípidos, esteroides y otras proteínas de membrana. Como resultado, los enlaces de hidrógeno intramoleculares son necesarios para la estabilidad conformacional de la proteína. Otra parte de la proteína se encuentra entre las cabezas de los fosfolípidos, ofreciendo la posibilidad de formar interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. Además, las proteínas de membrana también pueden contener dominios en el agua que rodea la membrana, ya sea dentro o fuera de la célula u orgánulo (Reithinger, 2013).

El interior de la bicapa lipídica es hidrofóbico, por lo que la porción de las proteínas de membrana integrales que se encuentra en la bicapa también lo es. Los motivos estructurales que se encuentran embebidos en la bicapa son de dos tipos: hélices alfa y barriles beta, siendo mayoritarias las primeras (**Figura 2**). Las funciones observadas para las proteínas con hélices alfa son variadas, al igual que su topología e incluyen el reconocimiento de señales y la transferencia de moléculas e iones a través de la membrana, además pueden actuar como receptores y estar implicadas en la translocación de energía (Taylor et al., 2006). Las hélices transmembrana (TM) tienen típicamente entre

15 y 30 residuos, lo cual es suficiente para atravesar la membrana (von Heijne, 1995). El dominio TM de las hélices alfa está principalmente compuesto por aminoácidos hidrofóbicos como isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, alanina y glicina. Estos residuos pueden abarcar aproximadamente el 63% del TM (Boekel, 2009).



**Figura 2: Proteínas de membrana.** (A) Estructura de la bacteriorodopsina, una proteína compuesta por siete hélices transmembrana. (B) Estructura de la porina de *Rhodospirillum rubrum*, compuesta por una estructura de barril beta. Imagen de von Heijne (1995).

## I2. Direccionamiento de las proteínas de membrana

La maduración de las cadenas polipeptídicas nacientes implica varios factores que se asocian con el ribosoma. Estos factores incluyen enzimas para su modificación, chaperonas, complejos de direccionamiento y el translocón, aunque se sabe poco acerca de cómo estos factores cooperan con el ribosoma para facilitar la maduración de la cadena naciente. Una vez sintetizadas, una parte de estas proteínas se inserta en la membrana (Voorhees et al., 2014).

En eucariotas, el retículo endoplasmático (RE) juega un papel importante en la biosíntesis de proteínas. Su membrana es el sitio de producción de las proteínas transmembrana y de secreción. Las proteínas precursoras son dirigidas desde el citosol a las membranas del RE donde pueden ser insertadas o pasar al Aparato de Golgi. Las que pasan a Golgi pueden ser retenidas o continuar hacia la membrana plasmática. Entre estas últimas,

algunas se quedarán en la membrana y otras serán secretadas (Lewin, 2008). La translocación de las proteínas es el proceso por el que un polipéptido nascente se transporta a través de la bicapa lipídica hacia el lumen (proteínas de secreción) o se inserta en la membrana (proteínas de membrana), en un proceso que puede ocurrir de forma cotraduccional o postraduccional, tal y como explicaremos más adelante (Jiménez García and Merchant, 2003).

Una característica que tienen las proteínas que se asocian con membranas es la presencia de una secuencia líder en el extremo N-t de la proteína. La proteína con la secuencia líder se llama preproteína, ya que la secuencia líder se pierde en el proceso de inserción en membrana (Cymer et al., 2015; van Geest and Lolkema, 2000). Las proteínas bacterianas cuya localización es la membrana citoplasmática, el periplasma o la membrana externa y las que se excretan, también tienen secuencias señal para su exportación. En el caso de las proteínas del periplasma y membrana externa, la secuencia señal se rompe durante el tránsito a través de la membrana citoplasmática (Pugsley, 1993).

## **I2.1 Mecanismo de inserción cotraduccional**

El mecanismo de inserción cotraduccional ocurre cuando la integración de las proteínas en la membrana se da al mismo tiempo que su síntesis en los ribosomas (**Figura 3**). Este proceso ocurre tanto en eucariotas como en procariotas. Es la vía predominante en células, especialmente en la clase de proteínas transmembrana constituidas por hélices alfa. La inserción en membrana ocurre principalmente vía el translocón Sec en eucariotas (Sec61) y procariotas (SecYEG), estructura por donde emerge la proteína lateralmente para posicionarse en la membrana (Harris et al., 2017).

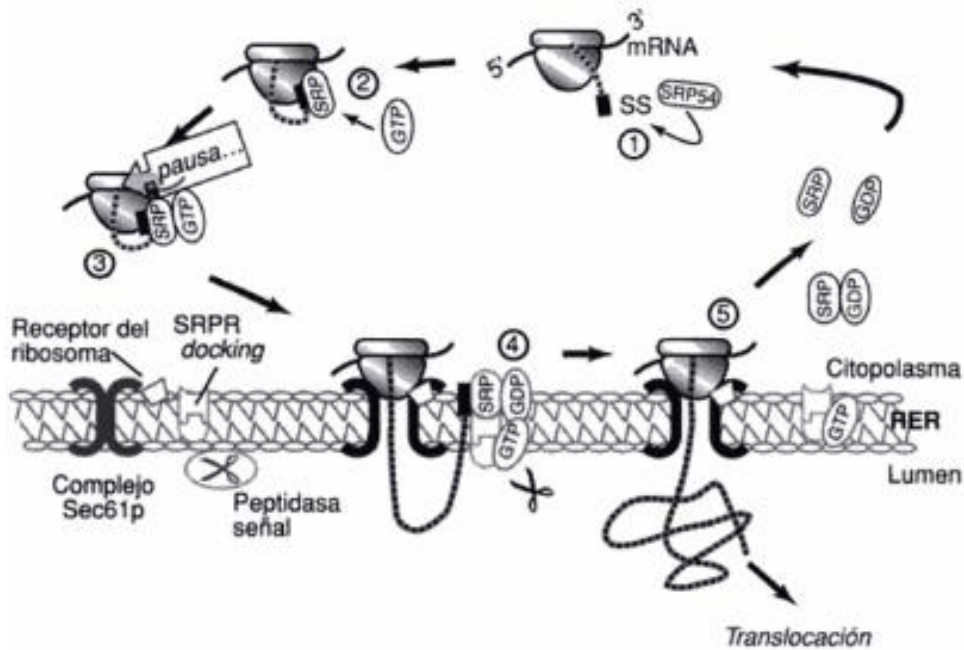
La vía cotraduccional utiliza la partícula de reconocimiento señal (SRP) para enviar las proteínas a la membrana. El núcleo universalmente conservado de la SRP contiene la proteína SRP54 (Ffh en bacteria). El dominio rico en metioninas de la SRP54 (o Ffh) es el encargado de reconocer las secuencias señal de los polipéptidos nascentes. El dominio GTPasa (dominio-NG) en la SRP54 (o Ffh) interacciona con el dominio-NG homólogo en la SR (llamado FtsY en bacteria), enviando así el complejo ribosoma-cadena nascente (RNC) al RE eucariota o a la membrana plasmática bacteriana. En la membrana, el RNC

se une al translocón Sec61 (o SecYEG en bacteria), a partir del cual la proteína nascente se integra o transloca a través de la membrana (Hwang Fu et al., 2017).

Alternativamente, las chaperonas del lumen del RE BiP/Grp78 garantizan el transporte unidireccional de la proteína nascente desde el canal de Sec61 hasta el lumen del RE. Para facilitar la interacción entre las chaperonas y el polipéptido, algunas otras proteínas como Sec63 median la interacción. Durante o después de que la translocación sea completada, la secuencia señal se corta por el complejo peptidasa señal, lo cual es seguido por el plegamiento de la proteína y modificaciones covalentes como N-glicosilaciones (Linxweiler et al., 2017).

Además, en bacteria, existe otro mecanismo basado en la proteína de membrana YidC, que está implicada en el plegamiento e inserción de las proteínas de membrana. Para dicha proteína, se han descrito dos mecanismos de acción, por un lado, YidC actúa como una insertasa independiente de Sec, que reconoce algunas proteínas de membrana y las libera en la membrana, proceso facilitado por la interacción entre la región transmembrana de las proteínas con las cadenas alifáticas lipídicas y del potencial de membrana. Y, por otro lado, YidC actúa como una chaperona de membrana dependiente de Sec, uniéndose a las proteínas accesorias SecDF. con el objetivo de estabilizar a las proteínas de membrana durante su inserción. De hecho, las proteínas Oxa1 y Alb3, homólogas a YidC, tienen la misma función en mitocondria y cloroplastos respectivamente (Kohler et al., 2009; Kumazaki et al., 2014; Nouwen and Driessen, 2002).





**Figura 3: Inserción cotraduccional de las proteínas de membrana.** Durante el proceso de inserción, la SRP se une a la secuencia señal (SS) situada en la N-t de la proteína de membrana mientras emerge del ribosoma. El complejo se une al receptor (SR) y se posiciona en el translocón. La SS es digerida por la peptidasa señal. En un proceso dependiente de GTP, la SRP se libera del complejo y la traducción continúa. Imagen de Jiménez, García and Merchant (2003).

## I2.2 Mecanismo de inserción postraduccional

Algunas proteínas debido a su baja hidrofobicidad o a que son muy cortas en longitud, se insertan mediante la ruta postraduccional, que ocurre una vez el ribosoma ha terminado su síntesis.

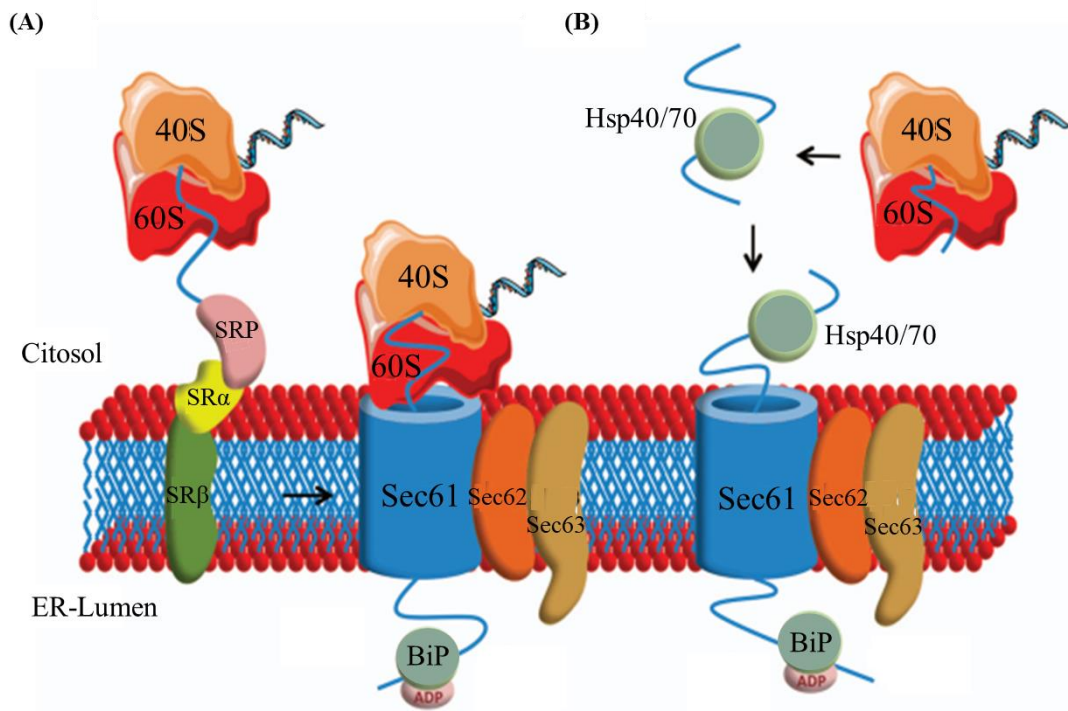
En eucariotas el proceso involucra a la proteína BiP, un homólogo de Hsp70 con actividad ATPasa que se encuentra en el lumen del RE (**Figura 4**). Para mantener la proteína en una estructura compatible con la translocación, las chaperonas citosólicas Hsp40 y Hsp70 se unen a la cadena polipeptídica previniendo el plegamiento. El complejo tiene afinidad por el tetrámero Sec62/Sec63, permitiendo su unión, lo que produce la liberación de las chaperonas y la introducción del polipéptido al canal de Sec61. En el canal del translocón, el polipéptido se une a la proteína del lumen BiP, impidiendo su vuelta hacia el citosol. La interacción entre BiP y Sec63 activa la hidrólisis de ATP. Finalmente, el intercambio

de ADP por ATP hace que BiP se libere del polipéptido, que acaba de translocarse (Linxweiler et al., 2017).

Las bacterias han desarrollado un mecanismo que empuja a las proteínas a través del canal del translocón empleando SecA. Este proceso implica la acción de SecB para ayudar en el direccionamiento a la membrana y prevenir la agregación, el plegamiento proteico y mantener a la pre-proteína en una conformación competente para la inserción (Gold et al., 2007a). El proceso comienza cuando la chaperona SecB se une a la cadena polipeptídica y la dirige al complejo formado por SecY y SecA. SecA es una ATPasa que consta de las subunidades NBF1 y NBF2. Cuando NBF2 se une al polipéptido e intercambia ADP por ATP, realizando un movimiento sobre NBF1 que empuja la cadena a través del canal formado por SecY. La hidrólisis de ATP hace que NBF2 retorne a su estado abierto (Gil, 2009).

Se ha observado que en *E. coli* algunas proteínas de membrana se insertan en la membrana interna de forma espontánea en presencia de YidC. Así pues, YidC parece estar implicada en la inserción de forma dependiente e independiente de la translocasa Sec (Samuelson et al., 2000). Las proteínas de membrana que usan para su inserción Sec y YidC están normalmente dirigidos por la SRP (por ejemplo, FtdQ y MtlA). Asimismo, las proteínas que usan la ruta de YidC independiente de Sec, también requieren de la SRP para su direccionamiento. Se ha comprobado que YidC forma un complejo con los componentes Ffh y FtsY, de la SRP. El homólogo a YidC en el cloroplasto, llamado Alb3, se ha encontrado asociado a un gran complejo que incluye cpSRP, cpFtsY y cpSecY. Además, Alb3 puede sustituir a YidC en *E. coli* (Dalbey and Kuhn, 2004; Luirink, 2004).

En mitocondria se ha observado que las proteínas que forman el complejo Sec están ausentes. En cambio, se requiere Oxa1 para la inserción de algunas proteínas de membrana interna de la matriz mitocondrial. Homólogos de Oxa1 están presentes en la membrana tilacoidal del cloroplasto (Alb3) y la membrana interna de las bacterias (YidC) (Samuelson et al., 2000).



**Figura 4:** Transporte de proteínas a través de la membrana del retículo endoplasmático. Mecanismo cotraduccional (A) y postraduccional (B) de transporte de proteínas a través del canal de Sec61. Imagen adaptada de Linxweiler et al. (2017).

#### *Proteínas ancladas por el extremo C-terminal (tail-anchored proteins) en mamífero*

Las proteínas TA (*tail-anchored proteins*) tienen el N-terminal localizado en el citosol anclado a la bicapa por un dominio transmembrana que se encuentra situado en el extremo C-terminal a no más de 30 residuos del mismo. Debido a que el transmembrana es la única secuencia que dirige al polipéptido a la membrana y a que emerge del ribosoma tras la completa traducción de la proteína, las proteínas TA están obligadas a insertarse mediante un mecanismo postraduccional (Borgese and Righi, 2010).

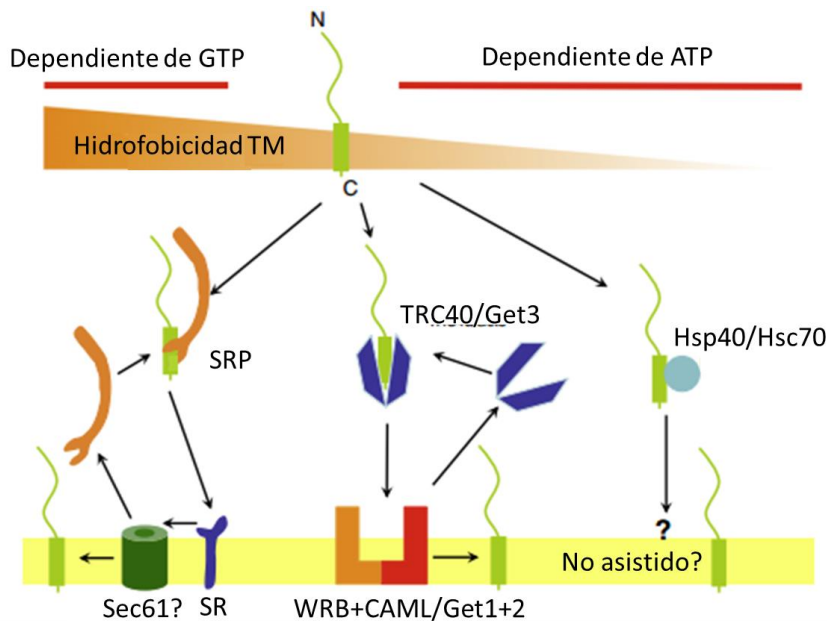
Las proteínas TA se encuentran presentes en todos los dominios de la vida y se asume que los mecanismos para su inserción en eucariotas modernos pueden haber sido originados de células procariotas ancestrales (Borgese and Righi, 2010).

En eucariotas las proteínas ancladas por el extremo C-terminal (*tail-anchored proteins* o TA) son un grupo de proteínas de membrana que están implicadas en una gran variedad de procesos celulares como transporte vesicular, translocación proteica y apoptosis

(Johnson et al., 2013). En mamíferos la inserción postraduccional ocurre casi de forma exclusiva en este tipo de proteínas. Las proteínas TA pueden encontrarse en la membrana externa de mitocondrias y cloroplastos, los peroxisomas y los compartimentos intracelulares que están conectados con las vías secretoras y endocíticas, incluyendo el RE, aparato de Golgi, la membrana plasmática, los endosomas y los lisosomas (Borgese et al., 2007).

Se considera que existen diferentes rutas para conducir las proteínas TA a la membrana (**Figura 5**). Las que tienen segmentos transmembrana moderadamente hidrofóbicos pueden ser insertadas en la bicapa lipídica con la asistencia de chaperonas y/o receptores específicos. En estudios *in vitro* se han observado tres sistemas de chaperonas: (1) Hsp40/Hsc70 cuando los transmembranas no son muy hidrofóbicos; (2) la SRP funcionando en modo postraduccional cuando los transmembranas son muy hidrofóbicos; (3) un transportador ATPasa llamado Asna1 o TRC40 en mamíferos y Get3 en levadura (Borgese and Righi, 2010).

TRC40 envía las proteínas TA al receptor del RE, compuesto por WRB y CAML. Un complejo adicional identificado en esta ruta es el formado por BAG6, TRC35 y Ubl4A y parece funcionar aguas arriba de TRC40, actuando para el envío de las proteínas TA al RE tras colectarlos cuando salen del ribosoma. SGTA, ha sido visto unido a proteínas TA y también está implicado en el control citosólico de proteínas localizadas incorrectamente. En levadura las proteínas TA se llevan a la membrana del RE mediante Get3 (TRC40), que interacciona en la membrana por su receptor compuesto por Get1 (WRB) y Get2 (CAML). Se han identificado los homólogos de TRC35 y Ubl4A, llamados Get4 y Get5, así como Sgt2 (SGTA). Se ha visto que Sgt2 se asocia a las proteínas TA mediante el segmento transmembrana para su transferencia a Get3 (Johnson et al., 2013).



**Figura 5: Vías para la biogénesis de las proteínas TA.** Las proteínas son reconocidas en el citosol por los diferentes factores que promueven su inserción en la membrana. La vía escogida está fuertemente influenciada por la hidrofobicidad del segmento transmembrana. Imagen adaptada de Johnson et al. (2013).

En *E. coli* se ha visto que las proteínas ancladas por su extremo C-terminal tienen dominios transmembrana menos hidrofóbicos que eucariotas. Basándose en las secuencias, no se han visto homólogos para GET3 en *E. coli*, pero debido a la baja hidrofobicidad de los transmembrana, las proteínas podrían estar insertándose mediante la vía no asistida o con ayuda de las chaperonas DnaK/DnaJ (Hsc70/Hsp40) (Borgese and Righi, 2010; Brambillasca et al., 2006).

### 13. Orientación de las proteínas en la membrana

Para que una proteína de membrana funcione correctamente, los dominios finales del segmento transmembrana deben encontrarse en el lado correcto de la membrana. El modelo convencional asume que la topología se fija cuando el primer segmento transmembrana de la proteína es integrado en la membrana mientras el ribosoma lo está sintetizando. En la mayoría de los casos, la integración en la membrana se lleva a cabo mediante el translocón Sec. Los cambios conformacionales en la puerta lateral del translocón, permiten a los segmentos suficientemente hidrofóbicos de la proteína integrarse como dominios transmembrana. Este modelo explica la mayoría de las

proteínas integrales de membrana con una sola topología, sin embargo, no puede explicar las proteínas de doble topología, que presentan la misma probabilidad de adoptar una de las dos topologías diferentes (Van Lehn et al., 2015).

Al menos tres factores determinan la orientación del dominio transmembrana. El primer factor es la distribución de los residuos cargados a ambos lados del segmento transmembrana, lo que se conoce con el nombre de *positive inside rule*. Esta regla establece que los residuos cargados positivamente (por ejemplo, lisina o arginina) están enriquecidos en la parte expuesta al lado citoplasmático de la membrana (von Heijne, 1986). Aunque existen ejemplos donde esta regla no se cumple, por ejemplo, cuando los residuos cargados negativamente se encuentran en grandes cantidades, cuando las cargas negativas se encuentran en los siguientes seis residuos desde el final de un fragmento transmembrana muy hidrofóbico o cuando las cargas negativas flanquean un segmento transmembrana marginalmente hidrofóbico. El segundo factor son las características de plegamiento del N-terminal localizado antes del transmembrana, ya que sólo serán translocadas las regiones sin estructura terciaria estable. El tercer factor es la longitud de la secuencia hidrofóbica, ya que las secuencias más largas favorecen la localización del N-terminal en el lumen del RE (Boekel, 2009).

Las proteínas que atraviesan una sola vez la membrana se pueden insertar en diferentes orientaciones (**Tabla 1**): Las proteínas de membrana tipo I tienen la secuencia N-terminal en la zona del lumen (Nout/Cin). Una carga neta positiva en los aminoácidos flanqueando la C-terminal, favorece este tipo de orientación. Estas proteínas poseen secuencias señal escindibles en el N-terminal, que son reconocidas por la SRP y su receptor y son transferidas al translocón.


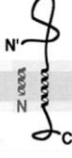

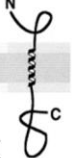
Las proteínas de membrana tipo II tienen la zona N-terminal en la zona citosólica (Nin/Cout) de la membrana. Una carga neta positiva en las secuencias flanqueando la N-terminal favorece este tipo de orientación. No contienen secuencia señal en el N-terminal, pero está localizada internamente en la secuencia polipeptídica. Es reconocida por la SRP e insertada en la membrana a través del translocón.

Las proteínas TA mencionadas anteriormente se diferencian de las proteínas de tipo II en su orientación y a que la ruta de inserción no es la cotraduccional.

Las proteínas de membrana tipo III se insertan en la membrana con el N-terminal exoplasmático y el C-terminal citoplasmático. Este tipo de proteínas se anclan mediante

una secuencia señal de anclaje reversa que induce la translocación del N-terminal a través de la membrana. Tanto la secuencia de anclaje como la secuencia de anclaje reversa son reconocidas por la SRP. Tienen una secuencia señal interna como las de tipo II, sin embargo, a diferencia de las de tipo II, las cargas positivas se encuentran en el extremo C-terminal (Boekel, 2009; Gilmore and Mandon, 2012; Goder and Spiess, 2001).

**Tabla 1:** Determinantes topogénicos de proteínas que atraviesan una sola vez la membrana. Imagen modificada de Goder and Spiess (2001).

Tipo de señal	Translocación C-terminal			Translocación N-terminal
<b>Determinantes topogénicos</b>	Señal C-terminal	Señal escindible + secuencia stop de transferencia	Señal de anclaje	Señal de anclaje reversa
<b>Maquinaria</b>	No conocida	SRP/SR/Sec61 + peptidasa señal	SRP/SR/Sec61	SRP/SR/Sec61
<b>exoplasmático topología final: citoplasmático</b>				
<b>Ejemplos</b>	citocromo b5; synaptobrevina	glicoforina; receptor LDL	receptor transferrina; galactosil transferasa	citocromo P-450; neuregulina

En el caso de proteínas complejas que atraviesan la membrana múltiples veces, se asume que la primera secuencia hidrofóbica es la responsable del direccionamiento de la cadena naciente al RE y de iniciar la translocación e inserción. De acuerdo a esto, las proteínas también pueden clasificarse en los tipos I, II y III en función de si la secuencia apolar N-terminal se escinde por la peptidasa señal o se encuentra en la membrana en una orientación Nin/Cout o Nout/Cin respectivamente (Goder and Spiess, 2001).

**I4. Interacción proteína-proteína**

Las interacciones entre proteínas son críticas para los procesos celulares tales como la formación de estructuras macromoleculares, complejos enzimáticos y la regulación y transducción de señales. Comprender las interacciones proporciona información sobre el funcionamiento de las células y resulta de utilidad para el diseño de fármacos destinados a dianas específicas y al tratamiento de patógenos (De-La-Torre et al., 2003).

Las interacciones entre proteínas son permanentes o transitorias y estas últimas pueden ser fuertes o débiles. Las interacciones permanentes están asociadas a proteínas que se purifican como complejos multi-subunidad. Las transitorias controlan la mayoría de los procesos celulares, son temporales y requieren condiciones específicas como fosforilaciones o cambios conformacionales para que la interacción tenga lugar. Las interacciones transitorias fuertes pueden cambiar su estructura terciaria cuando se activan, en cambio las débiles se caracterizan por tener una baja afinidad de unión y tiempos de vida muy cortos (Goebels, 2014; Phizicky and Fields, 1995).

Desde un punto de vista químico, las interacciones entre proteínas están principalmente mediadas por fuerzas intermoleculares no covalentes, incluidas interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Chen, 2015). Cuando las proteínas se unen, los componentes del complejo entierran parte de su área superficial accesible, que debido al contacto proteína-proteína, se convierte en inaccesible para el solvente. Esta superficie se conoce como interfaz de interacción y suele ser de entre 1500-3000 Å<sup>2</sup>. Las interfaces están compuestas principalmente de aminoácidos hidrófobos. Esto se observa más claramente en las interacciones estables, donde las proteínas tienen una composición muy similar al interior proteico, mientras que en el caso de los complejos transitorios esto no es tan evidente (Chaurasia, 2013).

Algunas de las funciones que desempeñan las interacciones proteicas son: **1.** modificar las propiedades cinéticas de las enzimas. **2.** Actuar como un mecanismo para canalizar la entrada o salida de sustratos. **3.** Construir sitios de unión para moléculas efectoras. **4.** Inactivar o suprimir una proteína. **5.** Cambiar la especificidad de una proteína por un sustrato. **6.** Ejercer un papel regulador (Rao et al., 2014).

Algunas técnicas empleadas para la caracterización de las interacciones proteína-proteína son métodos *in vitro* como la cromatografía de afinidad o de filtración en gel, cristalografía, espectroscopía NMR, coimmunoprecipitación, *arrays* de proteínas o la complementación de fragmentos de proteínas. Las técnicas *in vivo* comúnmente utilizadas son la detección de interacciones con el sistema doble híbrido de levadura o *knock out*. Algunas de las técnicas *in silico* incluyen *docking*, métodos basados en los árboles filogenéticos, en la proximidad cromosómica o en la fusión de genes (Rao et al., 2014). También existen aproximaciones para detectar la interacción proteína-proteína a mayor



escala, como los ensayos de doble híbrido, las purificaciones por afinidad, la inmunoprecipitación y la espectrometría de masas (Peleato, 2007).

Por otro lado, las interacciones transitorias y especialmente las débiles, se identifican usando métodos que fijan dicha unión, tales como el entrecruzamiento. Los reactivos de entrecruzamiento consisten en dos grupos reactivos conectados por un brazo espaciador utilizado para unir de forma covalente dos residuos de aminoácidos que se encuentran en la proximidad. Después del entrecruzamiento, las proteínas suelen ser hidrolizadas con proteasas y los di-péptidos entrecruzados y analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. La identificación de los productos del entrecruzamiento cuando éstos continúan unidos requiere el uso de un software especializado que concatene secuencias peptídicas de diversas proteínas y regiones. El uso de entrecruzadores químicos tiene ventajas sobre los que se activan con luz UV, ya que pueden emplearse para identificar casi todos los complejos proteicos de interés y no requiere la incorporación de aminoácidos activables por UV (Haupt et al., 2017).

## **I5. Espectrometría de masas**

La proteómica puede definirse como el estudio a gran escala de las proteínas cuyo objetivo es identificar y caracterizar las proteínas presentes en una muestra. El estudio del proteoma es complicado, debido a su variabilidad, ya que, dependiendo de las condiciones, las proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales, además de estar sobre o sub-expresadas según diferentes variables como cambios en el entorno, el tipo celular, el tejido o el organismo.

Simplificando, se pueden describir tres tipos de estudios proteómicos que permiten identificar las proteínas, así como estudiar su estructura e interacción con otras proteínas (Santana, 2015):

1. Estudio proteómico de la expresión, que implica la identificación del mayor número de proteínas presente en una muestra. Algunas de las técnicas utilizadas para ello son la electroforesis bidimensional o la cromatografía líquida, ambas analizadas después mediante espectrometría de masas.

2. Estudio proteómico estructural, que permite observar cómo el plegamiento de una proteína se relaciona con su función, compara estructuras proteicas y muestra el lugar de interacción entre proteínas. Para ello se utilizan técnicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear.

3. Redes de proteínas para determinar el conjunto de interacciones de un grupo de proteínas en un organismo o tipo celular y analizar su función. Algunas técnicas utilizadas en este caso son la purificación por afinidad, sistema de levadura de doble híbrido o el análisis mediante espectrometría de masas.

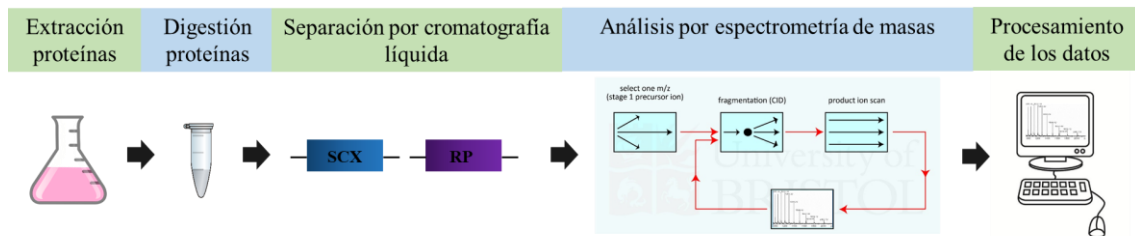
Parte de los avances en proteómica han tenido lugar debido al desarrollo de la espectrometría de masas, así como otras técnicas como la electroforesis bidimensional o la cromatografía líquida.

La espectrometría de masas es un método en el que las moléculas de una muestra de proteínas se ionizan y separan por su relación carga/masa ( $m/z$ ), siendo posteriormente detectadas y registradas. En este tipo de experimentos, las proteínas son previamente disueltas en una fase líquida y digeridas por endoproteinasas como la tripsina. La mezcla peptídica es separada por cromatografía líquida y eluida en el espectrómetro de masas. Entonces, las moléculas se ionizan en una fase gaseosa y los iones y fragmentos moleculares resultantes se separan de acuerdo a su  $m/z$ . El resultado es la obtención de un espectro de masas, en el que se representa la intensidad de los iones respecto a su  $m/z$ . Por último, las proteínas se identifican estimando el grado de similitud entre el espectro obtenido y espectros teóricos derivados de secuencias en una base de datos conocida (Haupt et al., 2017).

Para llevar a cabo las funciones descritas, un espectrómetro de masas consta de los siguientes elementos: una fuente de producción de iones en estado gaseoso (ionizador), un separador de iones de acuerdo a su relación  $m/z$  (analizador) y detector de iones para cuantificar los iones de cada  $m/z$  que atraviesan el instrumento. Existen diferentes tipos de fuentes de ionización como el MALDI y el ESI, así como de analizadores de masa como son los cuadrupolos (Q), los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), las trampas iónicas (IT) y los orbitrap, que pueden emplearse solos o en combinación. Los analizadores se diferencian en el rango de  $m/z$ , resolución, precisión y sensibilidad (Kicman, 2007).

Ahora bien, dada la gran complejidad de las muestras biológicas, es necesario utilizar técnicas analíticas que permitan adecuar la muestra al análisis mediante espectrometría de masas. Primero se realiza la extracción de las proteínas del material de partida, siendo este procedimiento diferente según el objetivo del estudio. Posteriormente, se somete a la muestra a una separación de sus componentes, que nos permitirán analizar la proteína de interés o un conjunto de las mismas (Gómez y González, 2010) (**Figura 6**).

Por ejemplo, en algunos casos en los que se quiere obtener información a nivel peptídico de una muestra de proteínas, éstas pueden digerirse mediante métodos enzimáticos. Entonces, si la mezcla es compleja, se separa mediante cromatografía líquida, electroforesis SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) o electroforesis bidimensional antes del análisis mediante espectrometría de masas.



**Figura 6: Ejemplo de un protocolo general para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.** Se muestran en la imagen los diferentes pasos: primero se realiza una preparación de la muestra mediante extracción de las proteínas, seguida de una digestión mediante endoproteinasas. Posteriormente los péptidos se separan mediante cromatografía líquida. Luego, se realiza un análisis mediante espectrometría de masas. Por último, los datos de espectrometría se procesan mediante métodos computacionales. SCX Strong Cation eXchange chromatography. RP Reverse Phase chromatography. Imagen modificada de Di Silvestre et al. (2016).

Una vez que los péptidos se han separado, entran en el espectrómetro de masas, donde los iones precursores son separados en función de su carga masa ( $m/z$ ) mediante un analizador de masas. Estos valores se registran en un espectro de masas o MS1. Cuando la espectrometría de masas se acopla a la cromatografía líquida, recibe el nombre de LC-MS (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*). Adicionalmente, los péptidos de mayor intensidad pueden ser seleccionados para ser fragmentados, de forma que se generan espectros de fragmentación o MS2, que son valores de  $m/z$  y de intensidad para sus fragmentos. En este caso se utilizan dos analizadores de masa y la técnica se denomina

LC-MS/MS (*Liquid Chromatography tandem–Mass Spectrometry*). La ventaja del LC-MS/MS frente al LC-MS es que permite obtener información de la secuencia del péptido analizado. Una vez adquiridos los espectros se realiza el análisis computacional en el que los espectros se comparan con bases de datos de secuencias proteicas. A cada espectro se le da una puntuación que mide la similitud entre el espectro adquirido y los espectros teóricos generados en la base de datos (<https://www.dcbiosciences.com/>).

### **I5. 1 Tipos de adquisición de los espectros de fragmentación**

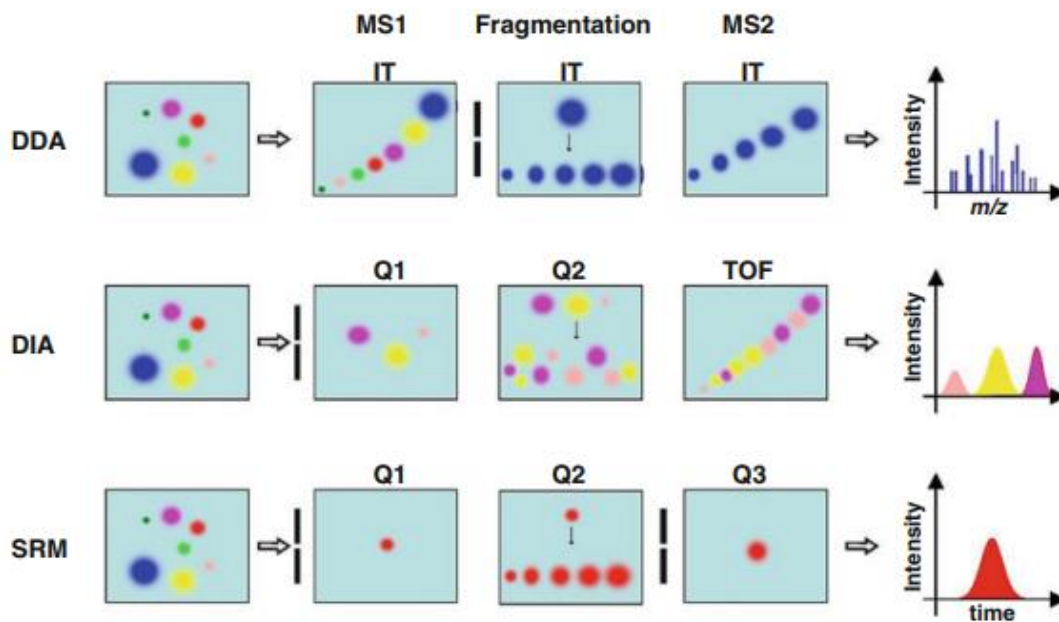
En proteómica se emplean tres estrategias principales para la caracterización de proteínas mediante LC-MS/MS que difieren en el método de adquisición utilizado (**Figura 7**). En los tres casos la muestra previamente se digiere con proteasas y se separa mediante cromatografía líquida:

1. En el primer caso, la proteómica *shotgun*, tiene como objetivo detectar la mayor cantidad de proteínas posible en una muestra. Para ello se utiliza una adquisición dependiente de datos (DDA) en la que se realiza un espectro MS1 para detectar los iones que está fluyendo de la columna. A partir de este espectro, el espectrómetro de masas selecciona una serie de iones o precursores, generalmente los iones más intensos, para ser fragmentados (MS2). De esta forma, el instrumento funciona realizando ciclos en los que un MS1 es seguido de varios MS2. La identificación se realiza comparando los MS2 con los espectros de masas generados *in silico* a partir de las proteínas de las bases de datos (Zhang et al., 2013).

2. En el segundo caso, se pretende cuantificar un grupo de proteínas seleccionadas. La adquisición de los datos se hace de un modo independiente de datos (DIA). En este caso, el instrumento también funciona de manera cíclica, pero en lugar de fragmentar iones concretos, divide el rango total de  $m/z$  en una serie de ventanas de selección. De esta manera se fragmenta todo el rango de  $m/z$  operativo del instrumento en cada ciclo. Como no se seleccionan iones concretos se consigue fragmentar todos los iones que entran en el instrumento. Si bien existen algoritmos de identificación a partir de este tipo de datos, la verdadera fortaleza y utilidad de este procedimiento se basa en la reconstrucción de los perfiles de elución de los fragmentos peptídicos almacenados en una librería de espectros. Estos perfiles de elución permiten obtener datos cuantitativos de las proteínas de gran

calidad y de una manera altamente reproducible. Se consigue, por tanto, una mayor cobertura de las proteínas cuantificadas y un menor sesgo hacia las proteínas más abundantes (Bauer et al., 2014) (<http://rebrand.ly/waters>).

3. El SRM/MRM es una técnica de adquisición de datos empleada para realizar proteómica dirigida, en la que se cuantifican un grupo de proteínas concreto de las que se conoce el valor  $m/z$  de sus iones precursores, así como de sus fragmentos. Para ello se usa un analizador de masa de tipo triple cuadrupolo, que permite monitorizar conjuntos de valores  $m/z$  de un precursor y sus fragmentos correspondientes. Este sistema hace necesario el uso de péptidos proteotípicos, cuya secuencia peptídica es única y específica de la proteína a la que corresponde. La señal de los fragmentos y la información del tiempo de retención, permiten reconstruir un pico de elución de los fragmentos que coeluyen en el tiempo de retención del péptido monitoreado (Bollinger et al., 2016; Shi et al., 2016).



**Figura 7: Métodos de adquisición de espectros mediante espectrometría de masas.** Mediante DDA los iones más abundantes se seleccionan para su fragmentación. La adquisición se realiza mediante ciclos de escaneo de los fragmentos. Mediante DIA un grupo de iones precursores se aíslan secuencialmente en pequeñas ventanas de masa y los espectros de los fragmentos se registran. Mediante SRM los iones precursores de péptidos de  $m/z$  conocida se seleccionan, fragmentan y se recoge la intensidad de señal en el tiempo. DDA: Data Dependent Acquisition. DIA: Data Independent Acquisition.

*SRM: Selected Reaction Monitoring. IT: Ion Trap. Q: Quadrupole. TOF: Time Of Flight.*  
*Figura extraída de Di Silvestre et al. (2016).*

## **I5.2 Cuantificación de proteínas**

Los datos generados de un experimento de masas típico no es directamente cuantitativo, ya que la eficiencia de ionización depende de muchos factores, entre ellos la composición de aminoácidos de una proteína, el método de ionización y el tipo de instrumento (Hubbard and Jones, 2010). Por ello, se han desarrollado varias tecnologías para la cuantificación del proteoma usando LC-MS/MS. Las principales aproximaciones son:

**1.** El marcaje isotópico, que consiste en la incorporación de isótopos estables en las proteínas. Esta incorporación puede realizarse metabólicamente mediante la incorporación de aminoácidos marcados con  $^{13}\text{C}$  y/o  $^{15}\text{N}$  presentes en el medio de cultivo (SILAC) (Ong et al., 2002). Alternativamente, los isótopos se pueden incorporar químicamente utilizando reactivos especialmente diseñados para la cuantificación por espectrometría de masas como el ICAT (Gygi et al., 1999) o el compuesto isobárico iTRAQ (Ross et al., 2004).

Las etiquetas permiten diferenciar más de una muestra, que pueden analizarse en un mismo experimento. Los péptidos de las muestras se mezclan en cantidades equimoleculares y se analizan mediante espectrometría de masas. Debido a que la composición química del ion marcado será la misma que la del ion sin marcar, la eficiencia de ionización sigue siendo la misma y por tanto las cantidades de péptidos se pueden comparar directamente, pudiendo distinguirse por la diferencia de masa correspondiente al marcaje isotópico (Hubbard and Jones, 2010; Meyer and Selbach, 2015).

**2.** Los métodos sin marcaje o *label-free*, cuantifican las proteínas usando métodos computacionales. Básicamente, hay dos estrategias para llevar a cabo la cuantificación. La primera se basa en la frecuencia de péptidos o espectros asignados a una proteína. La segunda se basa en la intensidad de la señal de los péptidos identificados (Monteoliva et al., 2019).

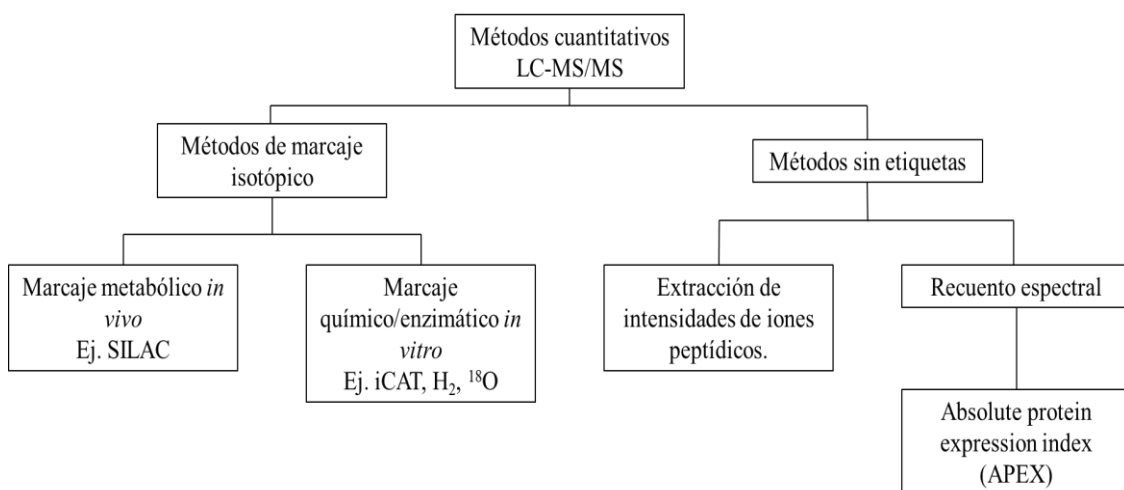
El método más simple es el recuento espectral. Está basado en el hecho de que cuanto más abundante es una proteína, más péptidos de la misma se identificarán, puesto que, al

aumentar su concentración, también aumenta la probabilidad de que sean fragmentados. Debido a que en un experimento LC-MS/MS las proteínas más grandes producen más péptidos que las pequeñas a una misma concentración molar, se tiene en cuenta el tamaño de las proteínas. La cuantificación se realiza contando los péptidos o los espectros asignados a cada proteína (Hubbard and Jones, 2010; Martins-de-Souza, 2014; Zhu et al., 2010).

Para normalizar el número de péptidos asignados a cada proteína y eliminar el efecto del tamaño de las proteínas, se utilizan varios métodos, por ejemplo, el emPAI (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*), que tiene en cuenta la secuencia de las proteínas y las condiciones cromatográficas (Ishihama et al., 2005) o el NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*), que normaliza por la longitud de las proteínas (Paoletti et al., 2006).

Por ejemplo, el APEX (*Absolute Protein Expression*) es una técnica de recuento espectral modificada para tener en cuenta el número de espectros de masas de los péptidos observados para una proteína y la probabilidad de que dichos péptidos sean detectados, lo que nos da una idea de la abundancia absoluta de las proteínas (Hubbard and Jones, 2010; Martins-de-Souza, 2014; Zhu et al., 2010).

El otro método de cuantificación sin etiquetas se basa en la intensidad de iones. Así, se ha observado que la suma de las intensidades de los péptidos detectados para cada proteína, es proporcional a la abundancia de dicha proteína (Silva et al., 2006). Por tanto, los datos de intensidad de los péptidos pueden ser utilizados para cuantificar proteínas.



**Figura 8:** Estrategias para la cuantificación de proteínas mediante LC-MS/MS. Imagen modificada de Hubbard and Jones (2010).

Generalmente, los métodos basados en isótopos son más precisos porque consiguen combinar varios experimentos al mismo tiempo, aunque por otro lado requieren de más pasos para la preparación de los experimentos. Los métodos sin etiquetas son más sencillos de realizar y más económicos, además se pueden aplicar a cualquier tipo de muestra, incluso aquellas que no pueden ser tratadas con métodos isotópicos y no existe límite en el número de muestras que pueden ser comparadas.

**3. SRM/MRM (*Selected/Multiple Reaction Monitoring*).** Este método utiliza para el análisis cuantitativo un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QQQ). El primer cuadrupolo se usa para filtrar un ión particular (precursor) según su  $m/z$ , que se fragmenta en la celda de colisión o segundo cuadrupolo para generar iones del compuesto o fragmentos, los cuales se filtran en el tercer cuadrupolo nuevamente según su  $m/z$ . La relación  $m/z$  de un péptido y su correspondiente  $m/z$  del ión producido se denominan transición. Para monitorizar la proteína de interés se debe saber cuál es la transición más adecuada. En mezclas peptídicas simples puede servir una sola transición, pero en complejas se requieren múltiples transiciones debido a que el ruido y las proteínas de mayor abundancia interfieren en la señal (Mead et al., 2009). Este sistema de selección de masa a dos niveles da como resultado una alta selectividad, sensibilidad y amplio rango dinámico, lo que permite la detección de proteínas de baja abundancia en mezclas muy complejas (Lange et al., 2008; Vidova and Spacil, 2017).

Esta aproximación experimental se conoce como proteómica dirigida, ya que se analizan un menor número de proteínas seleccionadas antes de realizar el experimento, por lo que a menudo se basa en experimentos previos de SILAC, iTRAQ o métodos de cuantificación sin etiqueta entre otros.

Una vez se elige la proteína de estudio, el usuario escoge varios péptidos únicos para cada proteína de las bases de datos existentes o mediante el uso de un algoritmo que analice la secuencia de las proteínas escogidas para predecir los mejores péptidos para el análisis MRM (Colangelo et al., 2013). Posteriormente se cuantifican las áreas de los picos cromatográficos de las transiciones realizadas como medida de la abundancia (Drabovich et al., 2012). Con el valor absoluto de las intensidades se puede realizar una cuantificación relativa de tipo *label-free*. Tal y como se hace en todos los métodos descritos, para corregir errores en la cantidad de muestra cargada, estabilidad del spray y otros factores, se normalizan los datos, lo que se realiza frente a la señal total o añadiendo un estándar



interno marcado con isótopos estables que sirva de referencia o cuantificando de forma interna algunas proteínas abundantes que teóricamente se mantengan estables (*housekeeping*) (Chung et al., 2014; Lange et al., 2008).

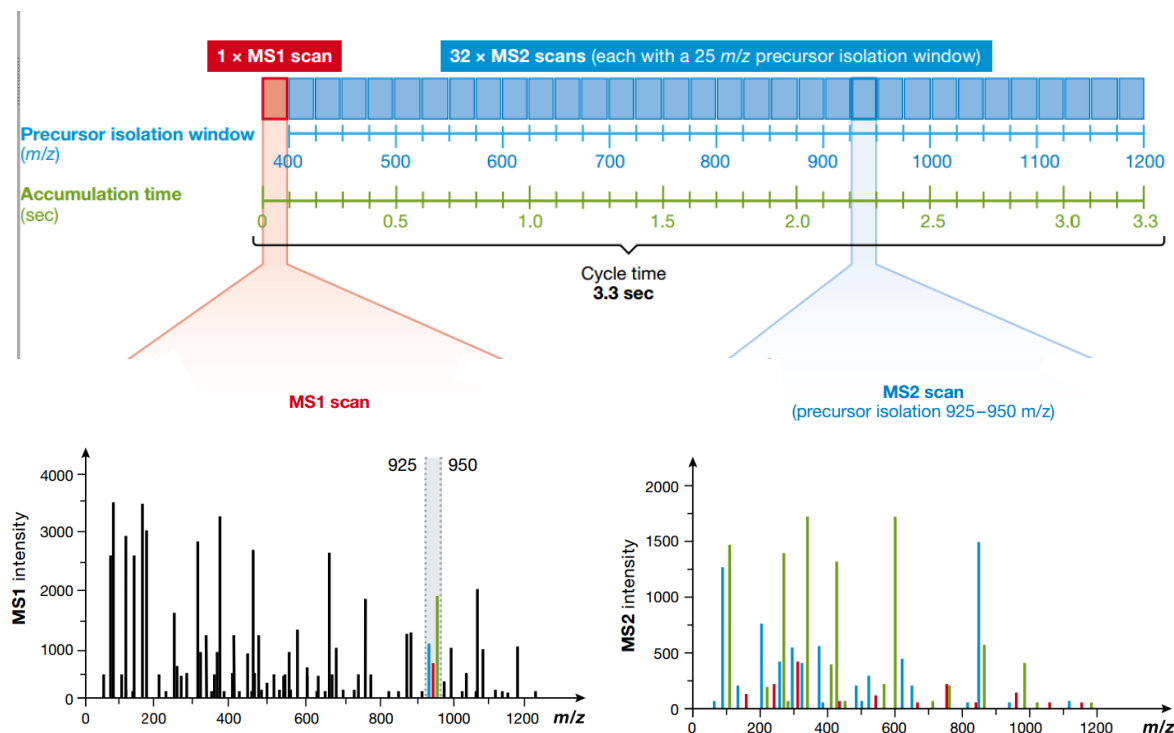
4. Recientemente, se ha descrito la técnica de espectrometría SWATH (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment ion spectra*) como una variante del modo DIA (Gillet et al., n.d.). Este método se usa para cuantificar muestras de proteínas sin añadir etiquetas, presentando una buena cobertura y precisión. Las muestras se digieren con tripsina y los péptidos resultantes se analizan mediante LC-MS/MS operando en modo DIA, lo que implica que no es necesaria la selección de iones precursores para la adquisición de espectros (Fernández, 2015; Zhang et al., 2015).

Así, mediante el método de adquisición DIA, el espectrómetro de masas realiza ciclos de 2-4 segundos a través de un conjunto de ventanas de adquisición de precursores diseñadas para cubrir un rango de  $m/z$  de 400-1200, lo que se realiza mediante un analizador de masas Q-TOF o Q-Orbitrap y en el que se incluyen la mayoría de los péptidos precursores. En cada ciclo, el espectrómetro fragmenta todos los precursores de cada ventana de aislamiento, que abarcan una  $m/z$  de 25 cada una y registra el espectro de masas de todos los fragmentos incluidos en ellas. Al escanear de forma rápida y consecutiva todas las ventanas de aislamiento, llamadas *swathes*, se cubre el rango completo de  $m/z$  para los iones precursores de los péptidos tripsinizados (**Figura 9**) (<http://www.imsb.ethz.ch/research/aebersold/research/swath-ms.html>) (Aebersold and Mann, 2016; Rosenberger et al., 2014; Röst et al., 2014)

Los datos adquiridos en modo SWATH forman un mapa en 3D en el que se representa la  $m/z$ -intensidad-tiempo de retención de los iones. A partir de estos datos, se crean los cromatogramas de ion extraídos (XIC) para cada fragmento, que es la intensidad de los iones a lo largo del tiempo para un valor de  $m/z$  específico. El área del XIC de los iones se utiliza para cuantificar los iones y la cuantificación de las proteínas se realiza a partir de estos valores (Frederick and Ciborowski, 2016). Los XIC de cada fragmento iónico se asignan a la proteína original utilizando bibliotecas basadas en los datos obtenidos mediante *shotgun* (Chen et al., 2017).

Como se ha explicado, los datos son adquiridos usando el espectrómetro de masas en modo DIA, pero el análisis requiere una librería espectral, que se prepara utilizando el

espectrómetro en modo DDA y que se utiliza como referencia para identificar las proteínas de cada experimento (Frederick and Ciborowski, 2016)



**Figura 9: Cuantificación de los péptidos mediante SWATH.** Se registra un espectro de un único ión precursor (MS1) seguido de una serie de espectros de los fragmentos iónicos (MS2) con ventanas de aislamiento de  $m/z$  25. El espectrómetro de masas realiza 32 escáneres MS2 con incrementos de 25  $m/z$ , que comienzan en  $m/z$  400 y terminan en 1200  $m/z$ . El MS1 detecta todos los péptidos precursores que eluyen en el mismo punto (por ejemplo, con una  $m/z$  de entre 925 y 950). El escáner MS2 (en el ejemplo con una ventana de aislamiento de entre 925 y 950  $m/z$ ) representa los espectros mezclados con todos los fragmentos de los péptidos provenientes del MS1. Imagen de Ludwig et al., 2018.

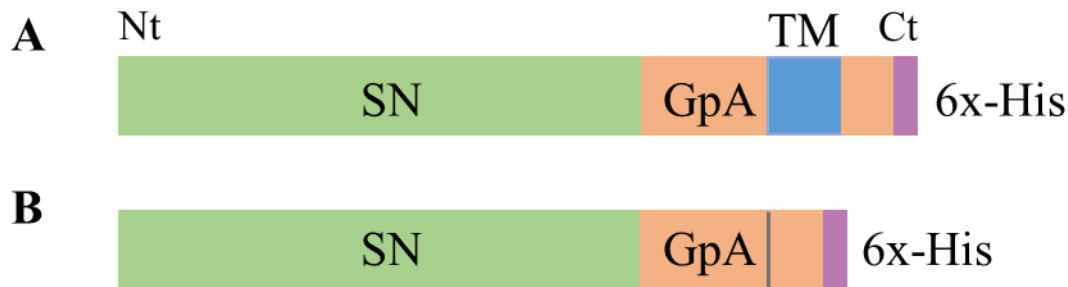
# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## M1. Biología molecular y cultivos

### M1.1 Descripción de las quimeras TM y $\Delta$ TM

Se desarrollaron dos proteínas quimera con el objetivo de identificar y caracterizar el interactoma implicado en la inserción de proteínas de membrana. La **quimera TM** (**Figura 10A**) contenía el segmento transmembrana de la glicoforina A, la secuencia de la nucleasa de *Staphylococcus aureus* y una etiqueta de histidinas 6x-His. La **quimera  $\Delta$ TM** (**Figura 10B**) se diseñó de forma idéntica a la anterior, pero sin el segmento transmembrana, de forma que, al ser una proteína soluble, pudiera usarse como control de los experimentos. Ambas construcciones se clonaron en un vector pET11a y se transformaron en *E. coli* BL21(DE) pLysS (Millipore) (ver secuencias en el **ANEXO 2**).



**Figura 10: Representación esquemática de las quimeras TM (A) y  $\Delta$ TM (B).** Se muestra en la imagen la nucleasa de *S. aureus* (SN), la glicoforina A (GpA) con y sin el segmento transmembrana (TM) y la cola de histidinas (6x-His).

## M1.2 Expresión de proteínas

### M1.2.1 Quimeras TM y $\Delta$ TM en *E. coli* BL21 pLysS

Las proteínas quimera TM y  $\Delta$ TM se clonaron en vectores pET11a y se transformaron en la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE) pLysS (Millipore). La expresión se realizó creciendo pre-cultivos de *E. coli* en medio Luria-Bertani (LB) (**ANEXO 1**) suplementado con ampicilina y cloranfenicol (100  $\mu$ g/ml) durante 12 h a 37 °C en agitación constante. Los pre-cultivos se inocularon en una proporción 1:10 en medio Terrific Broth (TB) suplementado con ampicilina y cloranfenicol (100  $\mu$ g/ml) y se crecieron a 37 °C para obtener un cultivo final. La inducción se realizó con IPTG 1 mM cuando la OD alcanzó

valores en torno a 2,7 y tras la inducción, los cultivos se dejaron crecer 30 min más. Los cultivos se recogieron centrifugando con un rotor JLA8100 (Beckman Coulter) a 6.500 rpm durante 20 min a 4 °C. El precipitado de células se lavó dos veces con PBS pH 7,5 y se realizó una extracción del contenido celular sonicando durante 20 s a pulsos con una amplitud del 40%. Los restos celulares se separaron mediante una centrifugación con un rotor FA-45-24-11 (Eppendorf) a 5.700 rpm durante 15 min a 4 °C.

### **M1.2.2 Proteínas HslU y MetH en la librería ASKA**

Las proteínas HslU y MetH se expresaron y purificaron a partir de la librería ASKA (Kitagawa et al., 2006). Esta librería creada a partir de la cepa de *E. coli* K12, contiene un conjunto de genes individuales clonados, que codifican para sus respectivas proteínas. Los genes se encuentran en un vector pCA24N que incluye un gen de resistencia a cloranfenicol. Las proteínas traducidas a partir de estos clones, están unidas a una cola de histidina, así como a siete aminoácidos espaciadores en el extremo N-terminal y cinco aminoácidos espaciadores y una secuencia GFP en su extremo C-terminal.

Las condiciones para su crecimiento y expresión fueron las que siguen. Se escogieron los clones JW3902-AP y JW3979-AP de la librería ASKA, que nos permitía la sobreexpresión de la proteína HslU y MetH respectivamente. Las células se crecieron en medio Terrific Broth (TB) (**ANEXO 1**) a 37 °C suplementado con 30 µg/ml de cloranfenicol hasta que la OD alcanzó un valor de 2,5. Se añadió 1 mM de IPTG a los cultivos y se incubaron 3 h hasta su recogida mediante centrifugación a 6.500 rpm durante 20 min a 4 °C en un rotor JLA8100 (Beckman Coulter). Las células se lavaron dos veces en PBS pH 7,5 y finalmente, se resuspendieron en el mismo tampón. Se realizó la sonicación durante 20 s a pulsos con una amplitud del 40%. Los restos celulares se separaron mediante una centrifugación con un rotor FA-45-24-11 (Eppendorf) a 5.700 rpm durante 15 min a 4 °C.

### M1.3 PCR en tiempo real (qPCR)

Se estudió la expresión génica de algunas proteínas identificadas en el interactoma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en *E. coli* cuando las quimeras TM y  $\Delta$ TM eran sobreexpresadas.

Se crecieron 50 ml de cultivo de *E. coli* BL21 conteniendo las quimeras TM y  $\Delta$ TM. La inducción de las proteínas se realizó con IPTG 1 mM durante 30 min cuando la OD<sub>600</sub> alcanzó un valor de 2,7. Las células se recogieron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Los precipitados celulares se lavaron dos veces con PBS y finalmente se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS. La extracción de RNA se realizó añadiendo 750  $\mu$ l de trizol e incubando las muestras durante 5 min a temperatura ambiente. Se incorporaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitaron con vórtex durante 15 s. Las muestras se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C. El RNA se precipitó añadiendo 500  $\mu$ l de isopropanol a la fase acuosa e incubándolo 2 h a -20 °C. Las muestras se atemperaron 10 min a temperatura ambiente. El RNA se purificó centrifugando las muestras a 12.000 xg, durante 10 min a 4 °C y lavando el precipitado dos veces con 500  $\mu$ l de etanol al 75%. El RNA se secó durante 20 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua Milli-q estéril. Se cuantificó la cantidad de RNA presente en las muestras con un espectrómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se diluyó hasta 200 ng/ $\mu$ l. El RNA fue tratado con DNAsa (Thermo Fisher) tal y como indican las especificaciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron a 10.000 xg durante 2 min a 4 °C y se transfirieron a un tubo nuevo. Se realizó la transcripción reversa del RNA usando la *Maxima Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher) tal y como indican las especificaciones del fabricante.

La qPCR se llevó a cabo usando cebadores específicos (**Tabla 2**) para la detección simultánea de los siguientes genes diana: *secY*, *hslU*, *metH*, *ffh*, *dnaJ*, *clpA*, *yqjD*, *hslV*, *dnaK*, *groES*, *groEL* y *glpA* (**Tabla 3**). Los cebadores fueron diseñados con el programa *GeneScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design*. Cada 10  $\mu$ l de reacción estaban compuestos por 5  $\mu$ l de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1  $\mu$ l de los cebadores directo y reverso 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de cDNA y 3  $\mu$ l de agua Milli-q estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *C1000 Therman Cyler* (BioRad). Las muestras se amplificaron como sigue: un paso inicial de desnaturalización de 95 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 30 s. Después

de la amplificación, los datos de Ct se analizaron mediante el método del  $\Delta\Delta Ct$  para obtener una cuantificación relativa de los mismos (Schmittgen and Livak, 2008). Usamos como control endógeno de referencia el gen *glpA* y como calibrador, la cuantificación obtenida en la quimera  $\Delta TM$ .

Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{gen referencia}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{calibrador}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra}}$$

**Tabla 2:** descripción de los cebadores empleados en la qPCR para amplificar los genes de interés. En la Tabla se indican las secuencias nucleotídicas de los cebadores, la posición en la que hibridan dentro del gen y el tamaño del amplicón.

Gen	Nombre	Secuencia cebador (5'-3')	T <sub>m</sub> cebador (°C)	Posición en la secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
<i>secY</i>	secY_rtPCR_1_f	GTTGCCGATACCTCGTTCAG	55,8	778	
	secY_rtPCR_1_r	CACCGCTGTTGTAAGTCTGG	55,9	840	82
<i>hslU</i>	hslU_rtPCR_3_f	GAAGAAGAAGCGGCGAAACT	55,9	679	
	hslU_rtPCR_3_r	CTGCTCAACAGCGTCGATAG	55,9	728	69
<i>metH</i>	metH_rtPCR_3_f	ACCTTCAACTCCACGACCAT	55,9	247	
	metH_rtPCR_3_r	AAGTTGATTTCCGCCGACAG	55,9	295	68
<i>ffh</i>	ffh_rtPCR_2_f	ATGTTGGTCAGAAGCCGGTA	56	488	
	ffh_rtPCR_2_r	CGTCAACCACAAACAGGGTT	55,9	648	180
<i>dnaJ</i>	dnaJ_rtPCR_3_f	GAAGTCCCCGATCAACTTCGC	56,1	796	
	dnaJ_rtPCR_3_r	AGTTTGACGCGACCATCAAG	55,9	853	77
<i>clpA</i>	clpA_rtPCR_1_f	GAGCGCAAATCCATTGGTCT	55,9	1837	
	clpA_rtPCR_1_r	TGTCGAGACGGTTACGGAAT	55,9	1917	100
<i>yqjD</i>	yqjD_rtPCR_1_f	CATCTGCGTGCTGAGTTGAA	55,9	25	
	yqjD_rtPCR_1_r	CTCTGTTTCAGTGCCTGCTC	55,9	130	125
<i>hslV</i>	hslV_rtPCR_1_f	ATCAGGGCCATCTGGTCAAA	55,9	203	
	hslV_rtPCR_1_r	CAGCAGTGCTTCAAGTTTGC	55,6	269	86
<i>dnaK</i>	dnaK_rtPCR_2_f	ACACCACTATCCCGACCAAG	56,1	1244	
	dnaK_rtPCR_2_r	TACCGCAGACTGGTTGTCTT	55,9	1289	65
<i>groES</i>	groES_rtPCR_2_f	GCAATGGCCGTATCCTTGAA	55,6	131	
	groES_rtPCR_2_r	ACGCTTCAACAATTGCCAGA	55,7	273	162
<i>groEL</i>	groEL_rtPCR_2_f	TGCGCAGATGGTGAAAGAAG	55,9	210	
	groEL_rtPCR_2_r	TGATAGCCTGAGCCAGTACG	56	279	89
<i>glpA</i>	G3PDH_rtPCR_1_f	TCCTGACTGACGAAACTGCT	56	299	
	G3PDH_rtPCR_1_r	AGGAAGCGTTGAAACGATG	55,9	429	150



**Tabla 3:** genes cuya expresión se cuantificó mediante qPCR. Se incluye en la Tabla la función de las proteínas codificadas por cada gen.

Gen	Proteína	Función de la proteína
<i>hslU</i>	HslU	Forma parte del proteasoma bacteriano junto a hslV
<i>metH</i>	MetH	Biosíntesis de la metionina
<i>yqjD</i>	YqjD	Proteína de membrana de unión al ribosoma causando inhibición del crecimiento bacteriano
<i>dnaJ</i>	DnaJ	Plegamiento y transporte de proteínas junto a DnaK
<i>ffh</i>	Srp54	Direccionamiento e inserción de proteínas a la membrana citoplasmática
<i>clpA</i>	ClpA	Actúa junto a clpP en la degradación de proteínas no plegadas
<i>ftsZ</i>	FtsZ	Formación del anillo de división celular
<i>dnaK</i>	DnaK	Plegamiento y transporte celular junto a DnaJ
<i>groES</i>	GroES	Inserción o translocación de proteínas de membrana junto a GroEL
<i>groEL</i>	GroEL	Inserción o translocación de proteínas de membrana junto a GroEL
<i>secY</i>	SecY	Proteína de membrana que forma parte del translocón bacteriano
<i>glpA</i>	GlpA	Gen control en el experimento. Conversión del glicerol 3-fosfato en dihidroxiacetona

## M2. Métodos bioquímicos

### M2.1 Purificación de proteínas

Tanto las proteínas HslU y MetH como las quimeras TM y  $\Delta$ TM utilizadas para los experimentos descritos en esta tesis, se purificaron mediante cromatografía.

Para la purificación se utilizó un sistema de cromatografía *ÄKTA Start chromatography system* (GE Healthcare). Las proteínas sobre-expresadas tal y como hemos descrito previamente, se cargaron en columnas de níquel *HiTrap Chelating HP Columns* de 5 ml de volumen (GE Healthcare). Las columnas se lavaron con 10 volúmenes de columna de

PBS suplementado con 10 mM de imidazol y se eluyeron en 5 volúmenes de columna en un gradiente lineal que iba de 0 a 100% de 500 mM de imidazol. Las proteínas eluidas se desalaron en 2 volúmenes de columna utilizando PBS mediante el uso de *Hi Trap Desalting Columns* (GE Healthcare) para eliminar el exceso de imidazol. La pureza de las proteínas se realizó mediante geles de electroforesis.

Alternativamente, cuando la cantidad de cultivo purificado fue menor de 50 ml, la purificación se realizó añadiendo resina de níquel NTA (GE Healthcare) a los extractos proteicos después de la expresión de las proteínas. Posteriormente, las proteínas se purificaron mediante el uso de columnas de cromatografía desechables Bio-Spin (BioRad). En este caso, las columnas se lavaron con 10 volúmenes de columna de PBS suplementado con 10 mM de imidazol y se eluyeron en PBS con imidazol 500 mM. El desalado se realizó en columnas desechables desalado *PD MiniTrap G25* (GE Healthcare). La pureza de las proteínas se realizó mediante geles de electroforesis.

## **M2.2 Electroforesis SDS-PAGE**

Los geles de electroforesis se realizaron mediante la polimerización de acrilamida. En el **ANEXO 1** se muestra la composición de las soluciones utilizadas para fabricar los geles, que constan de un gel concentrador del 4% (p/v) y un gel separador del 12% (p/v) de poliacrilamida, que varían en el pH.

Para cargar las muestras de proteínas en los geles, antes de la separación electroforética, se mezclaron con tampón de carga (**ANEXO 1**) y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Los geles se corrieron en un sistema de electroforesis vertical de BioRad en tampón de electroforesis de proteínas (**ANEXO 1**) a 120 V durante 1h.

La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con azul Coomassie (**ANEXO 1**) durante 1 h a temperatura ambiente y la destinción del gel para la observación de las bandas que corresponden a las diferentes proteínas, se llevó a cabo con tampón de destinción (**ANEXO 1**).

### M2.3 Estabilidad de las proteínas quiméricas TM y ΔTM

Se estudió la estabilidad de las quimeras TM y ΔTM mediante espectroscopía de fluorescencia, analizando el efecto desnaturizante de la urea en la fluorescencia intrínseca del triptófano.

Las quimeras se sobreexpresaron y purificaron tal y como se ha descrito en el apartado anterior M1.2. Para separar la proteína que permanece soluble frente a la que se ha insertado en la membrana bacteriana, las muestras se ultracentrifugaron a 50.000 rpm durante 30 min a 4 °C en un rotor TLA-55 (Beckman Coulter). Las fracciones solubles se purificaron mediante columnas de cromatografía desechables (M2.1). Después de la elución, el imidazol se eliminó usando columnas de desalado equilibradas en PBS. Se incubaron 50 μg de proteína purificada en un rango de 0-6 M de urea durante 2 h a 25 °C, con incrementos de 0,5 M de urea. La intensidad de fluorescencia de las muestras se midió con un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 50 B. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y el espectro de emisión recogido entre 300-450 nm. La apertura de los anchos de banda de emisión y excitación (*slits*) fueron de 5 nm en ambos casos. Con los datos obtenidos se calculó la energía libre de Gibbs (ΔG) para ambas quimeras usando las ecuaciones descritas por Santoro and Bolen (1988) que se describen a continuación:

$$\Delta\epsilon_N = \Delta\epsilon^{\circ}_N + m_N[D]$$

$$\Delta\epsilon_U = \Delta\epsilon^{\circ}_U + m_U[D]$$

Donde  $\Delta\epsilon_N$  y  $\Delta\epsilon_U$  corresponden al coeficiente de extinción de las formas nativa y desnaturizada respectivamente evaluados a concentraciones específicas de desnaturizante.  $\Delta\epsilon^{\circ}_N$  y  $\Delta\epsilon^{\circ}_U$  son los coeficientes de extinción en los que interceptan las formas nativa y desnaturizada de las proteínas respectivamente. Y, por último,  $m_N$  y  $m_U$  son las pendientes de las rectas de las formas nativa y desnaturizada, respectivamente.

$$K_{\text{obsd}} = (\Delta\epsilon_N - \Delta\epsilon) / (\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_U)$$

Siendo  $K_{\text{obsd}}$  la ratio del equilibrio entre los estados nativo y desnaturizado a una concentración de desnaturizante específico, mientras que  $\Delta\epsilon$  representa la constante de equilibrio para la forma desplegada a una concentración de urea determinada.

$$\Delta G_{\text{obsd}} = \Delta G^{\circ}_{N-U} + mG[D]$$

$$\Delta G_{\text{obsd}} = -R \cdot T \cdot \ln K_{\text{obsd}}$$

Donde  $\Delta G_{\text{obsd}}$  es la energía libre calculada según las constantes de equilibrio de la región de transición dada por la ecuación previa.  $\Delta G^{\circ}_{\text{N-U}}$  es la energía libre necesaria para pasar del estado nativo al desnaturalizado en ausencia de desnaturalizante;  $mG$  la pendiente de la recta,  $R$  la constante de los gases (0,0083 kJ/mol\*K) y  $T$  la temperatura (298 K).

## M2.4 Fraccionamiento subcelular

El objetivo del primer experimento de fraccionamiento fue analizar la habilidad de las quimeras TM y  $\Delta$ TM para insertarse en las membranas bacterianas. Para obtener esta información, se realizó un protocolo que permitió separar las proteínas solubles de las insertadas en la membrana y se determinó el contenido proteico de cada una de las fracciones con el objetivo de determinar el grado de inserción de cada tipo de proteína.

Las quimeras TM y  $\Delta$ TM se expresaron en *E. coli* BL21 siguiendo el protocolo descrito en el apartado **M1.2**. Seguidamente, las fracciones soluble y membrana se separaron mediante ultra-centrifugación de los sobrenadantes a 50.000 rpm durante 1 h a 4 °C en un rotor TLA-55. La fracción membrana fue lavada con PBS, ultracentrifugada nuevamente a 50.000 rpm durante 1 h a 4 °C y resuspendida en tampón A (**ANEXO 1**). Se realizaron un total de 3 réplicas.

Las fracciones se cargaron en geles de acrilamida para ser analizadas en el Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (**M3.4**) para su cuantificación mediante *shotgun* (**M3.2**). La abundancia de las proteínas identificadas se calculó mediante la técnica del Top3 (**M3.5.1**) (Silva et al., 2006) en el programa Excel. Los datos de abundancia para cada proteína se transformaron a escala logarítmica y se normalizó por la mediana de cada experimento. La significatividad estadística se comprobó mediante un test-t para cada proteína, calculándose los p-valores y la tasa de cambio (*fold change*).

Mediante el programa Blas2GO, que es una plataforma bioinformática que almacena anotaciones de conjuntos de datos genéticos y sus productos, se recopilaron los términos GO para determinar si las proteínas identificadas eran solubles o de membrana. La Ontología Genética o *Gene Ontology* (GO) (<http://geneontology.org/>) es una ontología

dirigida a estandarizar la anotación de los genes o sus productos. Esto se realiza mediante los términos GO, que estructuran la información en antologías: la función molecular de los productos génicos, el proceso biológico en el que participan y el componente celular en el que se encuentran.

Además, la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) se utilizó para comprobar la presencia de segmentos transmembrana en las proteínas estudiadas y separar como pertenecientes a la fracción citosólica o de membrana las proteínas no anotadas con los términos GO. Uniprot es una base de datos que incluye las secuencias de las proteínas y los datos de anotación para cada una de ellas.

### **M2.5 Ensayos de purificación del interactoma**

Con el objetivo de caracterizar el interactoma asociado a las quimeras TM y  $\Delta$ TM, se diseñó un protocolo basado en el entrecruzamiento químico. Mediante este protocolo se purificó el interactoma para después cuantificarlo mediante espectrometría de masas funcionando en modo SWATH. El análisis diferencial de los datos permitió identificar las proteínas que se asocian al fragmento transmembrana. Se realizaron tres réplicas de los experimentos.

Las quimeras TM y  $\Delta$ TM fueron sobre-expresadas en *E. coli* BL21 y las células recogidas, lavadas, sonicadas y centrifugadas para separar los restos celulares del sobrenadante, tal y como se ha explicado en el apartado **M1.2**.

El **procedimiento de entrecruzamiento** se llevó a cabo incubando el extracto proteico resultante con el entrecruzador químico DTSSP (3,3'-dithiobis sulfosuccinimidyl propionate; Thermo Fisher) 2 mM durante 30 min a 25 °C con el objetivo de unir de forma reversible las quimeras a su interactoma. La reacción se detuvo incubando las muestras con glicina 20 mM durante 15 min a 25 °C. Posteriormente, se añadió tampón A (**ANEXO 1**) a las muestras en una proporción de 1:1.5 (v:v; tampón:proteína).

La **purificación del interactoma** asociado a las quimeras se realizó en dos partes. Primero se mezcló el extracto proteico con resina de níquel Ni-NTA (Thermo Fisher), que permite la unión de las quimeras mediante la cola de histidinas. Las proteínas se añadieron a columnas de cromatografía desechables para su purificación (**M2.1**).

La **disociación del interactoma** se realizó mediante la adición de DTT 20 mM durante 30 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo, la reacción se bloqueó con iodoacetamida 55 mM durante 15 min a 37 °C. El imidazol, el DTT y la iodoacetamida se eliminaron mediante el uso de columnas de desalado PD MiniTrap G-25.

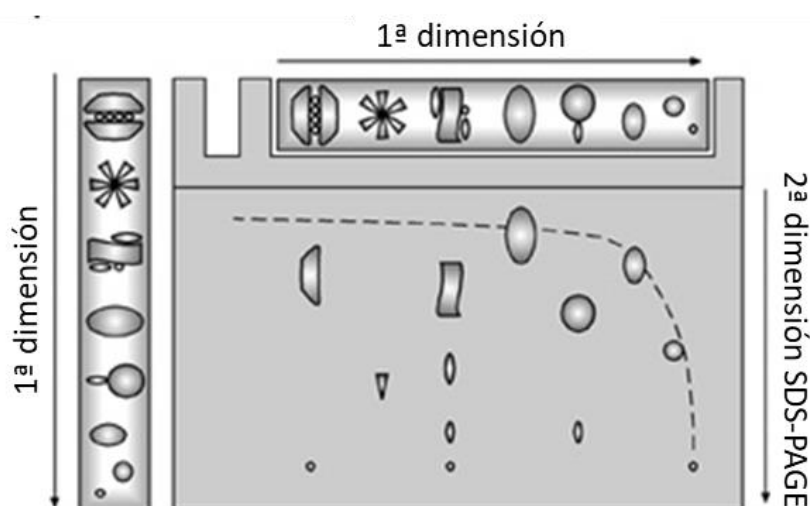
En la segunda etapa de **purificación del interactoma** se utilizó nuevamente resina de níquel para retener las quimeras en las columnas de cromatografía, mientras que las proteínas que previamente estaban formando parte del interactoma con las quimeras no se retuvieron en las columnas y fueron recolectadas en la fracción no-retenida. Las preparaciones se dividieron en dos, por un lado, la mitad de las muestras fueron utilizadas para comprobar la presencia de proteínas en las preparaciones, se liofilizaron y se cargaron en geles de electroforesis. Por último, los geles se tiñeron con tinción de plata tal y como describen las especificaciones del fabricante. Por otro lado, la otra mitad de las muestras, se enviaron al Servicio de Proteómica de la Universitat de València para cuantificar las proteínas presentes en las muestras mediante LC-MS/MS en modo SWATH (**M3.3**). Los datos de abundancia se trataron con el programa Excel. Los valores se transformaron a escala logarítmica y se normalizó por la mediana de cada experimento. La significatividad estadística se comprobó mediante un test-t para cada proteína, calculándose los p-valores, FDR y la tasa de cambio (*fold change*). Se consideró significativo un  $FDR \leq 0,01$ .

Por último, mediante la herramienta PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). Este programa combina la función génica, ontologías, rutas biológicas y herramientas de análisis estadístico para analizar datos a gran escala del genoma, a partir de experimentos de secuenciación, proteómica y expresión génica. Los genes se clasifican en familias y subfamilias y se anotan con términos de ontología (GO). Con la prueba de enriquecimiento, se determina si los valores numéricos de los genes o proteínas asociados con una vía de ontología se han extraído aleatoriamente de la distribución general de valores.

## **M2.6 Electroforesis de dos dimensiones**

Como método alternativo para analizar el interactoma se utilizaron geles de dos dimensiones (2D) no reductores/reductores.

Los geles 2D pueden proporcionar información sobre complejos multiproteicos, tales como la determinación del estado oligomérico de una serie de proteínas, su la abundancia relativa y el tamaño o número de los complejos. Tradicionalmente, en este tipo de experimentos, las proteínas y los complejos proteicos se separan en condiciones nativas en una primera dimensión. Seguidamente, se realiza un paso de desnaturalización en gel de las proteínas y complejos. Por último, se lleva a cabo una segunda dimensión mediante la técnica SDS-PAGE tradicional (**Figura 11**). Así pues, en la primera dimensión de nuestros experimentos, realizamos una separación de los complejos entrecruzados en función de su masa molecular en condiciones no reductoras y en la segunda dimensión, realizada en condiciones reductoras y tras someter la muestra a un tratamiento con DTT, los componentes de los complejos se resuelven nuevamente, esta vez en función de su masa molecular (Nijtmans, 2002; Schagger et al., 1994; Swamy et al., 2006).



**Figura 11: Representación de una electroforesis 2D.** Las proteínas y los complejos se separan en una primera dimensión en condiciones no reductoras y después de un paso de reducción de las proteínas y complejos, se procede a hacer una segunda dimensión en condiciones reductoras. Las proteínas monoméricas migran siguiendo una diagonal hiperbólica, mientras que las proteínas presentes debajo de la diagonal indican la naturaleza oligomérica de las proteínas. Imagen extraída de <https://www.jove.com/video/2164/blue-native-polyacrylamide-gel-electrophoresis-bn-page-for-analysis>.

Para obtener el interactoma asociado a las quimeras, se crecieron los cultivos en *E. coli* BL21 que expresaban quimeras del modo descrito en el apartado **M1.2**. Los

sobrenadantes fueron entrecruzados con DTSSP 2 mM durante 30 min a 25 °C, deteniéndose la reacción con glicina 20 mM durante 15 min a 25 °C. Las muestras se purificaron mediante el uso de columnas de cromatografía desechables utilizando resina de níquel (M2.1).

Las muestras se corrieron en una primera dimensión en geles del 6% de acrilamida en condiciones no reductoras. Se utilizó una baja concentración de acrilamida en los ensayos con el objetivo de permitir correcta penetración de los complejos asociados en el gel. Las carreras de la primera dimensión se recortaron con una cuchilla y las tiras cortadas se incubaron en placas de tipo Petri con TBS mezclado con 60 mM de DTT durante 1 h a 25 °C para romper el entrecruzador y posteriormente en iodoacetamida a 100 mM durante 15 min a 25 °C. Para hacer los geles de acrilamida, se utilizaron separadores más finos (0,75 mm) en la primera dimensión que en la segunda dimensión (1,5 mm), lo que nos permitió insertar cada tira recortada e incubada en DTT del primer gel dentro del segundo, en posición horizontal, tal y como se muestra en la **Figura 11**. Una vez situadas cada carrera de la primera dimensión sobre los geles de la segunda dimensión, se añadió solución de *stacking* hasta cubrir las carreras, de manera similar a un gel de acrilamida tradicional, y se dejó polimerizar. La segunda dimensión es, por lo tanto, un SDS-PAGE al 12%. Los geles se tiñeron con tinción de plata tal y como describen las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific). Las proteínas que se encontraban por debajo de la diagonal se recortaron y enviaron al Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València para su identificación mediante *shotgun* (M3.2).

### M2.7 Análisis de proteína total

El objetivo de este experimento fue descartar la posibilidad de que la interacción diferencial observada en los experimentos de entrecruzamiento fuese un artefacto. Para ello asumimos que, si las proteínas identificadas fueran contaminantes, la sobre-expresión de las proteínas quiméricas producirían cambios en la abundancia de dichos contaminantes que se reflejarían a nivel del proteoma.

Para llevar a cabo este objetivo, las proteínas quiméricas TM y  $\Delta$ TM se sobre-expresaron en *E. coli* (M1.2). Sin realizar ningún tipo de purificación o entrecruzamiento, las proteínas se analizaron en el Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València para la identificación de las proteínas presentes en las muestras mediante



*shotgun* (M3.2). La cuantificación de la proteína se realizó mediante el procedimiento del Top3 (M3.5). Los datos de abundancia se trataron con el programa Excel. Los valores se transformaron a escala logarítmica y se normalizó por la mediana de cada experimento. La significatividad estadística se comprobó mediante un test-t para cada proteína, considerándose significativo un  $FDR \leq 0,01$ , tal y como hicimos en los experimentos de purificación del interactoma (M2.5).

## M2.8 Medidas de la actividad ATPasa de HslU

El análisis de la actividad ATPasa de la HslU se determinó con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la proteína producida a partir de la librería ASKA (M1.2.2), tal y como se ha descrito en la literatura. Para llevar a cabo este experimento, se midió la concentración de fosfato inorgánico libre a lo largo del tiempo (Lanzetta et al., 1979). Además, se determinó si la adición de las quimeras TM y  $\Delta$ TM era capaz de variar la actividad ATPasa de la proteína.

El reactivo de trabajo para medir la concentración de fosfato se preparó mezclando una solución de verde de malaquita al 0,045% (p/v) y otra de molibdato amónico al 4,2% (p/v) en 4N de HCl en una proporción 3:1. Tras incubar la solución resultante durante 20 min a temperatura ambiente, se pasó por un filtro de 0,45  $\mu$ m para eliminar las partículas que pudieran haberse formado. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de Tritón X-100 al 1% (v/v) por cada 5 ml de la mezcla filtrada. Esta solución de trabajo no se puede almacenar y debe ser preparada en el momento de su utilización. Las medidas de la concentración de fosfato se realizaron añadiendo 800  $\mu$ l de la solución de trabajo descrita a 100  $\mu$ l de muestra y, tras 1 min a temperatura ambiente, se estabilizó el color desarrollado mediante la adición de 100  $\mu$ l citrato sódico 34% (p/v). Por último, se midió la absorbancia a 660 nm de longitud de onda. Para transformar la absorbancia en unidades de concentración de fosfato se realiza una curva patrón con fosfato potásico en un rango de 1 a 10 nmoles.

Para realizar el ensayo de actividad se incubaron con una concentración final de 18  $\mu$ g de proteína HslU con 18  $\mu$ g de las quimeras TM o  $\Delta$ TM y 1 mM de ATP, 1 mM de DTT y 10 mM de  $MgCl_2$  en TBS en un volumen final de 100  $\mu$ l. La reacción se incubó a 37 °C durante 0, 5, 10, 20 y 60 min. El fosfato liberado se cuantificó como se ha descrito.

### **M2.9 Cromatografía de exclusión molecular**

La formación de complejos cuando se incubaban las quimeras TM o  $\Delta$ TM en presencia de las proteínas HslU y MetH fue estudiada mediante cromatografía de filtración en gel con el objetivo de detectar cambios en el peso aparente de los complejos comparados con las proteínas individuales (Bai, 2015).

Se pre-incubaron durante 5 min una cantidad de 700  $\mu$ g de HslU en PBS con ATP 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Transcurrido el tiempo, se añadió la quimera TM en una ratio molar de 1:1 y se incubó la mezcla durante 2 h a 25 °C. A su vez, la proteína MetH se incubó en presencia de la quimera TM en PBS. Las condiciones del experimento con MetH fueron las mismas que en el caso de la HslU, pero sin necesidad de pre-incubar la muestra. El volumen final de las mezclas fue 150  $\mu$ l. Para los controles se utilizaron las proteínas HslU, MetH y TM incubadas individualmente y, en caso de la HslU, en presencia o ausencia de ATP.

Las muestras (50  $\mu$ l) se cargaron en una columna Superosa 6 10/300 calibrada. La columna se equilibró en PBS en un sistema de cromatografía BioLogic DuoFlow (BioRad). La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 0,3 ml/min.

### **M2.10 Interacción proteína-proteína por dispersión de luz**

Realizamos un análisis de interacción proteína-proteína por dispersión de luz, también llamados experimentos de dispersión de Rayleigh, para detectar las interacciones proteína-proteína mediante la identificación de cambios en la geometría de las proteínas a lo largo del tiempo (Brahma et al., 2009). Los análisis se realizaron incubando las proteínas HslU o MetH en presencia y ausencia de las quimeras TM o  $\Delta$ TM y analizando los cambios de intensidad de la luz dispersada.

Los experimentos se realizaron en un volumen final de 500  $\mu$ l en tampón PBS, que en el caso del experimento con HslU se suplementó con concentraciones finales de 1 mM de ATP y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Después, se añadió una concentración final de 2  $\mu$ M de la proteína HslU o MetH. La mezcla en presencia de HslU se pre-incubó en el tampón

durante 5 min. Por último, se agregaron concentraciones finales de 2  $\mu\text{M}$  de TM o  $\Delta\text{TM}$ . La intensidad de la luz dispersada de las mezclas fue medida de forma inmediata con un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 50 B. La longitud de onda de emisión y excitación fue de 550 nm con anchuras de banda (*slits*) de 5 nm tanto para la excitación como para la emisión. La luz dispersada fue medida durante 600s.

### **M2.11 Análisis de entrecruzamiento con proteína purificada**

El objetivo de este experimento fue analizar los fragmentos péptidos digeridos de las proteínas HslU y TM entrecruzadas.

El primer paso fue la optimización **de la digestión con tripsina** de las proteínas HslU y TM purificadas según lo descrito en **M2.1**. El objetivo fue identificar las condiciones de proteólisis para la observación de fragmentos peptídicos en presencia o ausencia de entrecruzador sin permitir la degradación total de las proteínas. La comparación entre las proteínas entrecruzadas y no entrecruzadas, nos permitió diferenciar fragmentos potencialmente entrecruzados para su análisis mediante LC-MS/MS.

Se incubaron 7  $\mu\text{g}$  de las proteínas HslU o TM con tripsina en una ratio 1:100 y 1:500 (tripsina:proteína) durante 0, 5, 10, 30, 60 y 120 min en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (**ANEXO 1**) suplementado con inhibidor de proteasas *Pierce Protease Inhibitor Tablets* (Thermo Fisher Scientific). El tiempo 0 s se realizó añadiendo el tampón de carga antes que la tripsina. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min antes de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. De esta manera se determinaron las condiciones que nos permitían observar en gel fragmentos intermedios de las proteínas. Estas condiciones fueron una ratio 1:100 durante 30 min para la HslU y la TM.

El segundo paso fueron los **ensayos de entrecruzamiento y digestión**. Una vez puestas a punto las condiciones de digestión con la tripsina, se realizaron ensayos de entrecruzamiento entre la HslU y la TM. Las mezclas entrecruzadas se tripsinizaron para generar fragmentos intermedios de la digestión según las condiciones puestas a punto en

el paso anterior. Finalmente, los fragmentos resultantes se cargaron en geles de poliacrilamida.

Para el entrecruzamiento, se tomaron 7  $\mu\text{g}$  de HslU y se mezclaron con 7  $\mu\text{g}$  de TM en tampón PBS que contenía ATP 1 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Se añadió entrecruzador DTSSP a 0,25 mM y se incubó 15 min a 25 °C. La reacción se detuvo añadiendo 20 mM de glicina e incubándolo a 25 °C durante 15 min. Las muestras que contenían la HslU-TM se incubaron con tripsina 1:100 durante 30 min. La reacción se detuvo con tampón de carga suplementado con inhibidor de proteasas con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol, ya que los reductores rompen el entrecruzamiento del DTSSP. Las muestras tratadas con tampón de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol no se calentaron antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Mientras, las muestras que contenían reductor, se calentaron a 95 °C durante 5 min y se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Estas últimas muestras, se utilizaron como control de los experimentos. Además, se utilizaron también como control, las muestras en ausencia de entrecruzador.

El último paso fue el **análisis del entrecruzamiento**. Las bandas del gel de poliacrilamida identificadas como fragmentos entrecruzados, se recortaron del gel. Los criterios para seleccionar estas bandas fueron (1) que estuvieran presentes en las muestras tratadas con DTSSP en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y (2) que no se encontraran en los controles.

Estas secciones recortadas de los geles se enviaron al Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València para un análisis LC-MS/MS, que se llevó a cabo de la forma descrita en el apartado **M3.2**. Para su análisis, las bandas del gel se dividieron en dos partes, una parte fue tratada con DTT antes del análisis e identificación de los péptidos (ruptura del entrecruzador) y la otra parte se mantuvo en ausencia de reductor. Los ficheros .mgf provenientes de los análisis, se cargaron en el programa MeroX/StavroX3 (<http://www.stavrox.com>). Stavrox es un programa para analizar conjuntos de datos espectrométricos de masas que se obtienen después del entrecruzamiento químico de las proteínas y su posterior digestión. Se incluyen los archivos que contienen las secuencias de las proteínas utilizadas en el ensayo de entrecruzamiento. Asimismo, se añade la tripsina como proteína utilizada en la digestión para la espectrometría y los residuos en los que corta, en este caso arginina y lisina excepto que sean seguidas por una prolina, además se añadieron 3 *missed cleavages*. Se estableció la longitud del péptido mínima en 5 y máxima en 30. El límite inferior de masa de los fragmentos identificados se fijó en

1000 Da y el superior en 6000 Da. La carga mínima de los espectros MS1 fue de 2, la precisión del precursor (MS1) fue de 5 ppm y la de los fragmentos de iones (MS2) de 10 ppm. Asimismo, se fijó el DTSSP como el entrecruzador utilizado en los ensayos. Así, a partir de las secuencias proteicas y la configuración añadida, el software calcula todos los péptidos teóricos posibles y compara las combinaciones de éstos con las masas precursoras del archivo proveniente de la cromatografía de masas. A los resultados se añade una puntuación comparando la fragmentación teórica del producto entrecruzado con el espectro MS/MS.

### **M2.12 Construcción de la biblioteca de espectros de masas**

Las librerías espectrales se realizan a partir de espectros peptídicos MS/MS provenientes del análisis de muestras biológicas complejas e identificados mediante búsqueda en bases de datos. Estas librerías permiten la cuantificación de proteínas con mayor velocidad y sensibilidad. (Lam et al., 2008). En nuestros experimentos la cuantificación de las proteínas se realizó monitoreando el tiempo de retención y la m/z de una serie de fragmentos definidos en la librería a lo largo del cromatograma de los datos adquiridos en modo SWATH (Blattmann et al., 2019; Fabre et al., 2017; Schubert et al., 2015).

La biblioteca de espectros de masas se construyó a partir de las proteínas que interaccionan con las quimeras TM y  $\Delta$ TM en *E. coli* BL21(DE) pLysS. Las proteínas fueron expresadas y extraídas tal y como se ha descrito en el apartado **M1.2**.

Las proteínas se entrecruzaron según lo previamente descrito (**M2.5**) para la purificación conjunta de las quimeras con el interactoma. El siguiente paso fue la disociación del interactoma ya purificado (**M2.5**).

Estas proteínas, junto a las quimeras, se cargaron en un gel de acrilamida para realizar una electroforesis y se tiñeron con azul de Coomassie. Las carreras se dividieron en cuatro partes y se analizaron en el Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València para la identificación de las proteínas presentes en las muestras mediante *shotgun* (**M3.2**). Los espectros asignados con mayor confianza para cada proteína identificada fueron utilizados para la creación de la librería de espectros (**Figura 12**).

### **M3. Proteómica**

La preparación de las muestras y la espectrometría de masas se realizó en el Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València.

#### **M3.1 Cromatografía líquida de péptidos (nanoHPLC)**

Se realizó un paso de preparación de las muestras previo a la espectrometría con el objetivo de limpiar las muestras de sales y otros compuestos que interfirieran en el análisis. Para ello, una alícuota de 5  $\mu$ l de cada una de las muestras fue cargada en una columna NanoLC Column, 3  $\mu$ m C18-CL, 350  $\mu$ m x 0,5 mm (Eksigent) y desalada con 0,1% de TFA a 3  $\mu$ l/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron posteriormente en una columna analítica LC Column, 3  $\mu$ m C18-CL, 75  $\mu$ m x 12 cm (Nikkyo) equilibrada en 5% de ACN y 0,1% de AF. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 hasta 35% de ACN con 0,1% de AF durante 60 min a 300 nl/min.

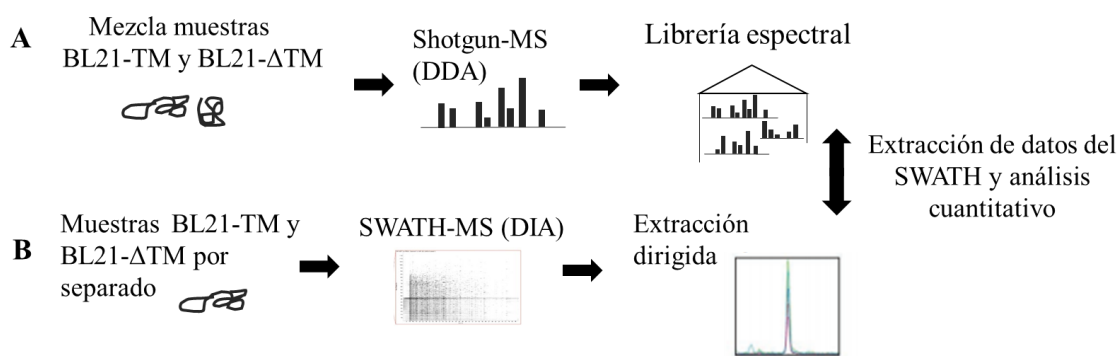
#### **M3.2 Espectrometría de masas DDA o *shotgun***

Los péptidos eluidos de la columna de cromatografía se introdujeron en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo - tiempo de vuelo equipado con una fuente de ionización con electrospray nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, SCIEX). Los péptidos fueron ionizados aplicando 2,8 kV al emisor de spray. En análisis fue llevado a cabo en un modo de adquisición dependiente de datos. El escaneo MS1 de los iones precursores se adquirió en un rango de 350 hasta 1250 m/z durante 250 ms. La resolución de selección del cuadrupolo se estableció en *Unit* para los MS2, que se fragmentaron en un rango de 100 a 1500 m/z durante 50 ms en modo *High sensitivity*. Para permitir el análisis de un amplio rango de proteínas, se usaron los siguientes criterios: carga de 2+ hasta 5+, intensidad mínima, 70 cuentas por segundo. Hasta 50 iones fueron seleccionados para fragmentación después de cada escaneo MS1. La exclusión dinámica utilizada fue de 15 s. La sensibilidad del sistema fue controlada con 2 fmol de un digerido de 6 proteínas estándar (LC Packings).

### M3.3 Espectrometría de masas DIA o SWATH

Los péptidos de las muestras para cuantificar se separan en el mismo sistema cromatográfico y en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Los espectros de masas SWATH se adquirieron usando el mismo espectrómetro de masas indicado anteriormente, pero operado en modo de adquisición independiente de datos (**Figura 12**).

El instrumento se ajustó para operar en modo SWATH, permitiendo una resolución del cuadrupolo de 25 m/z. Utilizando una ventana de aislamiento de 26 m/z (1 m/z más debido a la superposición de ventanas). El escaneo MS1 de los iones precursores cubrió un rango de masa de entre 350 y 1250 m/z. Los espectros MS2 se recogieron desde 350 hasta 1250 m/z en un total de 32 ventanas. Cada ciclo se realizó en 3,05 s. Todos iones con una carga superior a 2+ se fragmentaron en los análisis.



**Figura 12: Esquema del flujo de trabajo para el análisis SWATH.** (A) Análisis shotgun usado para crear la librería de espectros a partir de una mezcla compleja de proteínas proveniente de la expresión de células de *E. coli* BL21(DE) pLysS portadoras de las quimeras TM y ΔTM. La muestra se analizó por LC-MS/MS operando en modo de adquisición dependiente de datos (DDA). (B) El SWATH es un método de adquisición independiente de datos (DIA) en el cual los datos MS2 se adquieren tomando un rango de masa de 350 a 1250 m/z y escaneándolo en ventanas de 25 Da para construir el espectro. Los datos adquiridos en el SWATH se usaron para buscar en la librería espectral información cuantitativa de alta calidad.

### **M3.4 Identificación de proteínas**

El procesado automático de los espectros, la generación de la lista de picos y la identificación y cuantificación de las proteínas resultantes se hizo mediante el software ProteinPilot v5.0 (SCIEX) usando el algoritmo Paragon. Este algoritmo genera para cada espectro una serie de etiquetas de las secuencias identificada y evalúa la probabilidad de que dicha etiqueta sea correcta, mapeándolas en la base de datos, permitiendo una identificación más exacta. Para la identificación de proteínas se utilizó la base de datos UniProtKB versión 01-2016 con los siguientes parámetros: especificidad por la tripsina con un *missed cleavage* permitido, cys-alquilación (carbamidometilación), sin restricción por taxonomía y la búsqueda en modo *Through*, ya que permite una búsqueda más profunda y exhaustiva. Se consideró significativo un ProteinPilot *unused score* por encima de 1,3.

### **M3.5 Cuantificación de proteínas por espectrometría de masas: Top3 y SWATH.**

#### **M3.5.1 Técnica del top3**

El análisis de los datos cuantitativos se realizó mediante Excel. Se tomaron los listados de péptidos de cada uno de los experimentos y se cargaron en el programa.

Primero se eliminaron los péptidos que presentaban un *Unused Score* menor de 1,3, debido a que dicho valor refleja un FDR del 95% en la identificación de la proteína. Seguidamente, se calculó la abundancia de cada proteína mediante la técnica del Top3, que se realiza teniendo en cuenta la abundancia de los tres péptidos más intensos calculados para cada proteína del experimento. Aunque con mayor error, las proteínas con menos de tres péptidos también se pueden cuantificar mediante este método (Krey et al., 2014; Ning et al., 2012; Silva et al., 2006).

#### **M3.5.2 SWATH**

El análisis de los datos se llevó a cabo con el software MS/MS(ALL) with SWATH Acquisition MicroApp (SCIEX). Para la cuantificación, el algoritmo selecciona hasta 20 péptidos de la librería de espectros para cada proteína en base a su intensidad. Asimismo,



para cada péptido se seleccionan los 6 fragmentos con mayor intensidad, preferentemente con una  $m/z$  mayor que la del ion precursor. A continuación, se extrajo el área cromatográfica de cada fragmento. La cuantificación de las proteínas se realizó sumando las áreas cromatográficas de los fragmentos de todos péptidos seleccionados para cada proteína. Para aumentar la confianza de las cuantificaciones, el algoritmo utiliza tres criterios distintos: 1) los picos cromatográficos de los fragmentos de cada péptido deben solaparse con precisión ya que todos ellos derivan de la misma entidad química; 2) la relación entre las áreas de los fragmentos de cada péptido deben ser similar a la relación de intensidades de los fragmentos almacenados en la librería; 3) se monitorizan los perfiles cromatográficos de los fragmentos correspondientes a las secuencias reversas de cada péptido para determinar si se trata de asignaciones aleatorias (Ludwig et al., 2018).



# **RESULTADOS**



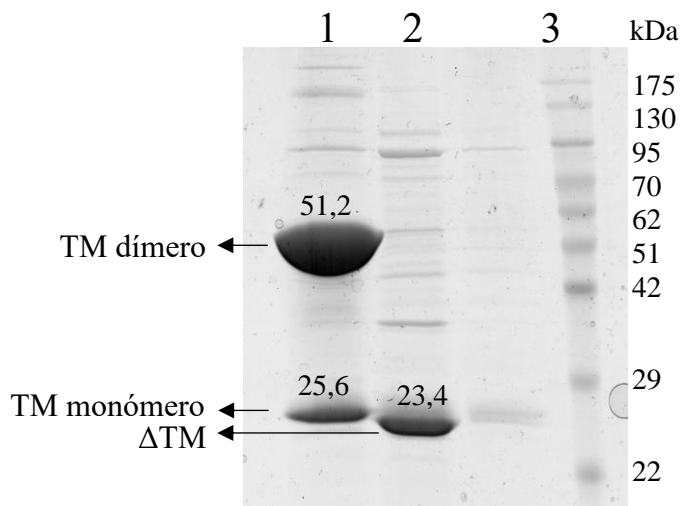
## R1. Análisis de las quimeras

### R1.1 Expresión de las proteínas quiméricas

Uno de los sistemas de elección para expresar proteínas de membrana es *E. coli*, debido a que es un organismo modelo bien caracterizado, económico y fácil de manipular. En nuestro caso escogimos el sistema de expresión *E. coli* BL21 pLysS en un vector pET11a, inducible con IPTG y que permite una gran eficiencia en la expresión (Mathieu et al., 2019; Miroux and Walker, 1996). En este vector clonamos las proteínas quiméricas TM y  $\Delta$ TM.

La quimera TM es una proteína de membrana capaz de dimerizar en geles de SDS por la interacción de los segmentos TM proveniente de la glicoforina (**Figura 13**). Así, se observan dos bandas electroforéticas, una con un peso molecular de 25,6 kDa, que corresponde a la proteína monomérica y otra de 51,2 kDa correspondiente al dímero. Por su parte, la quimera  $\Delta$ TM es una proteína soluble monomérica, con un peso molecular de 23,4 kDa. Esta diferencia en el tamaño y localización de las quimeras, se debe a la presencia o ausencia del segmento transmembrana.

Escogimos la glicoforina A (GpA) para crear las quimeras porque es uno de los ejemplos mejor caracterizados de interacción entre dos hélices alfa, siendo así un modelo de proteína de membrana para estudiar su plegamiento y dinámica estructural. La GpA contiene un segmento transmembrana que homodimeriza de forma no covalente como dos hélices alfa, que resultan estables en presencia del detergente SDS. Diversos estudios describen el segmento de dimerización en siete residuos, L<sup>75</sup>I<sup>76</sup>xxG<sup>79</sup>V<sup>80</sup>xxG<sup>83</sup>V<sup>84</sup>xxT<sup>87</sup> (Aoki, 2017; Mingarro et al., 1996; Orzáez et al., 2000). La GpA es observada en geles de poliacrilamida con una masa molecular aparente de entre 29-36 kDa. Su migración electroforética es relativamente baja comparada con otros componentes de la membrana celular porque está altamente glicosilada.

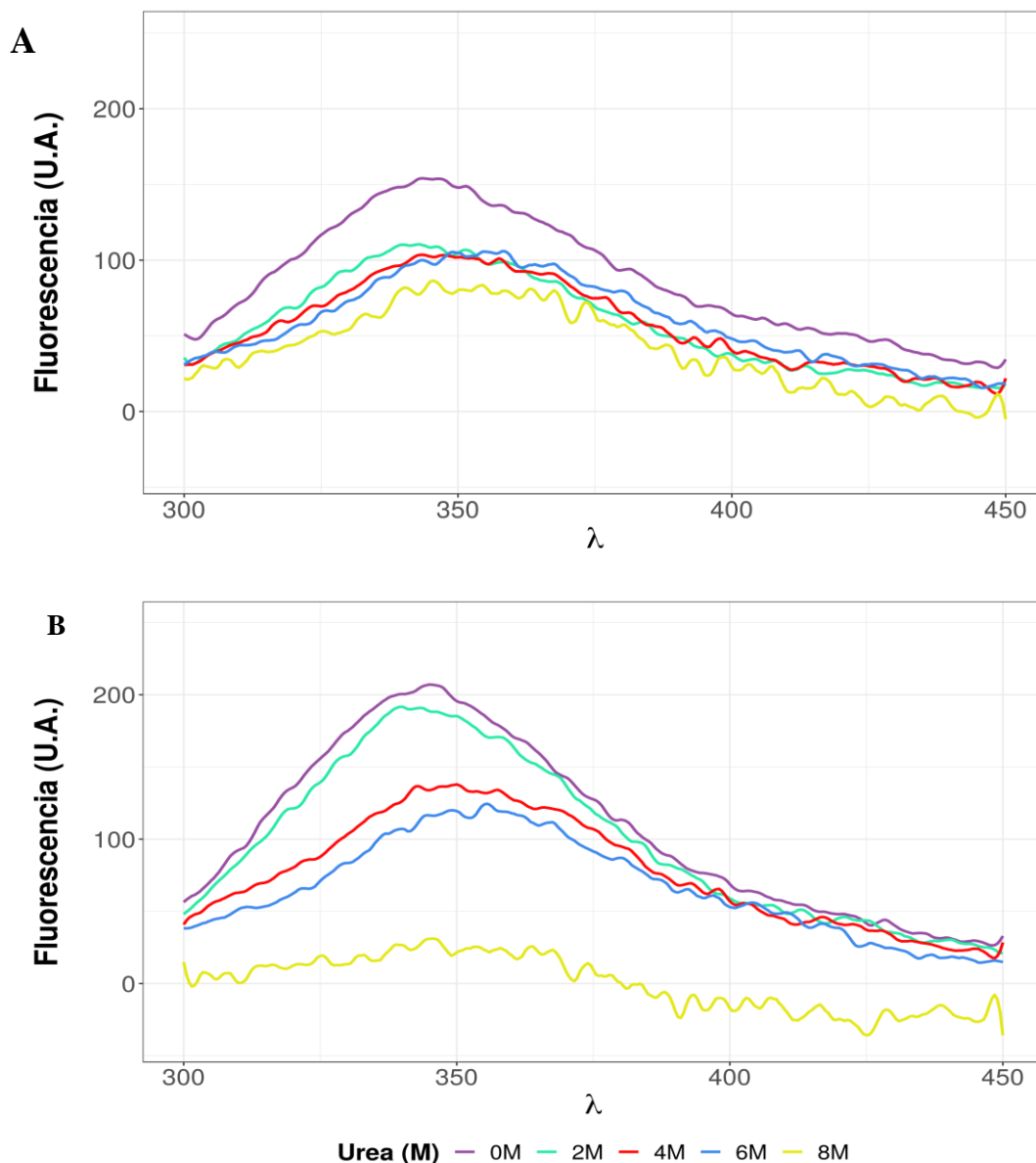


**Figura 13:** Gel de poliacrilamida en que se muestra la sobreexpresión de las quimeras *TM* y  $\Delta$ *TM*. Se muestran en el gel las bandas correspondientes a la quimera *TM* (carrera 1) y  $\Delta$ *TM* (carrera 2) después de ser purificadas mediante resina de níquel. Asimismo, se indica el peso molecular (kDa) del monómero y dímero de la quimera *TM* y del monómero de la  $\Delta$ *TM*. Marcador de proteínas PiNK Prestained (Genetics (carrera 3)).

### R1.2 Estabilidad de las proteínas quiméricas

Se estudió la estabilidad de las quimeras *TM* y  $\Delta$ *TM* mediante desnaturalización con un agente caotrópico como la urea, ya que ambas quimeras contienen un triptófano en su secuencia peptídica. Los triptófanos son sensibles al entorno en el que se encuentran, por lo que mediante espectroscopía de fluorescencia se monitorizaron los cambios estructurales producidos en las proteínas durante la desnaturalización.

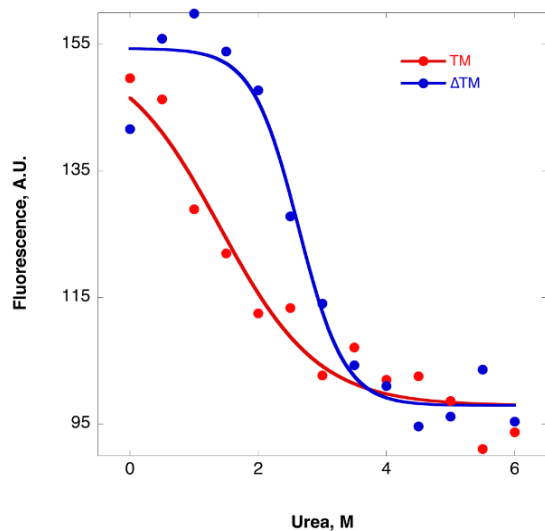
El análisis de los espectros de emisión a distintas concentraciones de urea mostró una disminución en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento hacia una mayor longitud de onda en conformaciones desplegadas de las proteínas. La longitud de onda máxima del espectro de emisión pasó de 345 nm a 350 nm al desnaturalizar la proteína (**Figura 14**). En ambos casos se pudo observar que el estado desplegado de las quimeras muestra una intensidad de fluorescencia menor que en su estado nativo. Estos datos indican un aumento de la polaridad del medio alrededor del triptófano al desplegarse la proteína (Vivian and Callis, 2001).



**Figura 14:** Espectros de emisión para la quimera TM (A) y  $\Delta$ TM (B). Se observa en las gráficas el cambio de la longitud de onda máxima a diferentes concentraciones de urea (0, 2, 4, 6 y 8 M).

Se calculó la estabilidad de las proteínas ( $\Delta G$ ) a partir de los datos de desnaturalización (Figura 15). La presencia del segmento TM desestabiliza la proteína algo más de 3 kcal/mol, con un  $\Delta G$  de 1,08 kcal/mol en la quimera TM frente a 4,30 kcal/mol en la quimera  $\Delta$ TM. La cooperatividad del plegamiento, indicado por la pendiente de las curvas de desnaturalización, suele asociarse a la diferencia de superficie expuesta entre los estados nativo y desplegado (Fersht, 1999). La menor pendiente observada con la quimera TM indica la exposición de una menor proporción de la superficie de la proteína, lo que

encaja con la presencia de una hélice transmembrana desestructurada y expuesta incluso en la forma nativa.



**Figura 15:** Fluorescencia emitida a 350 nm (Unidades Arbitrarias) por la quimera TM y  $\Delta$ TM a diferentes concentraciones de urea (0-6 M) usando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

### R1.3 Análisis de la inserción de las quimeras TM y $\Delta$ TM en la membrana

Se realizó un fraccionamiento subcelular de las proteínas bacterianas cuando se sobre-expresaban las quimeras TM y  $\Delta$ TM. El objetivo de este experimento fue evaluar la localización de las proteínas quiméricas en la membrana.

Para separar la fracción de proteínas soluble de la fracción de membrana, se realizó un protocolo de ultracentrifugación. Las proteínas presentes en cada fracción se identificaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. La identificación del contenido proteico de cada una de las fracciones nos permitió analizar el grado de inserción y el enriquecimiento de cada tipo de proteína. La abundancia de cada una de las proteínas identificadas se calculó mediante la técnica del Top3.

Se ha descrito en la bibliografía que las proteínas de membrana en *E. coli* corresponden a el 20-30% del proteosoma (Corbin et al., 2003; Kalwarczyk et al., 2012; Wallin and Heijne, 2008) ([https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC\\_000913](https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC_000913)), mientras que un 51-61% son proteínas solubles (Ishihama et al., 2008) ([https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC\\_000913](https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC_000913)). En nuestros experimentos utilizamos los términos GO para identificar las proteínas citosólicas y de membrana, determinándose que nuestros datos se encuentran en concordancia con lo observado en la



bibliografía, ya que las proteínas de membrana se encontraron infrarrepresentadas frente a las citosólicas.

Se observó que, como se esperaba, la fracción soluble estaba enriquecida en proteínas citosólicas mientras que la fracción de sedimento estaba enriquecida en proteínas de membrana. Sin embargo, el grado de pureza obtenido no fue el mismo. Así, la fracción soluble apenas contenía proteínas de membrana mientras que la fracción de membrana contenía una contaminación considerable de proteínas solubles. Este resultado es esperable ya que no hemos utilizado un protocolo exhaustivo de purificación sino un procedimiento rápido y simple de enriquecimiento de membranas. No obstante, la separación conseguida es suficiente para poder determinar la inserción en membrana de la proteína quimera TM.

## **R2. Identificación de las proteínas asociadas a las quimeras**

Para analizar el interactoma asociado al fragmento transmembrana, se realizó un experimento de entrecruzamiento en el cual las proteínas asociadas a las quimeras se fijaron mediante métodos químicos a las quimeras, se purificaron, identificaron y cuantificaron. Este experimento nos permitió identificar diferencias en las proteínas asociadas a las quimeras debidos a la presencia del segmento transmembrana. La purificación e identificación del interactoma se realizó mediante ensayos de entrecruzamiento. Posteriormente, la electroforesis en dos dimensiones nos permitió validar algunas de las proteínas identificadas.

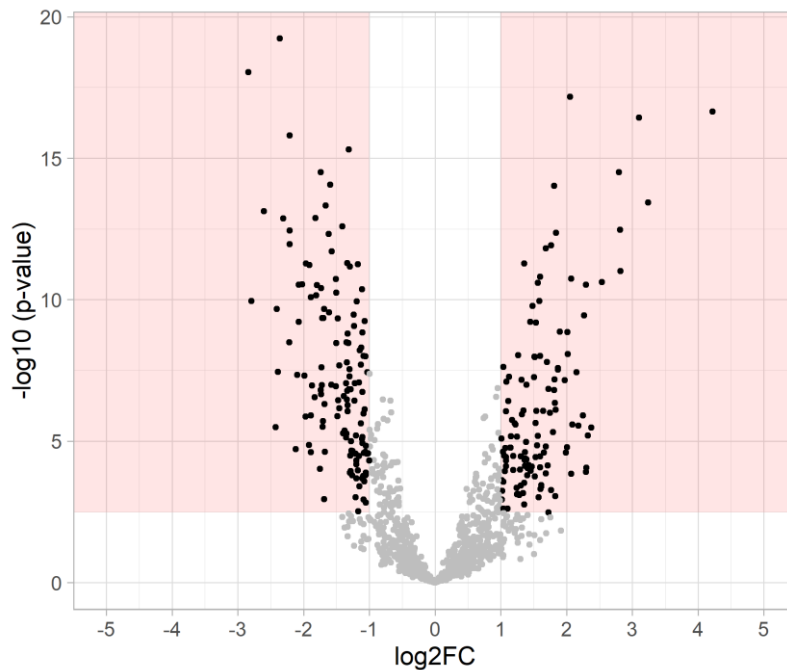
### **R2.1 Ensayos de purificación del interactoma**

Se diseñó un experimento en el que las quimeras se entrecruzaron con su interactoma para su purificación, identificación y cuantificación, lo que nos permitió definir las proteínas que podrían estar implicadas en la inserción y direccionamiento de la quimera TM, que contiene un segmento transmembrana, frente a la  $\Delta$ TM, una proteína soluble.

La identificación de las proteínas se realizó mediante LC-MS/MS, identificándose un total de 1108 proteínas correspondientes interactoma de ambas quimeras (**ANEXO 3**).

Además, el protocolo de entrecruzamiento y purificación nos permitió diferenciar una serie de proteínas que se encontraban diferencialmente sobre-representadas en una quimera frente a la otra (**ANEXO 3**). La abundancia de cada proteína se calculó utilizando la técnica SWATH. De las 1108 proteínas, un total de 263 resultaron estadísticamente significativas con un  $FDR \leq 0,01$  y un  $\log_2FC \geq 1$  (**Figura 16**).

A continuación, se utilizó el programa PANTHER para realizar un ensayo de enriquecimiento de las proteínas del interactoma que resultaron diferenciales. Este análisis examina si en un conjunto de proteínas hay términos GO que aparecen con significatividad estadística con respecto al proteoma. Por lo tanto, si no existe enriquecimiento, tendremos una representación del proteoma, puesto que, al disminuir el conjunto de proteínas presentes, la proporción de proteínas con una función dada se mantendrá constante. Esto se traduce en que las proteínas analizadas se encuentran presentes en nuestros experimentos como contaminantes. Si, por el contrario, existe enriquecimiento, implica que al disminuir la muestra del proteoma con sucesivas purificaciones, tenemos una proporción mayor de proteínas con funciones específicas. En nuestros ensayos encontramos enriquecimiento en varios grupos de proteínas entre los que destacó el de proteínas implicadas en el plegamiento.



**Figura 16:** Gráfico de volcán en el que se muestran el total de proteínas identificadas asociadas a las quimeras TM y  $\Delta$ TM. Se muestra en el eje de ordenadas el logaritmo en base 10 de los p-valores. Las áreas sombreadas especifican el criterio de filtrado ( $\log_2FC \geq 1$  y  $FDR \leq 0,01$ ). Los valores positivos corresponden a las proteínas sobre-representadas en la quimera TM y los negativos a las proteínas sobre-representadas en la quimera  $\Delta$ TM.

En el caso de la quimera TM, las proteínas identificadas estaban implicadas principalmente en plegamiento y degradación de proteínas (como HslU, DnaJ o ClpA), en la biosíntesis de compuestos (MetH, UbiE o SpeA) y en la división celular (FtsZ o MinE). Además, la proteína Srp54, está implicada en la inserción de proteínas de membrana tanto en la ruta co-traduccional como postraduccional (Saraogi and Shan, 2014a). En el caso de la quimera  $\Delta$ TM, las proteínas identificadas estaban relacionadas con rutas metabólicas (como DeoD, UDP o FabG) y de respuesta a antibióticos (Cat).

Algunas otras proteínas identificadas como parte del interactoma con diferencias significativas entre ambas quimeras fueron YidC, que actúa como una insertasa de proteínas de membrana, así como SecA, SecD y SecY (Aschtgen et al., 2012). Tanto SecA como SecB y el complejo SecYEG se han relacionado con la vía de inserción postraduccional (Huber et al., 2011). Algunas proteínas periplásmicas y de membrana, interactúan con la chaperona SecB, que juega un papel importante en la translocación

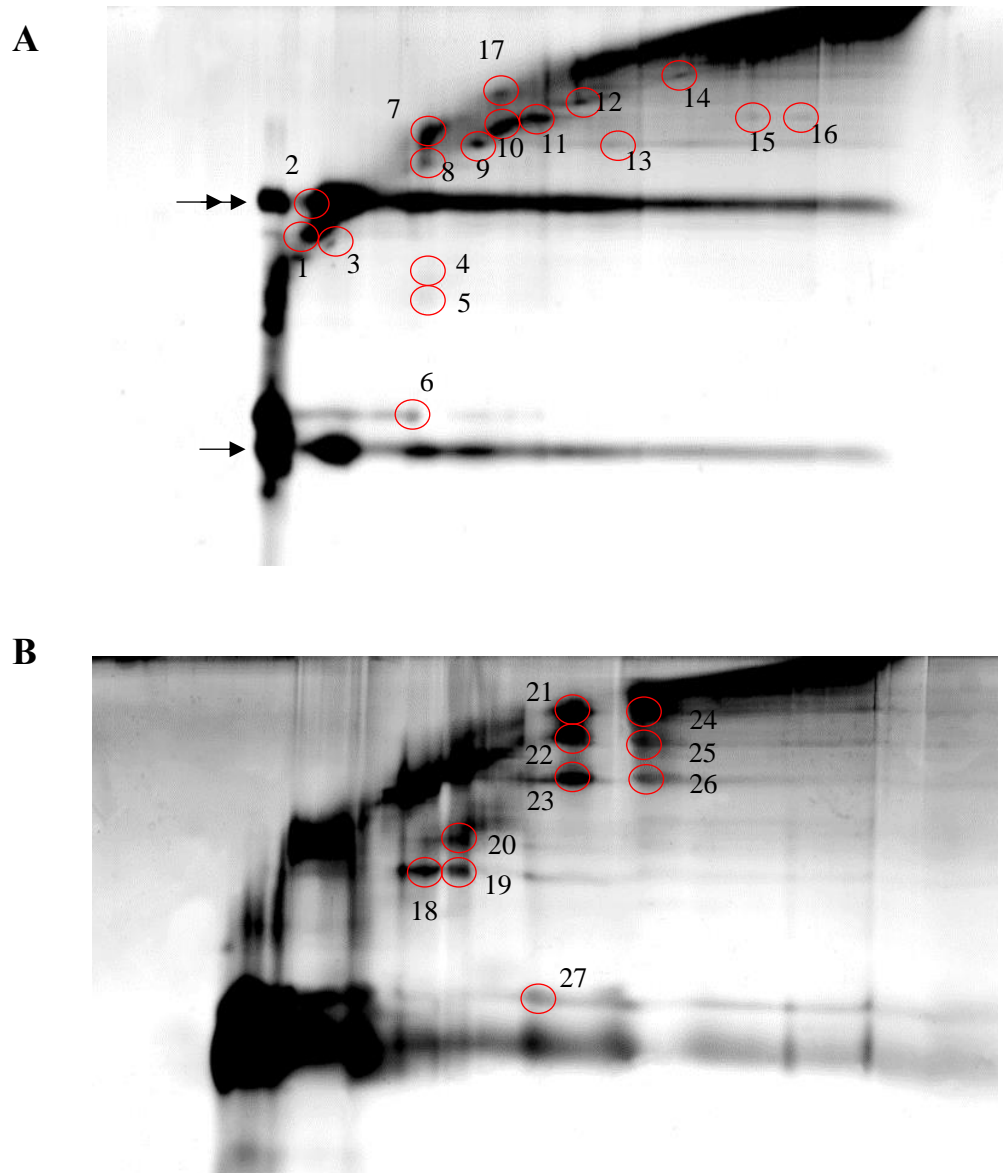
proteica manteniendo a las proteínas en un estado competente para la interacción con los componentes del translocón (SecY, SecE y SecA) y su posterior translocación (Kumamoto, 1989). Otras proteínas son independientes de la unión de SecB, como es el caso de las proteínas que se unen a GroEL/S (Sun et al., 2005) o a DnaK, que suele actuar junto a DnaJ (Wild et al., 1992).

## **R2.2 Electroforesis de dos dimensiones**

Se realizaron geles de dos dimensiones no reductores/reductores para la validación de la interacción de algunas proteínas con las quimeras TM y  $\Delta$ TM. El extracto proteico proveniente de la sobre-expresión de las quimeras se trató con entrecruzador y se purificó mediante resina de níquel. Entonces se llevó a cabo una primera dimensión en geles de poliacrilamida no reductores. Las carreras de los geles se cortaron y trataron con DTT para eliminar el entrecruzamiento. Con estas muestras se corrió una segunda dimensión con geles de acrilamida reductores.

Las proteínas no modificadas por acción del reductor migraron en diagonal, puesto que en ambas dimensiones se utilizó el mismo tipo de geles y lo único que varió es la acción del DTT y el porcentaje de acrilamida. Por el contrario, las proteínas que formaban complejos, al ser tratadas con reductor, se separaron y en la segunda dimensión corrieron por debajo de la diagonal.

En los geles se observaron las bandas correspondientes al monómero (flecha sencilla) y al dímero (flecha doble) de las quimeras. Además, debajo de la diagonal se diferenciaron una serie de puntos correspondientes a las proteínas que se encontraban entrecruzadas al realizar la primera dimensión, pero no en la segunda. En total se recortaron 27 bandas de interés para su identificación mediante huella peptídica utilizando espectrometría de masas (**Figura 17**).



**Figura 17: Geles de dos dimensiones.** Geles 2D de la quimera TM (A) y  $\Delta$ TM (B). Se indican con círculos rojos las secciones recortadas e identificadas y el número que se asignó a cada muestra. Así mismo, se indica con una flecha simple la forma monomérica y con una flecha doble la forma dimérica de las quimeras.

En cada sección pudieron identificarse varias proteínas (**Tablas 4 y 5**), algunas de las más significativas del análisis del interactoma también se identificaron en este tipo de experimento, aunque en algunas fracciones hubiese más de una proteína. Además, muchas de las proteínas identificadas se encontraban en varias de las secciones analizadas, probablemente porque inicialmente se encontraban formando complejos con otras. Esto también explicaría el hecho de que la abundancia de cada proteína varía en cada sección.

Entre las proteínas identificadas tanto en los ensayos de purificación del interactoma como en los geles 2D, encontramos por ejemplo la ClpA, HslU, MetH, DnaK y DnaJ en la muestra que contiene la quimera TM y Tig en la muestra  $\Delta$ TM.

**Tabla 4:** Proteínas identificadas en las diferentes secciones de los geles de dos dimensiones de la quimera TM.

Sección	Uniprot Entry	Proteína	Número de péptidos identificados	Peso molecular (kDa)	Longitud (aminoácidos)
1	P0CE48	EFTU2	18	43,31	394
2	P0A6H5	HSLU	6	49,59	443
3	P0A6H5	HSLU	14	49,59	443
4	P08622	DNAJ	1	41,1	376
5	P08622	DNAJ	1	41,1	376
6	P0A7L0	RL1	1	24,73	234
7	P0A7R9	RS11	3	13,85	129
8	P0A7L0	RL1	1	24,73	234
9	P0A6Y8	DNAK	27	69,12	638
10	P09373	PFLB	17	85,36	760
10	P0ABH9	CLPA	10	84,21	758
11	P21179	CATE	38	84,16	753
12	P0A9Q7	ADHE	6	96,13	891
13	P0A6Y8	DNAK	8	69,12	638
14	P13009	METH	12	136	1227
15	P21179	CATE	15	84,16	753
16	P0A7N9	RL33	1	6,37	55
17	P00722	BGAL	12	116,48	1024

**Tabla 5:** Proteínas identificadas en las diferentes secciones de los gels de dos dimensiones pertenecientes a la quimera  $\Delta TM$ .

Sección	Uniprot Entry	Nombre	Número de péptidos identificados	Peso molecular (kDa)	Longitud (aminoácidos)
18	P0CE48	EFTU2	16	43,31	394
19	P0CE48	EFTU2	13	43,31	394
20	P0A850	TIG	4	48,19	432
21	P0A6Y8	DNAK	55	69,12	638
22	P0A6Y8	DNAK	20	69,12	638
23	P0A6Y8	DNAK	55	69,12	638
24	P0A6Y8	DNAK	4	69,12	638
25	P00722	BGAL	14	116,48	1024
26	P0A6Y8	DNAK	23	69,12	638
27	P69776	LPP	4	8,32	78

Las proteínas identificadas que forman parte del interactoma de las quimeras se observan en el gel como rayas horizontales. Esto es debido a que las proteínas se encuentran en diferentes grados de entrecruzamiento, lo que genera formas proteicas con diferente movilidad electroforética, dado que la migración de los polipéptidos se debe a múltiples factores como la carga intrínseca de las proteínas, su tamaño, la forma de los polipéptidos y la unión variable del SDS a los mismos (Griffith, 1972).

A pesar de que se identifican algunas proteínas que podrían ser contaminantes, como DnaK o CatE, cuya abundancia no resulta diferencial cuando estudiamos el interactoma (**R2.1**), la mayoría de las proteínas identificadas son de las más significativas en los ensayos de entrecruzamiento y purificación del interactoma. Esto se respalda por el hecho de que en los ensayos de purificación del interactoma, las sucesivas purificaciones y lavados reducen drásticamente la presencia de ambas proteínas contaminantes.

### R3. Análisis de proteína total

Se realizó un experimento para descartar que la interacción diferencial de las proteínas analizadas en los experimentos de purificación del interactoma mediante entrecruzador (**R.2.1**) fuera un artefacto.

Para ello se sobre-expresaron las quimeras en *E. coli* y el proteoma se cuantificó sin purificaciones previas. Se asumió que, si las proteínas del interactoma fueran contaminantes, su abundancia variaría con la sobre-expresión de las quimeras a nivel del proteoma sin necesidad de utilizar entrecruzador para ver esta diferencia.

La identificación de las proteínas se realizó mediante LC-MS/MS. El resultado mostró algunas proteínas diferenciales asumiendo un  $FDR \leq 0,01$  (**Tabla 6**). Estas proteínas fueron las siguientes: PspA, HtpG, BlaT, GroEL, ClpB, AcnB, CysP, GlpK, CysK, DnaK, HslV, RS18.

**Tabla 6:** Proteínas diferenciales de *E. coli* debidas a la sobre-expresión de las quimeras. Se indica el nombre completo de cada proteína (Nombre proteína), el identificador de Uniprot, el nombre abreviado de las proteínas (Proteína), el gen que codifica para cada proteína. Se muestra además el FDR de los test-t realizados, así como el log fold change en base 2 ( $\log_2FC$ ). Las proteínas que muestran un  $\log_2FC$  positivo se encuentran sobre-representadas en el proteoma cuando se sobre-expresa la quimera TM, mientras que los valores negativos indican que las proteínas se encuentran sobre-representadas en el proteoma cuando se sobre-expresa la quimera  $\Delta TM$ .

Nombre proteína	Identificador		Gen	FDR	log <sub>2</sub> FC
	Uniprot	Proteína			
Phage shock protein A	P0AFM6	PSPA	<i>pspA</i>	1,689E-07	3,37
Chaperone protein HtpG	P0A6Z3	HTPG	<i>htpG</i>	3,203E-07	0,88
Beta-lactamase TEM	P62593	BLAT	<i>bla</i>	0,00015	1,29
60 kDa chaperonin	P0A6F5	CH60	<i>groL</i>	0,0002207	0,52
Chaperone protein ClpB	P63284	CLPB	<i>clpB</i>	0,0005961	0,98
Aconitate hydratase B	P36683	ACNB	<i>acnB</i>	0,000967	0,37
Thiosulfate-binding protein	P16700	CYSP	<i>cysP</i>	0,0009822	1,19
Glycerol kinase	P0A6F3	GLPK	<i>glpK</i>	0,0009971	0,39
Cysteine synthase A	P0ABK5	CYSK	<i>cysK</i>	0,0017626	0,38
Chaperone protein DnaK	P0A6Y8	DNAK	<i>dnaK</i>	0,0022517	0,52
ATP-dependent protease subunit HslV	P0A7B8	HSLV	<i>hslV</i>	0,0037779	1,04
30S ribosomal protein S18	P0A7T7	RS18	<i>rpsR</i>	0,0043855	-1,56



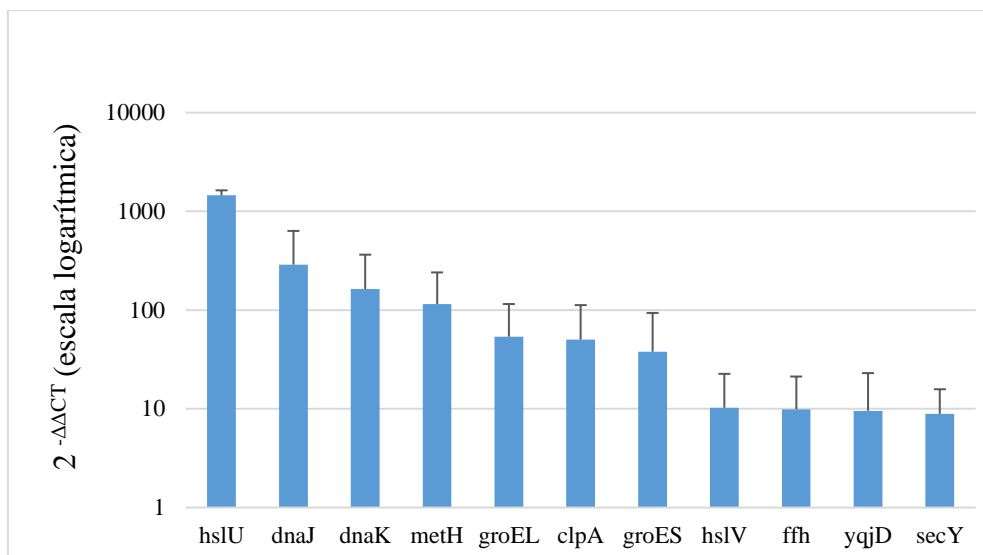
#### R4. PCR en tiempo real (qPCR)

Se realizó una qPCR para estudiar la sobre-expresión de algunos genes de interés. La qPCR se llevó a cabo usando cebadores específicos para la detección de los genes diana. Los valores Ct del gen diana y del calibrador se corrigieron con los obtenidos en el control endógeno para eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial del RNA o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción del cDNA.

Los resultados se analizaron mediante la  $\Delta\Delta C_t$  para obtener una cuantificación relativa de la expresión génica. Para ello se utilizan los valores Ct, que son equivalentes al número de ciclo de la PCR en el que la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de DNA inicial y característica de cada reacción. Así, los valores de Ct se normalizaron ( $\Delta C_t$ ) para cada gen de la quimera TM y  $\Delta TM$  utilizando para ello el gen de referencia. Posteriormente, el  $\Delta\Delta C_t$  se calculó para determinar la ratio de la expresión restando para cada gen el  $\Delta C_t$  de la quimera TM entre el de la  $\Delta TM$ . Los datos se representaron utilizando el  $\log(2^{-\Delta\Delta C_t})$ .

Los genes escogidos pueden agruparse en genes cuyas proteínas estaban sobre-representadas cuando estudiamos los complejos asociados a las quimeras TM y  $\Delta TM$ ; en este grupo se incluyen *hslU*, *metH*, *yqjD*, *dnaJ*, *dnaK*, *ffh* y *clpA*. Y genes cuyas proteínas aumentan su expresión en *E. coli* cuando se induce la expresión de proteínas de membrana tal y como demuestran en Wagner et al. (2007), tal y como *hslV*, *secY*, *groES* y *groEL*.

Los valores obtenidos representan el número de veces que se expresa cada uno de los genes en la quimera TM respecto a la  $\Delta TM$  (**Figura 18**). Todos los genes analizados en el ensayo se encontraban más expresados en la quimera TM que en la  $\Delta TM$ . El gen *hslU* fue el que registró una mayor expresión, seguido de *dnaJ*, *dnaK*, *metH*, *groEL*, *clpA*, *groES*, *hslV*, *ffh*, *yqjD* y *secY*.



**Figura 18:** resultado obtenido en el ensayo de PCR en tiempo real. En el eje de abscisas se muestra el valor  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  en escala logarítmica y en el eje de ordenadas los genes para los que se ha medido la expresión. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en los diferentes experimentos.

Todas las proteínas cuyos genes están diferencialmente expresados tienen actividad chaperona, lo que demuestra que las proteínas podrían estar implicadas en el plegamiento de proteínas (Walter, 2002) o estar previniendo la agregación de sus dianas antes de la inserción en membrana (de Crouy-Chanel et al., 1999).

## R5. Análisis de la interacción entre TM con las proteínas HslU y MetH

Las proteínas HslU y MetH fueron las más sobre-representada cuando analizamos la asociación del interactoma con la quimera TM. Si bien HslU es una chaperona y su función está relacionada con el plegamiento de proteínas, MetH es una enzima sin relación descrita con la inserción de proteínas en la membrana ni con el plegamiento de proteínas. Seleccionamos estas dos proteínas para llevar a cabo una caracterización por métodos químico-físicos de su interacción con la quimera TM.

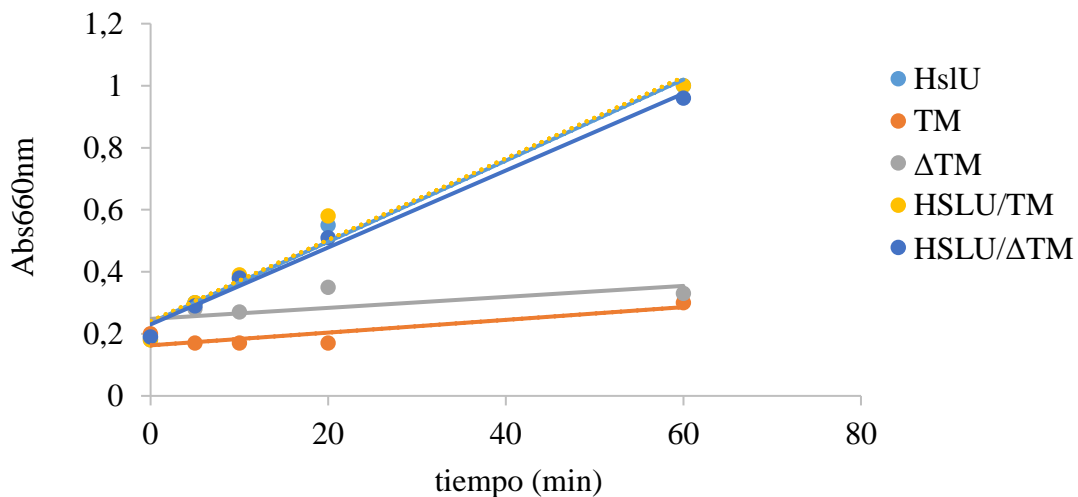
### R5.1 Ensayos funcionales

Los ensayos funcionales llevados a cabo fueron: (1) análisis de la actividad ATPasa de la proteína HslU, (2) análisis de luz dispersada Rayleigh de las proteínas HslU y MetH y (3) cromatografía de filtración en gel de las proteínas HslU y MetH.

### R5.2.1 Análisis de la actividad ATPasa

Mediante un ensayo colorimétrico con verde malaquita, se analizó la actividad ATPasa de la HslU midiendo el fosfato inorgánico liberado al medio. Además, a la proteína HslU, se le añadieron las quimeras para determinar si su presencia afectaba a la actividad ATPasa.

La liberación de fosfato inorgánico para la HslU ocurrió de forma lineal a lo largo del tiempo (**Figura 19**) (Chan et al., 1986). Este fosfato es producido por la hidrólisis del ATP. Sin embargo, las quimeras TM o  $\Delta$ TM no alteraron la actividad, puesto que no se observaron cambios en la actividad ATPasa respecto a la HslU en ausencia de otras proteínas.



**Figura 19:** Variación de la absorbancia a lo largo del tiempo. La proteína HslU fue incubada sola o con las quimeras en tampón TBS. Las alícuotas del ensayo se sacaron a diferentes intervalos de tiempo y la reacción se detuvo para determinar el fosfato inorgánico liberado.

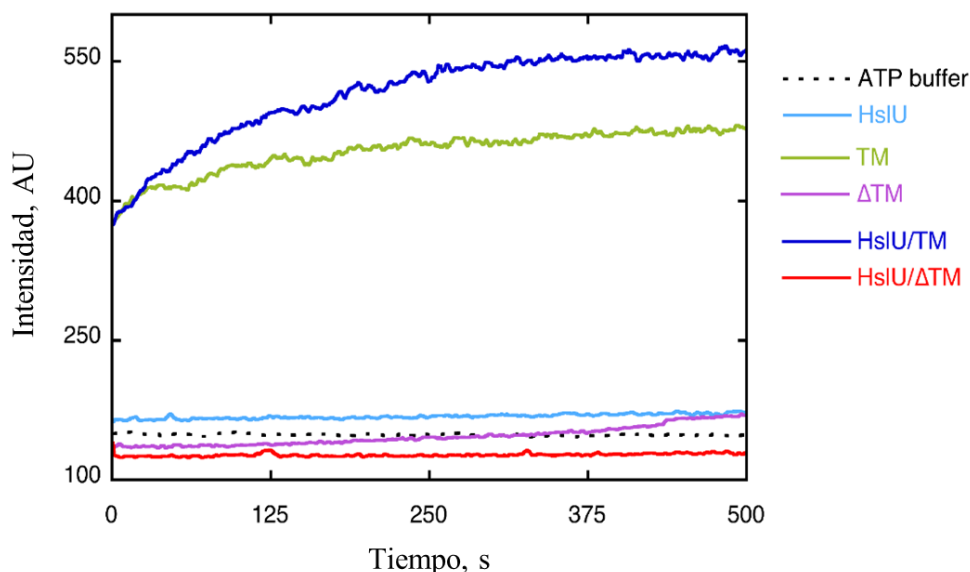
### R5.2.2 Análisis de la interacción mediante luz dispersada Rayleigh

Las medidas de luz dispersada fueron hechas a 550 nm usando concentraciones equimoleculares de las proteínas. A esta longitud de onda, la absorción de las proteínas

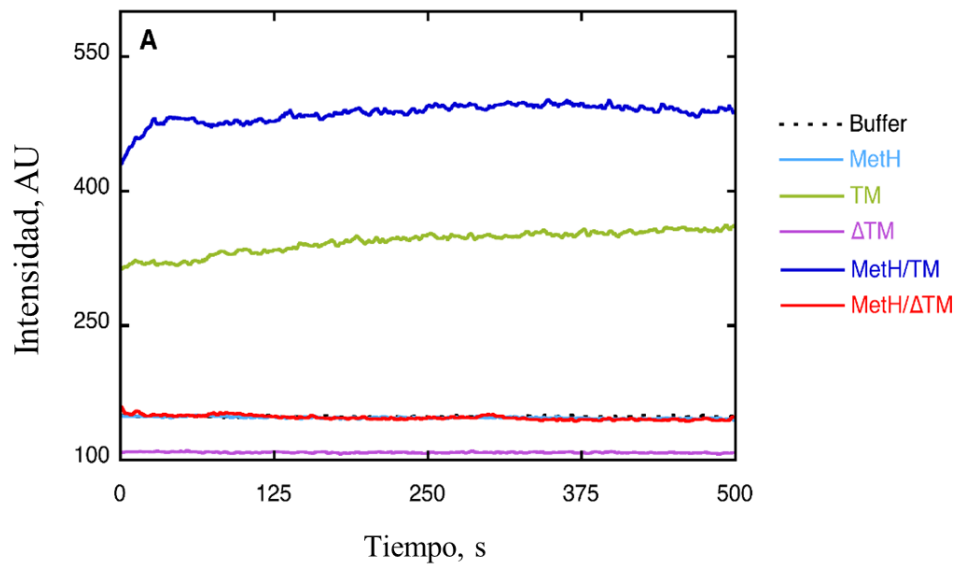
debido a sus cromóforos intrínsecos es cero. Por tanto, la intensidad de dispersión se debe a la formación de partículas de elevado tamaño.

Tanto HslU como MetH y la quimera  $\Delta$ TM no mostraron dispersión, lo que indicaba que en las condiciones experimentales usadas dichas proteínas son solubles. Por el contrario, la quimera TM, al añadirse al medio de incubación, muestra una dispersión de luz considerable. Este resultado sería compatible con la presencia de una fracción de proteína desnaturalizada.

Los experimentos de estabilidad mostraron que, incluso en ausencia de desnaturizante, un pequeño porcentaje de proteína desplegada se encuentra en equilibrio con la proteína nativa. La presencia de HslU (**Figura 20**) y MetH (**Figura 21**) en el medio en el momento de la adición de la quimera TM produce un aumento de la intensidad de dispersión indicando una interacción directa entre las dos proteínas. Este efecto no se observa con la quimera  $\Delta$ TM.



**Figura 20: Interacción proteína-proteína monitorizada mediante luz dispersada Rayleigh.** Los análisis de interacción proteína-proteína se realizaron mezclando proteína HslU en tampón PBS suplementado con ATP y  $MgCl_2$ . Tras una pre-incubación, se agregaron las quimeras TM o  $\Delta$ TM y se procedió a medir de forma inmediata la intensidad de luz dispersada a 550 nm. Los experimentos a lo largo del tiempo muestran cambios en la intensidad de la luz dispersada cuando la quimera TM interacciona con HslU. AU: Unidades Arbitrarias.



**Figura 21: Interacción proteína-proteína monitoreada mediante luz dispersada Rayleigh.** Los análisis se realizaron mezclando proteína MetH en tampón PBS. Se agregaron las quimeras TM o  $\Delta$ TM y se procedió a medir de forma inmediata la intensidad de luz dispersada a 550 nm. Los experimentos a lo largo del tiempo muestran cambios en la intensidad de la luz dispersada cuando la quimera TM interacciona con HslU. AU: Unidades Arbitrarias.

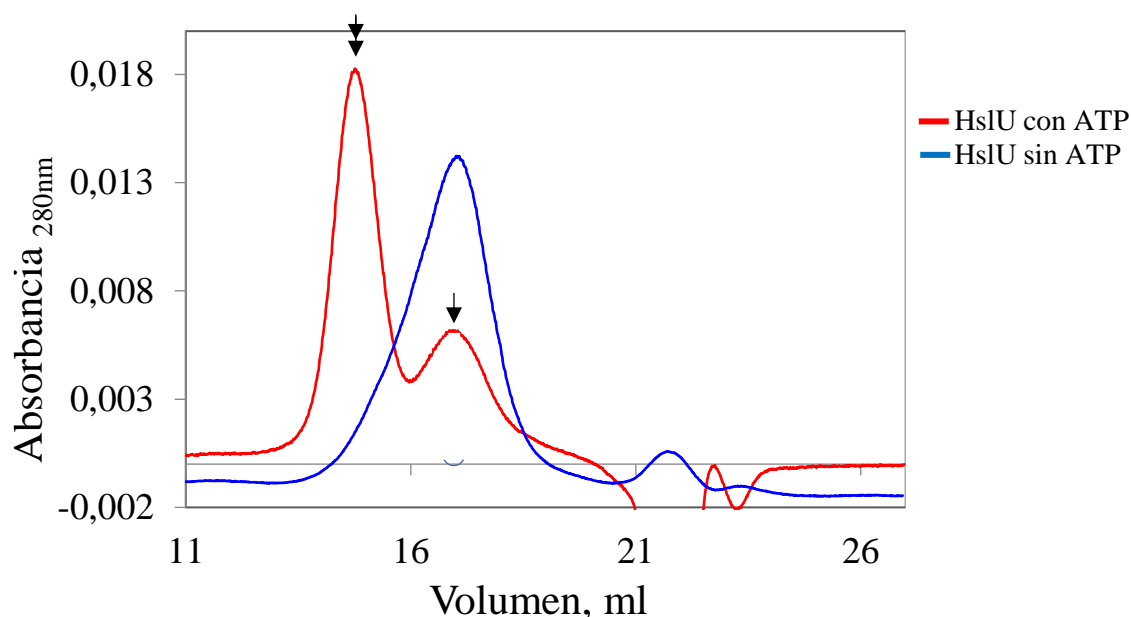
### R5.2.3 Análisis de la interacción mediante cromatografía de filtración en gel

La interacción entre la HslU y MetH con las quimeras fue estudiada por cromatografía de filtración en gel para detectar cambios en el tamaño aparente de las proteínas.

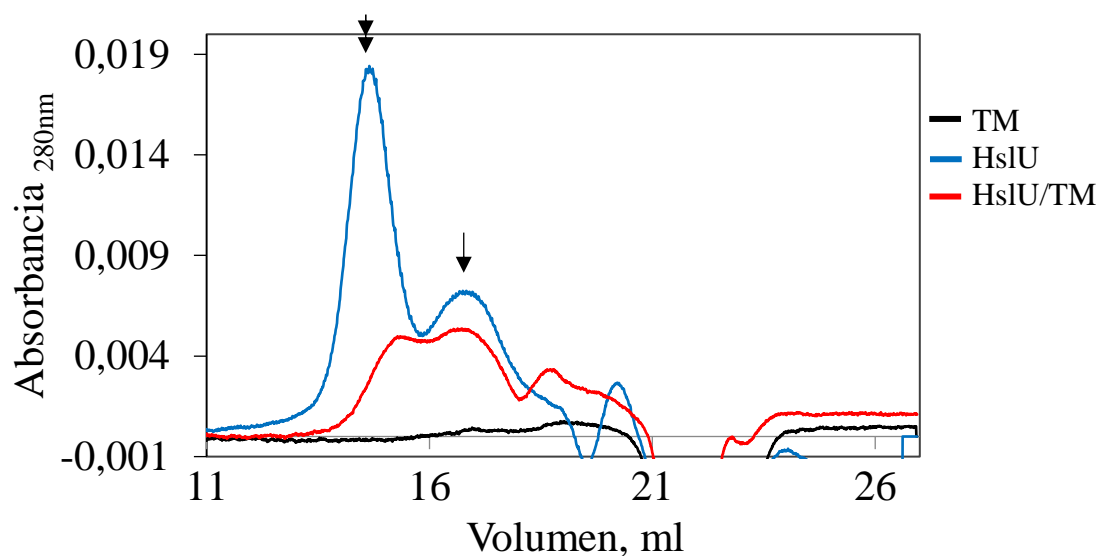
En primer lugar, con el objetivo de comprobar la funcionalidad de la HslU, se analizó su oligomerización dependiente de ATP (Lien et al., 2009; Seong et al., 2000). La cromatografía de exclusión molecular (**Figura 22**) de la proteína en ausencia de ATP mostró un pico correspondiente al monómero, mientras que en presencia de ATP el pico mayoritario correspondió al hexámero de HslU.

HslU y la quimera TM fueron incubadas en presencia de ATP. Se observó la aparición de agregados que fueron eliminados mediante centrifugación. El sobrenadante de la mezcla fue analizado por cromatografía de exclusión molecular (**Figura 23**). Dado que la absorbancia de la quimera TM a la concentración utilizada es demasiado baja para su

detección, el cromatograma obtenido corresponde a la absorbancia de HslU. Se observó una disminución global de la señal. Sin embargo, esta disminución no afectó por igual a los dos picos de HslU. Así, el hexámero de HslU disminuyó en mucha mayor medida que el monómero. Los datos sugieren que la quimera TM interacciona preferentemente con el hexámero de HslU y que, probablemente, formen los agregados observados que fueron eliminados en la centrifugación. La formación de estos agregados explicaría los resultados de dispersión de luz mencionados en el apartado anterior.

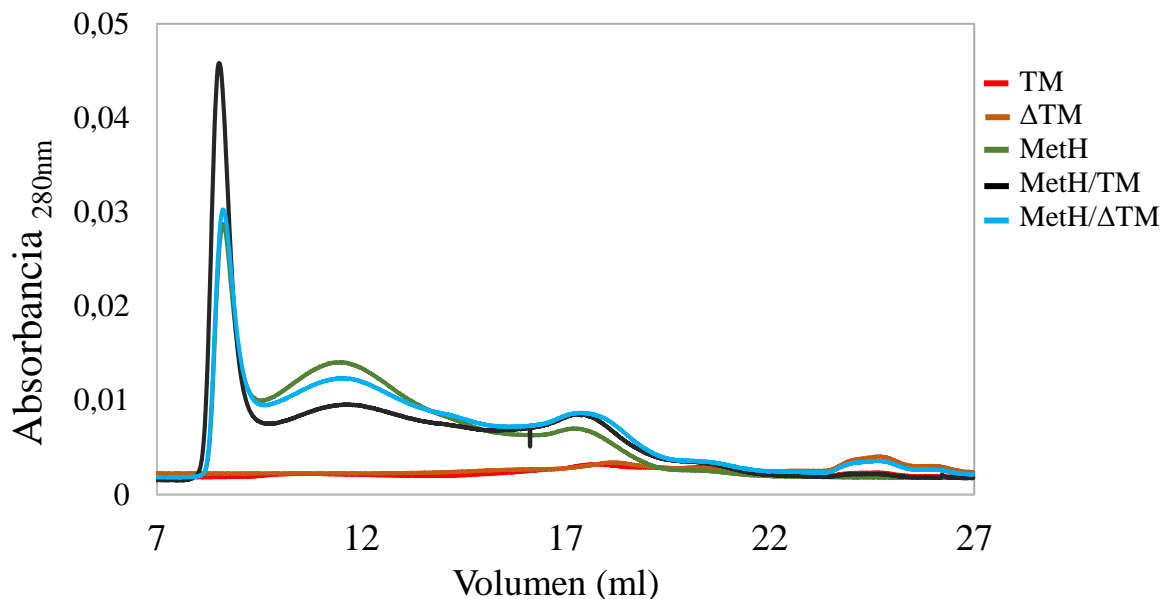


**Figura 22: Cromatografía de filtración en gel de HslU en presencia y ausencia de ATP.** Se observa la presencia de los picos de elución correspondientes al monómero (flecha sencilla) y al hexámero (flecha doble).



**Figura 23:** *Cromatografía de filtración en gel de HslU en presencia de ATP. La cromatografía muestra dos picos de elución correspondientes al monómero (flecha sencilla) y hexámero (flecha doble). Cuando la cromatografía se corre en presencia de la quimera TM y HslU, se observa fundamentalmente un descenso del pico de hexámero.*

MetH y las quimeras TM y  $\Delta$ TM fueron incubadas en PBS. El cromatograma obtenido corresponde a la absorbancia de MetH (**Figura 24**), puesto que la de las quimeras no era observable a las concentraciones utilizadas. El cromatograma muestra que tan sólo la quimera TM es capaz de interactuar con la proteína MetH, ya que al ser incubadas juntas se observa un aumento del pico correspondiente al volumen de exclusión correspondiente a formas de elevado peso molecular aparente. Este aumento está asociado a una disminución del pico de mayor área de MetH en ausencia de la quimera TM. Este pico nos indica la presencia de un incremento del peso molecular debido a la formación de un complejo.



**Figura 24:** Cromatografía de filtración en gel de la proteína MetH. Se muestra en la cromatografía un primer pico de elución correspondiente al complejo formado por la MetH y TM, mientras que no se observa variación en el peso molecular cuando la MetH y la  $\Delta$ TM son incubadas juntas.

## R5.2 Análisis de entrecruzamiento con proteína purificada

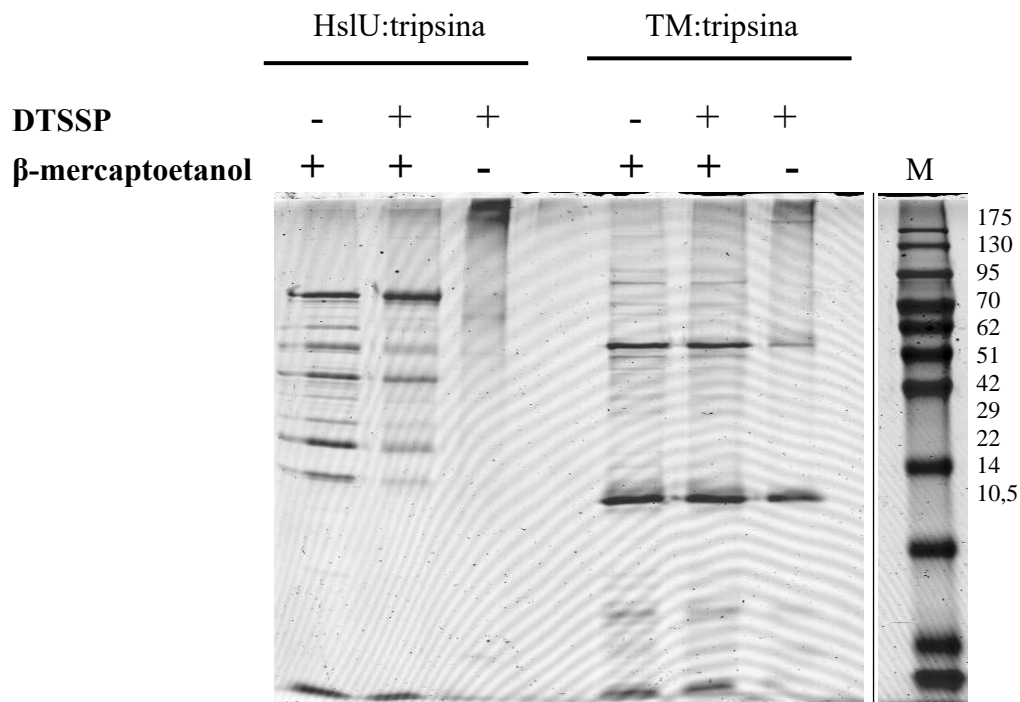
El objetivo de este análisis fue confirmar la interacción entre la HslU y la quimera TM buscando bandas en gel de acrilamida que correspondieran a fragmentos peptídicos entrecruzados entre ambas proteínas.

Para ello, se realizó un experimento de entrecruzamiento entre ambas proteínas, seguido de una proteólisis parcial con tripsina para generar fragmentos entrecruzados que pudiesen ser visualizados mediante electroforesis. Los fragmentos generados se corrieron en gel de acrilamida y se seleccionaron aquellas bandas que aparecían en las muestras tratadas con entrecruzador, pero no eran visibles en las no tratadas. Estas bandas fueron recortadas del gel para realizar un análisis LC-MS/MS (**Figura 25 y 26**).

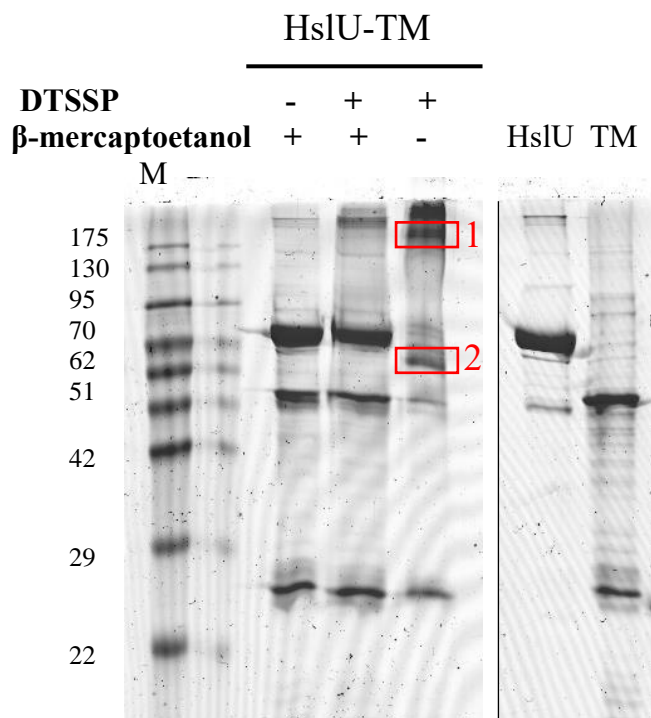
Para poner a punto la digestión con tripsina se estudiaron diferentes condiciones en las que se varió la ratio tripsina:proteína y el tiempo de incubación con la proteasa. Las mejores condiciones fueron aquellas que nos permitieron ver fragmentos intermedios de



la digestión, permitiendo su observación en gel. Las condiciones seleccionadas fueron una ratio 1:100 y un tiempo de 30 min para la mezcla de la HslU con la quimera TM.



**Figura 25:** *digestión con tripsina de la proteína HslU y la quimera TM. Los experimentos fueron llevados a cabo en presencia (+) o ausencia (-) del entrecruzador DTSSP y del reductor  $\beta$ -mercaptoetanol, que rompe el entrecruzamiento. M: marcador de proteínas PiNK Prestained (Genetics).*



**Figura 26: digestión con tripsina de la proteína HslU en presencia de la quimera TM.** La mezcla de HslU y TM (HslU-TM) se digirió con tripsina en presencia (+) o ausencia (-) del entrecruzador DTSSP y el reductor  $\beta$ -mercaptoetanol, que rompe el entrecruzamiento. Los recuadros rojos indican las dos bandas seleccionadas para su análisis mediante LC-MS/MS. Las bandas denominadas “HslU” y “TM” corresponden a las proteínas sin digerir con tripsina utilizadas como controles. M: marcador de proteínas PiNK Prestained (Genetics).

El análisis mediante LC-MS/MS indicó que las bandas observadas en los geles están compuestas de quimera TM y HslU, confirmando su interacción. Los péptidos de HslU identificados se distribuyeron a lo largo de toda la secuencia, sugiriendo que no se trata de un único fragmento truncado sino un conjunto de ellos. Los datos de los espectros de fragmentación (archivos .mgf) se analizaron con StavroX3 para intentar identificar péptidos entrecruzados (**Figura 27 y Tabla 7**), observándose fragmentos entrecruzados entre la quimera TM y la HslU (interproteína) y entre la HslU consigo misma (intraproteína).

**(A)**

MATSTK<sup>KLHKEPATLIKAIDGDT</sup>**VKLMYK**GQPMTFRLLLVDTPETKHPKKGVEKYGPEA  
 SAFTKKMVENAKKIEVEFDKGQRTDKYGRGLAYIYADGKVMNEALVRQGLAKVAYVYKPE  
 NN<sup>THEQH</sup>LRKSEAQA<sup>KK</sup>KEKLN<sup>IW</sup>SEDNADSGPERVQLAHHFSEPEITLIIFGVMAGVIG  
 TILLISYGTRRLIKKSPSDVKPLPSPDPTDVPLSSVEIENPETSQ<sup>HHHHHH</sup>

**(B)**

MSEMPREIVSELDK**HIIGQDNAKR**SVAIALRNRRMQLNEELRHEVTPKNILMIGPT  
 GVGKTEIARRLAKLANAPFIKVEATKFTTEVGYVGKEVDSIIRD<sup>LTDA</sup>AVK**MVRVQAIEK**  
 NRYRAEELAEERILDVLI<sup>PPAKNNWGQTEQQQEP</sup>SAARQAFRKKLREGQLDDKEIEIDL  
 AAAPMGVEIMAPPMEEMTSQ<sup>LQSMFQNLGGQKQKARKLKIKDAMKLLIEEEAAKLVNP</sup>  
 EELKQDAIDAVEQHGIVFIDEIDKICKRGE<sup>SSGPDVSREGVQR</sup>**DLLPLVEGCTV**STKHG  
 MVKTDHILFIASGAFQIAKPSDLIPELQGR<sup>LPIRVELQALTTSDFERILTEPNASITVQ</sup>  
 YKALMATEGVNI<sup>EFTDSGIKRIAEEAAWQVNE</sup>STENIGARRLHTVLERLMEEISYDASDL  
 SGQNITIDADYVS**KHLDALVADEDLSR**FIL

**Figura 27:** Secuencias de aminoácidos de las proteínas TM y HslU. secuencia de aminoácidos de la quimera TM (A) y la proteína HslU nativa (B). Se muestran en amarillo las secuencias entrecruzadas entre la HslU y la TM (interproteína). Además, en azul se representan las secuencias entrecruzadas dentro de la propia HslU (intraproteína). Adicionalmente, la secuencia aminoacídica de la HslU se representa en varios colores: la secuencia en negro corresponde al dominio funcional N, la verde al dominio I y la azul al dominio C.

**Tabla 7:** Fragmentos identificados en los ensayos de entrecruzamiento. Se muestra en la Tabla el número de banda en la que se identificaron, la m/z y la carga de los cromatogramas, así como las secuencias identificadas. Se muestra subrayado el residuo entrecruzado entre los fragmentos.

Banda	m/z	Carga	Proteína	Péptido	Proteína 2	Péptido 2
1	710,3511	3	TM	V <u>K</u> LMYK	HslU	DLLPLVEG <u>C</u> T
1	969,484	3	HslU	HIIGQDNA <u>K</u> R	HslU	<u>K</u> HLDALVADEDLSR



# **DISCUSIÓN**



El objetivo de esta primera parte de la tesis fue diseñar una estrategia que nos permitiera identificar proteínas participantes en el proceso de inserción de proteínas de membrana. Para ello utilizamos una serie de experimentos de sobre-expresión de proteínas quiméricas combinados con entrecruzamiento de proteínas que nos ha permitido identificar una serie de proteínas que muestran una interacción preferencial cuando la quimera contiene un segmento TM. Posteriormente hemos validado alguna de las interacciones empleando diferentes técnicas experimentales.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se diseñaron dos proteínas recombinantes, las quimeras TM y  $\Delta$ TM. Las dos quimeras contenían la misma secuencia peptídica a excepción de un segmento TM proveniente de la glicoforina A, que estaba incluido en la secuencia de la proteína TM. La presencia del dominio transmembrana desestabiliza la proteína y los datos son compatibles con una estructura parcialmente desplegada. Esto podría explicar en parte, la mayor presencia de chaperonas celulares cuando analizamos el interactoma unido a la construcción TM, ya que la proteína, parcialmente desplegada, podría encontrarse estabilizada por la acción de chaperonas celulares con el objetivo de impedir su agregación o permitir su correcto plegamiento. A pesar de esta inestabilidad, los datos de fraccionamiento subcelular indican que la quimera TM se localiza mayoritariamente en la membrana celular, a diferencia de la quimera  $\Delta$ TM que es citosólica. Estos datos muestran que la maquinaria celular es capaz de direccionar la proteína hacia la membrana a pesar de su inestabilidad, probablemente mediante la participación de chaperonas.

Decidimos entonces investigar las proteínas que se asociaran a la quimera TM, de localización membranosa, y que pudiesen estar implicadas en la inserción de proteínas de membrana. Así pues, el siguiente paso fue entrecruzar las proteínas quiméricas para identificar y cuantificar su interactoma asociado. La idea del experimento era utilizar la quimera  $\Delta$ TM como control, de forma que pudiéramos identificar las proteínas asociadas con el segmento transmembrana presente en la quimera TM. El entrecruzamiento permitió la estabilización del interactoma, mientras que con las sucesivas purificaciones redujimos las proteínas contaminantes en los experimentos. El análisis de los procesos biológicos a los que pertenecían las proteínas identificadas reveló un enriquecimiento en proteínas implicadas en el plegamiento de proteínas, metabolismo y respuesta a estímulos. La presencia de algunas de estas proteínas pudo ser confirmada mediante geles de dos dimensiones no reductores.

La identificación de proteínas contaminantes se analizó estudiando la proteína total expresada en *E. coli* conteniendo las quimeras TM y  $\Delta$ TM. Estos ensayos nos permitieron descartar que la interacción diferencial de las proteínas más significativas identificadas en los experimentos de purificación del interactoma fuera un artefacto. Los datos de proteína total coinciden parcialmente con lo observado por qPCR, cuya expresión a nivel génico se ve aumentada en el caso de GroEL, DnaK y HslV en presencia de la quimera TM. La expresión de las demás proteínas analizadas mediante qPCR, aumenta a nivel de mRNA, pero estos cambios no pudieron ser detectados a nivel de proteína total.

Entre las proteínas identificadas en el interactoma asociado a la quimera TM encontramos proteínas con función chaperona como HslU, ClpA, ClpP, IbpA o DnaJ. Además, encontramos la proteína YidC, una insertasa de proteínas de membrana; SecY, una proteína del translocón; y la proteína SRP54, una proteína que se une a la secuencia señal para direccionar algunas proteínas a la membrana. Todas estas proteínas identificadas están descritas como participantes en el proceso de inserción o translocación de proteínas en *E. coli*.

En bacteria se ha descrito que las proteínas secretoras y de membrana se envían a la membrana plasmática mediante mecanismos co y postraduccionales. El motivo por el que las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de translocación de proteínas no está claro. Se ha sugerido que la translocación postraducciona pueda deberse a que, en organismos de crecimiento rápido, sería beneficioso desacoplar ambos procesos, puesto que la traducción es más lenta que la translocación. Esto permitiría a las bacterias utilizar el número máximo posible de canales del translocón, que son menos abundantes que los ribosomas. Otros mecanismos habrían sido entonces desarrollados para los sustratos que no pueden usar la ruta del translocón. Por ejemplo, se ha observado que muchas de las proteínas que contienen varios fragmentos transmembrana puedan ser reconocidas por la SRP, puesto que al ser muy hidrofóbicas pueden precipitar en el citosol (Hegde and Bernstein, 2006).

En *E. coli* existen varios tipos de proteínas que se unen al translocón SecY para su translocación o inserción en la membrana. Por un lado, se encuentran las proteínas integrales que atraviesan la membrana múltiples veces. El otro tipo de proteínas son las que se sitúan en la membrana interna y que utilizan la SRP y su receptor FtsY para la unión al translocón, en cuyo caso utilizan la vía cotraducciona. La inserción de proteínas



en la membrana de *E. coli* se produce fundamentalmente mediante esta última ruta y depende del translocón SecYEG y de la proteína YidC. Asimismo, se han descrito mecanismos de inserción postraduccionales de proteínas de membrana que también implican a la proteína YidC de forma independiente de SRP (Castanié-Cornet et al., 2014; Peschke et al., 2018; Saraogi and Shan, 2014).

Por otra parte, en *E. coli*, las proteínas secretoras y muchas proteínas de membrana externa, siguen una ruta de secreción postraduccionales, atravesando la membrana mediante el translocón SecY y siendo dependientes de SecA y SecB para su direccionamiento y prevención de la agregación en el citosol (Gold et al., 2007). Además, se ha propuesto la existencia de otro tipo de ruta cotraduccionales para proteínas secretoras independiente de SecB y SRP. En este último caso se ha visto interacción con GroEL y GroES que podrían estar sustituyendo a SecB en su función chaperona (Beha et al., 2003).

En relación al interactoma asociado con la quimera TM, encontramos proteínas relacionadas con el metabolismo, como las proteínas PflA, PdxB o MetH. Estas proteínas no tienen función aparente en la inserción de proteínas de membrana, por lo que se plantea que puedan ser proteínas multifuncionales o *moonlighting*. Las proteínas *moonlighting* presentan dos o más funciones fisiológicas, bioquímicas o biofísicas. Estas funciones no tienen relación unas con otras y son siempre llevadas a cabo por la misma cadena polipeptídica. La primera función descrita para una proteína de este tipo se denomina canónica, mientras que la segunda es la llamada *moonlighting*. Un ejemplo de esto es la glucosa-6-fosfato isomerasa, que participa en las rutas metabólicas de la glucólisis y gluconeogénesis, mientras que también funciona como un factor neurotrófico para algunos tipos de neuronas, un factor de motilidad autocrina y un mediador de la maduración y la diferenciación de células mieloides (Henderson and Martin, 2011). Otros ejemplos de proteínas *moonlighting* son chaperonas que secretadas sirven como factores de crecimiento celular o como moléculas señalizadoras y que a su vez se unen a la superficie celular para ejercer un papel como receptores (Jeffery, 2014).

Así, como resultado del análisis del interactoma, decidimos escoger dos proteínas para analizar si la relación con la quimera TM era específica. Por una parte, escogimos la HslU, que resultó ser la chaperona más representada en la muestra TM. Esta proteína, con actividad chaperona, no ha sido relacionada específicamente con proteínas de membrana. Por otro lado, estudiamos la proteína MetH, una de las proteínas más abundantes,

relacionada con el metabolismo y sin relación descrita con la inserción de proteínas en la membrana.

La proteína HslU, de 50 kDa, es un miembro de la familia de chaperonas moleculares Clp/Hsp100 (Seong et al., 2002), que formando un complejo con HslV (19 kDa) facilita la degradación de proteínas diana (Gottesman, 1996; Kwon et al., 2004). Se ha descrito que en *E. coli*, existen cinco proteasas dependientes de ATP, también llamadas chaperonas de tipo AAA, que son FtsH, Lon, ClpXP, ClpAP y HslUV. Estas proteínas combinan la actividad ATPasa para el desplegamiento de proteínas con la degradación de las mismas. Todas ellas forman complejos oligoméricos en forma de barril con uno o más anillos y con sitios activos dentro de una cámara de degradación central. Los canales de acceso a la cámara son estrechos y las proteínas sustrato se despliegan para poder entrar.

En caso de la maquinaria HslUV, el hexámero HslU actúa como proteína AAA, cuya función es reconocer, desplegar y translocar sustratos al interior de la cámara de proteólisis, mientras que HslV, dodecamérica, forma la parte catalítica del sistema. En el caso de la HslV existe homología de secuencia y estructural con las subunidades  $\beta$  catalíticas del proteasoma 20S eucariota. Mientras que HslU comparte un 50% de homología con el dominio AAA de la ClpX bacteriana (Koodathingal et al., 2009).

Con el objetivo de validar la interacción entre HslU con la quimera TM, se realizaron ensayos de luz dispersada en los que se observó que la quimera TM, incubada en presencia de la proteína HslU, aumentó la intensidad de absorción debido a la posible formación de partículas de mayor tamaño. Además, la cromatografía de filtración en gel, mostró la disminución de la fracción hexamérica y precipitación proteica cuando se incubó la HslU en presencia de ATP y la quimera TM, probablemente debido a la formación de un complejo entre ambas proteínas. Por último, para confirmar la interacción directa entre la HslU con la quimera TM, se analizó el entrecruzamiento utilizando proteína purificada.

Se ha descrito en la bibliografía que la HslU (en ocasiones llamada ClpY) se divide en tres dominios funcionales: (1) el dominio N-terminal (N), que va de los residuos 2-109 y del 244-332; (2) el dominio I-intermedio (I), que abarca los residuos 110-243; (3) y el dominio C-terminal (C), desde el 333-443 (**Figura 28**) (Azim et al., 2005; Baytshtok et al., 2016; Lien et al., 2009; Sundar, 2011)



**Figura 28: Dominios funcionales de la HslU.** La proteína se compone de un total de 443 aminoácidos que incluye un dominio N, I y C. Se indican en la imagen los residuos pertenecientes a cada uno de los dominios. Imagen modificada de Lien et al. (2009).

El dominio N tiene actividad ATPasa. En su secuencia, el motivo  $G^{90} Y^{91} V^{92} G^{93}$  está implicado en el desplegamiento y la translocación de sustratos proteicos al núcleo interno de HslV para su degradación. Además, el dominio N, es necesario para la asociación y disociación de los sustratos con HslV. El dominio I es el responsable de la asociación con HslV. Dentro de este dominio podemos diferenciar el bucle 2 (aminoácidos 175-209), que juega un papel en la fijación de sustratos. Este bucle, junto al bucle 1 (aminoácidos 137-150), es requerido para el envío de los sustratos al núcleo interno de la HslV para su degradación. Este dominio modula la especificidad de sustrato, regula la hidrólisis de ATP y controla la dirección de la degradación de las proteínas diana. El dominio C es el responsable de la homo-oligomerización mediante la hidrólisis de ATP y estimula la actividad proteolítica de HslV.

En nuestros experimentos encontramos péptidos entrecruzados entre la propia proteína HslU, en dos regiones que van desde los residuos 16-25 y 247-440. Esto concuerda con ensayos descritos en la bibliografía en los que se ha visto que la mutación del residuo 408 impide la hexamerización de HslU (Hsieh et al., 2011).

Los modelos de degradación de sustratos mediante la maquinaria HslUV describen un mecanismo en el que el segmento C-terminal del sustrato se ancla al dominio I de la HslU, mientras que el extremo N-terminal del sustrato se acopla al poro formado por HslU. Así, se ha observado que la degradación de proteínas tiene lugar desde el extremo N al C-terminal (Sundar et al., 2010). Este modelo explica que mutaciones de las secuencias N y C-terminal de algunos sustratos estudiados afectan a la tasa de degradación. Esto está en concordancia con los resultados encontrados en nuestros ensayos en los que observamos que los residuos entrecruzados en la quimera TM están próximos al dominio N-terminal (residuos 24-29). Mientras que, en la HslU, los residuos entrecruzados forman parte del segmento N (residuos 280-290 en la proteína nativa), que se encuentran incluidos en el canal que atraviesan los sustratos para su degradación. Además, en trabajos previos se ha

comprobado que existe una reducción en la actividad proteasa sobre diferentes sustratos cuando se muta el residuo 286 de la HslU (Seong et al., 2000).

La proteína MetH está implicada en la vía que sintetiza metionina a partir de homocisteína, catalizando la transición de un grupo metil desde la N-metil-tetrahidrofolato a la coenzima cobalamina y después a la homocisteína durante el último paso de síntesis de la metionina.

El ciclo de la metionina tiene importantes funciones en el metabolismo celular. Por un lado, regula el balance entre metionina y cisteína para la síntesis de proteínas, además provee de sustratos para la síntesis de poliaminas y por último, provee de un mecanismo por el que los grupos metilo se transfieren del 5-metiltetrahidrofolato a una variedad de sustratos que constituye el mecanismo primario para las reacciones de transmetilación (Reed et al., 2004).

La MetH es una enzima de 136 kDa, que comprende cuatro dominios funcionales. Durante el primer paso, el dominio de unión a B12, que une metilcobalamina, se une al módulo Hcy, que une homocisteína y permite la transferencia del grupo metilo para formar metionina y cobalamina(I). Este dominio, junto al dominio de unión a pterina, cataliza la re-metilación de cobalamina(I) mediante el metiltetrahidrofolato formando tetrahidrofolato. Por último, el dominio AdoMet de activación une la S-adenosilmetionina que interactúa con la cobalamina(I) oxidándola a cobalamina(II), que es inactiva. La metilcobalamina debe ser entonces vuelta a activar a partir de la la cobalamina(II) por la S-adenosilmetionina como donadora de grupo metilo y la flavodoxina como donadora de electrones. De este modo, la MetH cataliza tres reacciones de transferencia de grupos metilo utilizando la cobalamina como cofactor (Goulding et al., 1997; Koutmos et al., 2009).

En nuestros experimentos, para confirmar la interacción entre la MetH y la quimera TM, se realizaron tanto ensayos de luz dispersada como de cromatografía de exclusión molecular. Por un lado, se demostró la existencia de una variación en la intensidad de luz dispersada cuando ambas proteínas se incubaron juntas. Además, en la cromatografía, se observó la presencia de un pico de mayor peso molecular cuando ambas proteínas se encontraban juntas, que de forma individual. En conjunto, ambos experimentos sugieren la formación de un complejo entre ambas proteínas.

# **CONCLUSIONES**



1. Hemos desarrollado un procedimiento para la identificación de proteínas que participan en la inserción de proteínas de membrana, presumiblemente mediante la ruta postraducciona.
2. Parte de las proteínas identificadas son chaperonas, pero otras no tienen ninguna actividad conocida relacionada y podría tratarse de proteínas *moonlighting*.
3. Hemos caracterizado parcialmente la interacción entre la proteína quimera con algunas de las proteínas identificadas y hemos demostrado la interacción directa entre las mismas.
4. Los datos validan el sistema utilizado como una potente herramienta para la caracterización del interactoma unido a proteínas tanto citosólicas como de membrana.





## **Objetivo 2**

**Estudio de las proteínas humanas incluidas en el virión del virus Nipah.**



## CONTENIDOS OBJETIVO 2

<b>ABREVIATURAS</b> .....	101
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	103
I6. Particularidades de los virus .....	105
I6.1 Clasificación de los virus .....	105
I6.2 Ciclo vital de los virus .....	109
I6.2.1 Reconocimiento y unión a la célula hospedadora .....	109
I6.2.2 Internalización del genoma viral.....	110
I6.2.3 Replicación del genoma viral.....	122
I6.2.4 Síntesis proteica y su procesamiento postranscripcional .....	124
I6.2.5 Ensamblaje, formación y liberación de las partículas virales .....	125
I7. La importancia de estudiar los virus .....	129
I7.1 Tratamientos profilácticos (vacunación).....	130
I7.2 Tratamientos terapéuticos (medicamentos antivirales).....	131
I7.3 Agentes terapéuticos .....	133
I7.3.1 Fagos .....	133
I7.3.2 Virus oncolíticos .....	134
I7.3.3 Vectores virales en terapia génica.....	135
I7.4 Bioinsecticidas .....	136
I8. El virus Nipah .....	136
I8.1 Distribución geográfica y zoonosis.....	136
I8.2 Sintomatología.....	139
I8.3 Prevención y tratamiento .....	139
I8.4 Genoma y composición del virus Nipah.....	140
I8.4.1 Las proteínas N, L y P.....	142
I8.4.2 Las proteínas C, V, W y P.....	143
I8.4.3 La proteína M.....	144
I8.4.4 La proteína de fusión F .....	145
I8.4.5 La glicoproteína G .....	147
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	149
M4. Producción de las VLPs del virus Nipah .....	151
M5. Purificación de las VLPs .....	151
M6. <i>Western blotting</i> .....	152

M7. Microscopía electrónica de transmisión .....	152
M8. Purificación y análisis de las proteínas asociadas a las VLPs del virus Nipah.....	153
M9. Preparación de las muestras para espectrometría de masas .....	154
M10. Análisis de los datos de espectrometría .....	154
M11. Localización e identificación funcional de las proteínas identificadas.....	155
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>157</b>
R6. Generación de las VLPs del virus Nipah.....	159
R7. Identificación de las proteínas celulares asociadas a las VLPs de Nipah.....	163
R8. Identificación de proteínas virales en las VLPs del virus Nipah .....	179
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>231</b>

## ABREVIATURAS

ARV – *Avian orthoreovirus*  
BRV - *Baboon orthoreovirus*  
BSA – Albúmina de suero bovino  
CedV - *Cedar virus*  
CLDN1 – Claudina tipo 1  
CpGV - *Cydia pomonella granulovirus*  
DDA - *Direct- acting antivirals*  
EGFR - receptor de crecimiento epidermal  
EphA2 - receptor de la efrina A2  
ER – Reticulo endoplasmático  
ESCRT – *Endosomal sorting complex required for transport*  
F – *Fusion*  
FAST - *Fusion-associated small transmembrane proteins*  
FDA - *Food and drug administration*  
G – *Glycoprotein*  
GlcNAc – N-acetilglucosamina  
GO - Gene Ontology  
GSEA - *Gene set enrichment analysis*  
HA - Hemaglutinina  
HaNPV - *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*  
HCV – Hepacivirus C  
HeV – *Hendra henipavirus*  
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*  
HP - Motivo hidrofóbico  
HSV - *Herpes simplex virus*  
ICTV - Comité internacional sobre la taxonomía de virus  
ISG - Genes estimulados por IFN  
L – *Large*  
LC-MS/MS – Cromatografía líquida - espectrometría de masas  
LDL – *Low-density lipoprotein*  
LDLR – receptor del LDL  
LdMNPV – *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus*  
M - *Matrix*  
MojV – *Mojiang henipavirus*  
MSigDB - *Molecular signatures database*  
N – *Nucleoprotein*  
NA – Neuraminidasa  
NBV – *Nelson Bay orthoreovirus*  
NiV – *Nipah henipavirus*  
NPC1L1 - transportador del colesterol Niemann-Pick C1-like 1  
OV – Virus oncolítico  
P – *Phosphoprotein*  
PAMPs - Patrones moleculares asociados a patógenos virales  
PB - Motivos Polibásicos  
PRR - Receptores de reconocimiento de patrones  
RdRP – *RNA-dependent RNA polymerase*  
RNP – *Ribonucleoprotein complex*  
RE – Reticulo endoplasmático

RIG-I - *Retinoic acid-Inducible Gene I*  
RRV – *Reptilian orthoreovirus*  
RT - Transcriptasa reversa  
SeMNPV - *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus*  
SeV – *Sendai Virus*  
SR-B1 - Receptor Scavenger B1  
STAT1 – *Signal transduction activator of transcription 1*  
SV40 – *Simian virus 40*  
TBS - Tris-buffer saline  
TfR1 - receptor de la transferrina  
TLR - Receptores tipo Toll  
Vhs - *Virion Host Shutoff*  
VIH – *Human immunodeficiency virus*  
VLP – *Virus-Like Particle*  
VPH – *Human papillomavirus*  
VPS – *Vacuolar protein sorting*  
VSV – *Vesicular stomatitis virus*

# **INTRODUCCIÓN**





## 16. Particularidades de los virus

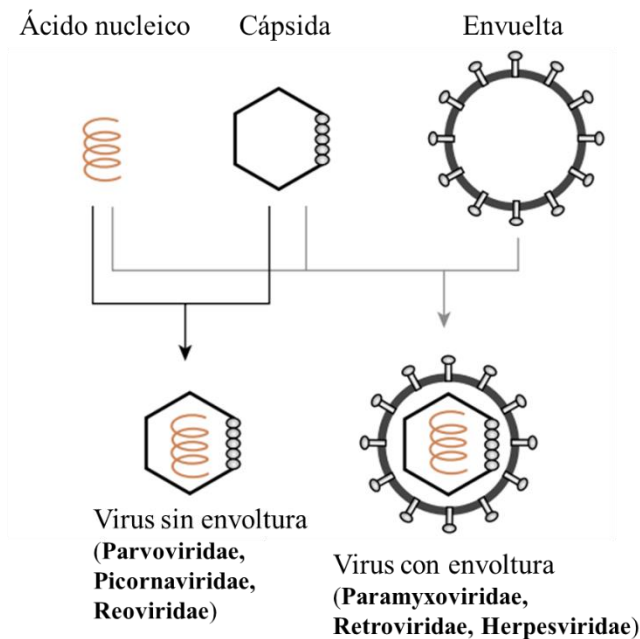
Los virus son parásitos intracelulares obligados, dependen por tanto de la célula hospedadora para llevar a cabo la mayoría de las funciones de su ciclo vital, el cual termina con la formación de una partícula viral completa. Este se denomina virión e incluye todos los elementos necesarios para una infección eficiente. Estructuralmente existe una enorme diversidad viral, de manera resumida podríamos indicar que los virus están compuestos por material genético rodeado por una cubierta proteica y, en algunos casos, por una bicapa lipídica. Igualmente, el genoma viral varía tremendamente en su composición (ya que puede estar constituido por ADN, ARN o una mezcla de ambos) y tamaño, oscilando entre 1,6 kb en el caso de los Deltavirus y 250 kb para algunos Herpesvirus. Todas estas variaciones genómicas y estructurales, hacen que su rango de hospedadores sea muy variado, pudiendo infectar tanto a organismos unicelulares (como micoplasmas o bacterias) como pluricelulares (desde plantas hasta humanos) (Campillo-Balderas et al., 2015; Ryu, 2017; Walker et al., 2015).

### 16.1 Clasificación de los virus

Los viriones más simples están formados por dos componentes básicos: un ácido nucleico y una cubierta proteica conocida como cápside. (**Figura 1**). La cápside está codificada en el genoma viral y su función es la de proteger el genoma. Además, durante el proceso de infección puede llegar a participar en la unión del virión a receptores expuestos en la célula hospedadora. Así mismo, el genoma viral se encuentra asociado a proteínas, conocidas como nucleoproteínas, que estabilizan el plegamiento del ácido nucleico. El conjunto del ácido nucleico, las nucleoproteínas y la cápside es conocido como nucleocápside (Gelderblom, 1996). Además de los componentes nombrados, la nucleocápside pueden incluir otros componentes virales como polimerasas virales y factores de transcripción (Gerelsaikhan et al., 1996; Takamatsu et al., 2018).

Por otra parte, en los llamados virus con envoltura, la nucleocápside se rodea de una bicapa lipídica derivada de las membranas de la célula huésped (**Figura 29**). Estas membranas pueden provenir del retículo endoplasmático, del complejo de Golgi o incluso de la membrana nuclear y son adquiridas durante el proceso de empaquetamiento del virus. La envoltura lipídica incluye proteínas integrales de membrana codificadas en el

genoma viral, que forman una franja exterior de proyecciones conocidas como peplómeros o espículas (Birkhead and Paweska, 2015; Maclachlan et al., 2016). La función de estas proteínas es la de facilitar la entrada a la célula hospedadora mediante la identificación y unión a receptores de la membrana celular (Friedmann et al., 2011). Además de las proteínas virales, la envoltura lipídica puede contener proteínas de origen celular, que en algunos casos participan en el ciclo vital del virus.



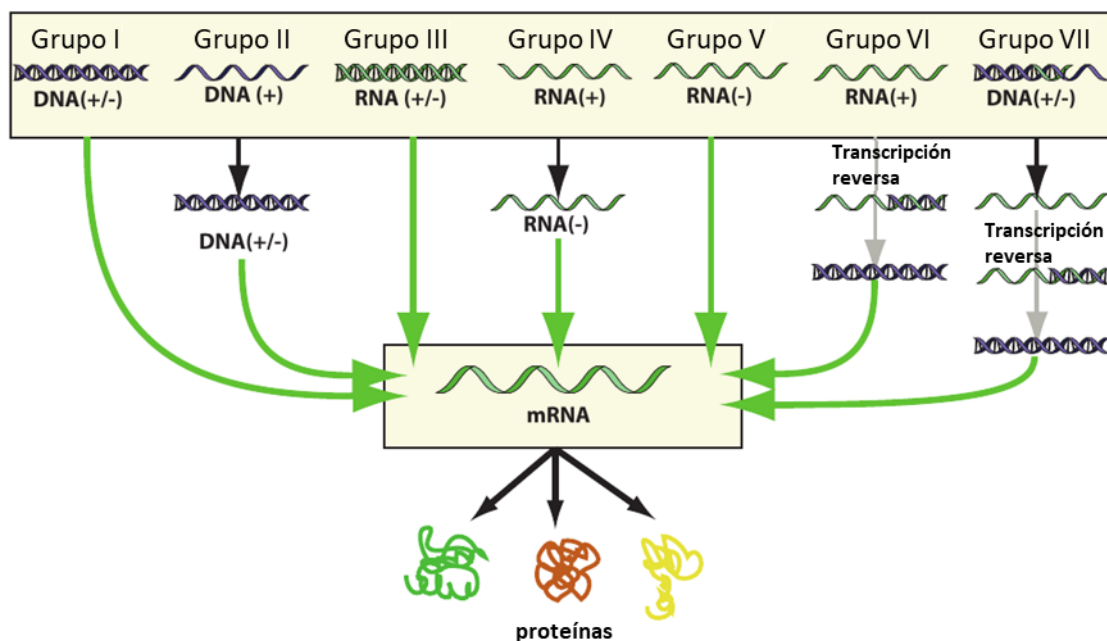
**Figura 29: Estructura de virus con y sin envoltura.** Se muestra en la Figura una representación esquemática de los componentes estructurales de los virus. Los virus sin envoltura se componen de cápside proteica y ácido nucleico, lo que constituye la unidad infecciosa o virión. La estructura de los viriones que carecen de envuelta lipídica, está determinada a su vez por la estructura de las proteínas que forman la cápside, las cuales se agrupan en unidades repetitivas llamadas capsómeros, cuya simetría puede variar de un virus a otro. Por otro lado, los virus con envoltura presentan además de la nucleocápside una bicapa lipídica proveniente de alguna de las membranas de la célula hospedadora en la cual se localizan proteínas integrales de membrana de origen viral y celular. Imagen modificada de Marintcheva (2018).

Más allá de una clasificación estructural, teniendo en cuenta la **naturaleza del genoma**, podemos dividir los virus entre aquellos que presentan un genoma de DNA o RNA, ya sea en forma de cadena doble (dsDNA o dsRNA) o simple (ssDNA y ssRNA).

Los virus de RNA contienen un genoma que puede estar formado por un solo segmento de RNA o estar distribuido en dos o más (genomas segmentados). Además, éste, puede ser lineal, como en el caso de los virus con dsRNA o circular, como algunos virus de ssRNA.

En el caso de los virus de DNA, la mayoría contienen una sola molécula lineal de ácido nucleico, ya sea de doble o simple cadena. No obstante, tal y como ocurría con los virus de RNA, también pueden contener genomas circulares o segmentados.

En vista de la gran diversidad de virus existentes, en 1973, el Comité Internacional sobre la Taxonomía de los Virus (ICTV) estableció las reglas para su organización taxonómica. Esta clasificación tiene en cuenta propiedades como la estrategia de replicación, la composición bioquímica, la estructura de las partículas, los vectores de transmisión, la organización del genoma y el rango de hospedador entre otras características (Louten, 2016)(Cáceres-Martínez y Vásquez, 2004). Debido a su complejidad, esta clasificación no es habitualmente utilizada, por lo que se han desarrollado clasificaciones más sencillas, siendo una de ellas la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971) (**Figura 30**). Ésta, categoriza a los virus basándose en la naturaleza del genoma, así como en su polaridad y estrategia de replicación. Teniendo en cuenta estas características, se establece un total de siete clases. En la **Tabla 8** se incluyen ejemplos de cada uno de los grupos virales descritos en la clasificación de Baltimore.



**Figura 30: Clasificación de Baltimore.** La clasificación de Baltimore está basada en la naturaleza del genoma viral, así como en la estrategia de síntesis del RNA mensajero (RNAm). En la Figura se muestra los siete grupos que constituyen la clasificación. Se muestra de manera esquemática el genoma viral, así como los intermediarios necesarios para sintetizar el RNAm, a partir del que se producirán las proteínas virales. Imagen modificada de <https://viralzone.expasy.org/254>.

**Tabla 8: Clasificación de Baltimore.** En la tabla se incluyen algunos ejemplos de virus y familias virales agrupados según su pertenencia a una u otra categoría dentro de la clasificación de Baltimore. Por motivos de espacio sólo se indica el nombre de algunas familias virales. Tabla modificada de (Louten (2016)).

<b>Familia</b>	<b>Ejemplos virus</b>
<b>Clase I: virus de DNA de doble cadena (dsDNA)</b>	
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus
<i>Herpesviridae</i>	Virus del herpes simple, virus de Epstein-Barr
<i>Papillomaviridae</i>	Virus del papiloma humano
<i>Polyomaviridae</i>	Poliomavirus JC, poliomavirus BK
<i>Poxviridae</i>	Virus de la viruela, virus vaccinia
<b>Clase II: virus de DNA de cadena sencilla (ssDNA)</b>	
<i>Parvoviridae</i>	Parvovirus B19
<i>Anelloviridae</i>	Virus Torque Teno
<b>Clase III: virus de RNA de doble cadena (dsRNA)</b>	
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus humano
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus
<b>Clase IV: virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA+)</b>	
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus humano
<i>Caliciviridae</i>	Virus Norwalk
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus humano
<i>Flaviviridae</i>	Virus del dengue, virus de la hepatitis C
<i>Hepeviridae</i>	Virus hepatitis E
<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus, rinovirus, enterovirus, virus hepatitis A
<i>Togaviridae</i>	Virus chikungunya, virus de la rubéola
<b>Clase V: virus de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (ssRNA-)</b>	
<i>Arenaviridae</i>	Virus de Lassa, virus Machupo
<i>Bunyaviridae</i>	Hantavirus, virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo
<i>Filoviridae</i>	Virus del Ébola, virus de Marburgo

<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus de la influenza A, virus de la influenza B
<i>Paramyxoviridae</i>	Virus Nipah, virus Hendra, virus del sarampión
<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de la rabia
<b>Clase VI: virus de RNA de cadena simple que retrotranscriben (ssRNA-RT)</b>	
<i>Retroviridae</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2
<b>Clase VII: virus de DNA de doble cadena que retrotranscriben (dsDNA-RT)</b>	
<i>Hepadnaviridae</i>	Virus de la hepatitis B

## I6.2 Ciclo vital de los virus

El objetivo de la replicación viral es la creación de nuevos viriones con capacidad infecciosa. Cada familia de virus presenta diferentes estrategias de replicación. A pesar de ello, existen algunos pasos esenciales en todos los virus que permiten que el ciclo vital pueda resumirse en unas pocas etapas comunes (Burrell et al., 2017; Louten, 2016).

### I6.2.1 Reconocimiento y unión a la célula hospedadora

El proceso de reconocimiento de la célula hospedadora por parte del virus está mediado por proteínas virales localizadas en la superficie del virión, las cuales son capaces de interactuar con receptores de la membrana plasmática. La unión a estos receptores dispara la entrada del virus en la célula (Smith, 2004).

Las moléculas que sirven de receptores al virus son moléculas de diversa naturaleza (glucoproteínas, carbohidratos o lípidos) (Jolly and Sattentau, 2006). Estos receptores difieren de un virus a otro y pueden ser moléculas ubicuas o específicas de un tipo celular concreto. De hecho, la distribución y la identidad de estos receptores determinan los tipos celulares, tejidos y organismos que un virus puede infectar. A continuación, daremos una breve descripción de algunas de las moléculas mejor caracterizadas que son utilizadas como receptores celulares por algunos virus:

Las integrinas son una superfamilia de glucoproteínas que participan en la interacción célula-célula y entre las células con la matriz extracelular. Estas proteínas sirven como

receptores primarios en el caso de los picornavirus y adenovirus (Summerford et al., 1999).

A su vez, las lectinas se definen como proteínas de unión a carbohidratos que forman parte de las glicoproteínas y glicolípidos. En la célula, participan en procesos muy diversos como la regulación de la adhesión celular, la síntesis de glicoproteínas y la respuesta inmune. Las lectinas sirven como receptores en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el Ébola o el Dengue (Brudner et al., 2013). Curiosamente, algunos virus incluyen lectinas en su genoma que son utilizadas para acceder a las células diana gracias a su capacidad de unión a glicanos presentes en proteínas y lípidos de las células hospedadoras. Este es el caso del virus de la Influenza A (IAV) o el norovirus murino (Van Breedam et al., 2014).

Otra de las familias proteicas utilizadas habitualmente por los virus en su unión a la célula diana, son los receptores Scavenger. En la célula, estas proteínas unen una amplia variedad de ligandos para su degradación, incluyendo lipoproteínas como el LDL (PrabhuDas et al., 2017). Algunos de los virus que utilizan estas moléculas como receptores son el virus de la hepatitis C crónica (HCV) y el virus de la Vaccinia (MacLeod et al., 2015; Scarselli et al., 2002).

Los procesos de unión a la célula diana pueden ser muy complejos. Un virus que ejemplariza esta complejidad es el HCV. El virus alcanza el interior de los hepatocitos mediante su unión a factores como glucosaminoglucanos y el receptor de LDL (LDLR), que contribuyen en la concentración de las partículas virales en la superficie celular. A continuación, el virus interacciona con el receptor Scavenger llamado SR-B1, la tetraspanina CD-81, la Claudina-1 (CLDN1) y ocludina. Adicionalmente, se han identificado otros factores que median la interacción como el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor de la efrina A2 (EphA2) o el receptor de la transferrina (TfR1) y el transportador del colesterol Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Lombana, 2015; Tong et al., 2011).

### **16.2.2 Internalización del genoma viral**

Para la replicación del genoma viral es necesario que éste sea liberado en el compartimento adecuado, ya sea en el núcleo o citoplasma. Para ello, se requiere que el

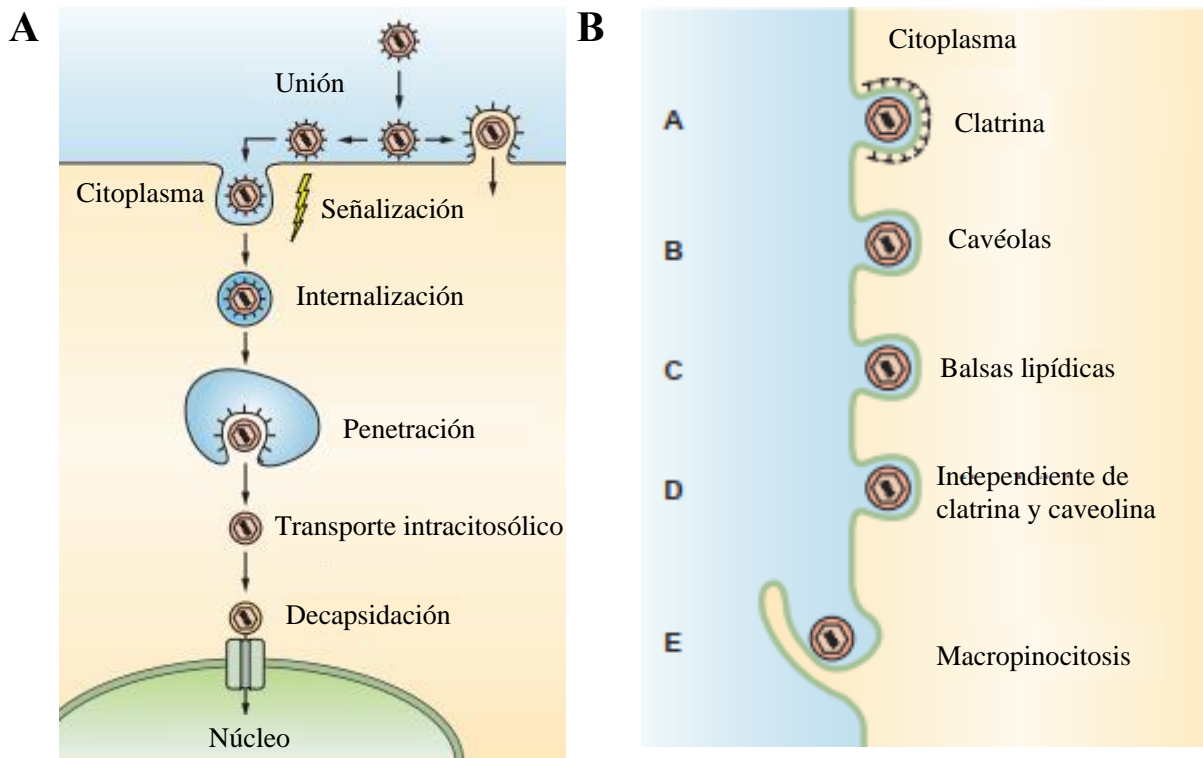
virus sea internalizado y que a continuación se produzca el desensamblaje de la cápside y el transporte del genoma viral al orgánulo donde tendrá lugar la replicación. En este apartado vamos a resumir los procesos de internalización y los mecanismos de fusión de membranas utilizados por los virus.

### **1. Internalización de los virus**

La internalización es el proceso por el cual el virus atraviesa la membrana plasmática una vez se ha unido a receptores celulares (Dimitrov, 2004; Marsh and Helenius, 2006; Yamauchi and Helenius, 2013).

Los virus con envoltura penetran al interior celular mediante la fusión de sus membranas con la membrana plasmática celular o, alternativamente, con la de un compartimento interno (Cosset and Lavillette, 2011) (**Figura 31**). El proceso de fusión está mediado por proteínas virales presentes en la envoltura llamadas proteínas de fusión. Cabe resaltar que las funciones de unión (ver siguiente apartado) y fusión pueden ser llevadas a cabo por la misma proteína o por proteínas diferentes.

En aquellos virus con envoltura que se fusionan a nivel de la membrana plasmática, la fusión de las bicapas está generalmente desencadenada por la unión del receptor y la proteína de unión viral, proceso el cual es suficiente para inducir los cambios conformacionales necesarios en la proteína de fusión. Sin embargo, cuando la fusión ocurre a otro nivel, será necesaria la internalización de la vesícula previa a la fusión. En estos casos es la acidificación del medio lo que dispara el proceso de fusión. Concretamente, el cambio en el pH induce cambios conformacionales en las proteínas de fusión, que permiten la fusión de la envoltura viral con la membrana diana. El proceso de fusión se encuentra detallado en el próximo apartado.



**Figura 31: Esquemas del ciclo vital de los virus y vías principales de penetración por endocitosis a las células hospedadoras.** **A.** Esquema del ciclo vital de los virus. La entrada de los virus a la célula implica una serie de pasos que comienzan con la unión de los viriones a los receptores de la superficie celular. Este proceso activa vías de señalización que median la internalización, que puede ocurrir mediante diferentes vías, siendo la endocitosis la más común. Los virus se transportan entonces a los diferentes compartimentos internos según su estrategia de replicación, donde se desencadena el proceso de penetración. Por último, una vez en el citosol, los virus o las cápsides alcanzan el sitio de decapsidación y replicación. **B.** Esquema de los diferentes mecanismos de endocitosis utilizados durante el proceso de entrada a la célula. La mayoría de los virus de animales entran a la célula mediante endocitosis. Los mecanismos incluyen: (A) endocitosis mediada por clatrina; (B) endocitosis mediana por cavéolas; (C) endocitosis en balsas lipídicas, independiente de caveolina; (D) mecanismos independientes de clatrina y caveolina; y (E) macropinocitosis. Figura modificada de Knipe and Howley (2013).

Los virus sin envoltura penetran en el citosol a través de las membranas de los orgánulos internos como endosomas, lisosomas o RE. Las señales que desencadenan el proceso de penetración son similares a las utilizadas por los virus con envoltura como la unión a

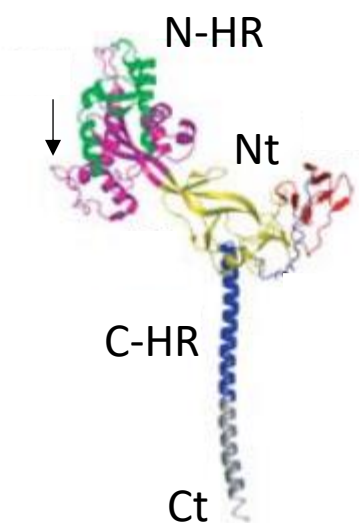


receptores, la disminución del pH. Sin embargo, estos virus, al carecer de envoltura, la penetración no ocurre mediante fusión de membranas. A pesar de que los mecanismos todavía no se conocen en su totalidad, se han descrito tres estrategias generales: la primera es la punción de la membrana, mediante el cual los virus generan poros en las membranas celulares por los que se libera el genoma al citosol. El segundo mecanismo es la perforación, proceso mediante el que la cápside penetra al citosol sin lisis celular. Por último, la lisis implica la ruptura de la membrana citoplasmática de los orgánulos, permitiendo que el virus sea liberado al citosol (Knipe and Howley, 2013).

## 2. Fusión de membranas

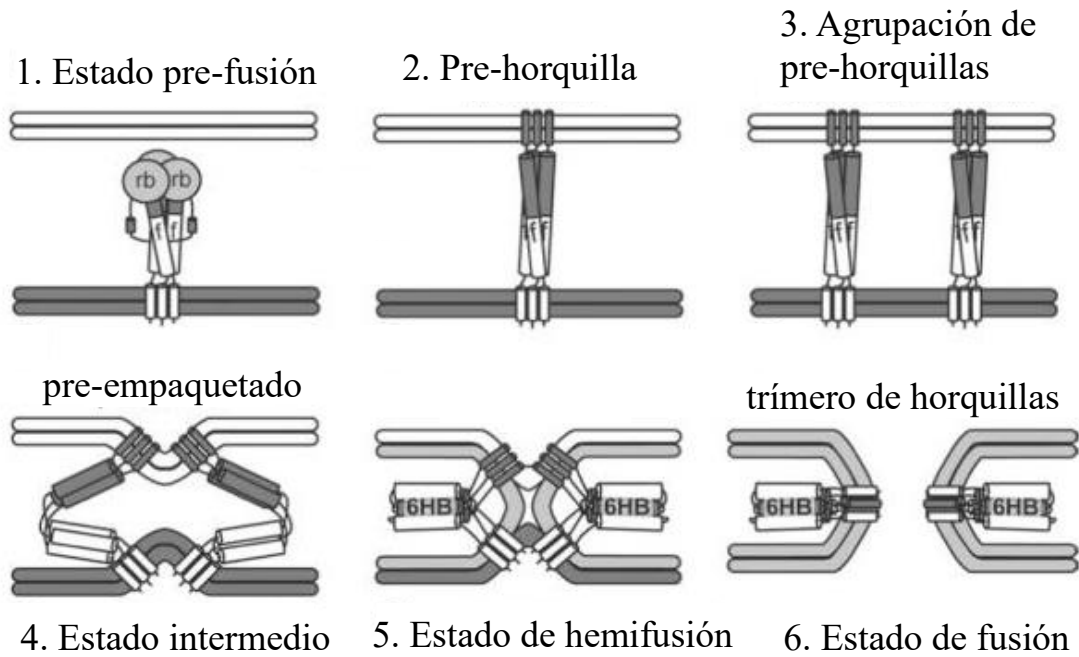
Las proteínas de fusión pueden ser agrupadas en cuatro grandes tipos en función de su estructura y mecanismo de acción.

Las proteínas de fusión de **clase I** son glicoproteínas que se asocian formando trímeros unidos de manera no covalente. Cada monómero, constituido predominantemente por  $\alpha$ -hélices (Yin et al., 2005), consta de un segmento N-terminal que contiene una región apolar llamada péptido de fusión y un segmento C-terminal con un dominio transmembrana. Adicionalmente, la proteína contiene dos regiones de heptapéptidos repetidos situadas en N-terminal (N-HR) y C-terminal (C-HR), que permiten a las proteínas asumir una estructura de horquilla necesaria para el acercamiento y fusión de las membranas; (**Figura 32 y 33**).



*Figura 32: Estructura secundaria del monómero de la proteína de fusión de clase I del virus de la Parainfluenza humana 3 (HPIV3). En la Figura se muestran las regiones N-terminal (Nt), C-terminal (Ct), las regiones de heptapéptidos repetidos en verde (N-HR) y azul (C-HR) y el péptido de fusión (flecha). Imagen modificada de Yin et al. (2005).*

Las proteínas de fusión virales de clase I son sintetizadas en la célula como moléculas precursoras. Éstas sufren un procesamiento proteolítico que da lugar a dos subunidades unidas por puentes disulfuro. La proteólisis hace que las glicoproteínas adquieran una conformación metaestable, en la que el péptido de fusión se encuentra oculto en el interior del trímero. Para que ocurra la fusión entre la membrana celular y la envuelta vírica, la proteína debe activarse y exponer el péptido de fusión. Este proceso puede iniciarse mediante la unión de la glicoproteína a su receptor celular o por el cambio de pH en el interior endosomal. La activación produce un cambio conformacional que proyecta el péptido de fusión hacia la membrana celular y permite su inserción, estadio conocido como pre-horquilla (**Figura 33, etapa 2**). En la siguiente etapa, se acumulan pre-horquillas en el sitio donde se producirá la fusión de las membranas. A continuación, la proteína de fusión se pliega, lo que resulta en la formación de una estructura de horquilla compacta y estable. La conversión de las pre-horquillas en horquillas ocurre de forma secuencial, empaquetando las regiones C-terminal con las N-terminal, seguido de la formación de un complejo entre los péptidos de fusión y los dominios transmembrana. Durante este proceso, las membranas entran en contacto y progresa hasta una hemifusión, en la que contactan las monocapas externas de las membranas (**Figura 33, etapa 5**). El último paso ocurre cuando se abren poros que permiten el paso de la nucleocápside viral al citoplasma para el inicio de la replicación (Megrian, 2017; White et al., 2008).

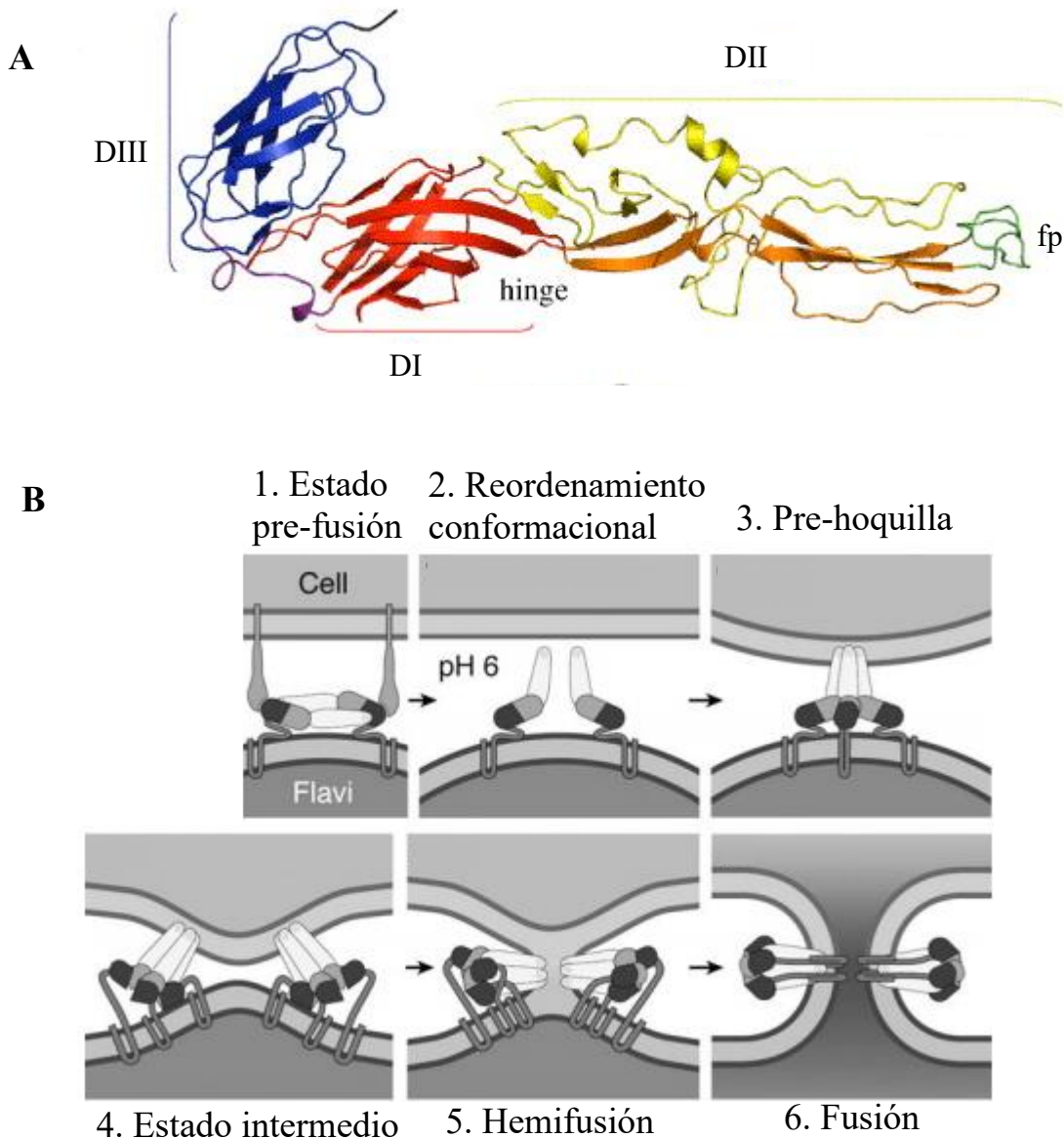


**Figura 33: Modelo para la fusión de membranas de una proteína de fusión de clase I.** Representación esquemática de la estructura de una proteína de fusión viral de clase I. En la Figura se representa la estructura de una proteína de fusión de clase I capaz de llevar a cabo la unión al receptor y la fusión de membranas. La subunidad de unión al receptor se representa como un dominio globular denominado **rb**, mientras que la subunidad de fusión se muestra con una **f**. Las membranas celular y viral corresponden a la parte superior e inferior de las imágenes respectivamente. **1.** Representación de la proteína en su estado de pre-fusión. **2.** La unión de la **rb** al receptor produce cambios conformacionales que permiten el desbloqueo del péptido de fusión y su inserción en la membrana, lo que conduce a un estado de pre-fusión metaestable, conocido como pre-horquilla. **3.** Las pre-horquillas se agrupan en el sitio de fusión de la membrana. **4.** Los dominios N y C-terminal de las pre-horquillas comienzan a empaquetarse. **5.** A medida que se produce el plegamiento de la proteína de fusión, la membrana viral y celular se aproxima alcanzándose un estado llamado de hemifusión. En este estado, la proteína trimérica adopta una estructura de horquilla en la que se observa una agrupación de seis hélices (**6HB**, 6 helix bundle). Las hélices se encuentran empaquetadas de forma antiparalela con las tres hélices del extremo C-terminal y situadas entre los surcos formados por las tres hélices del N-terminal. **6.** Esta estructura es la que conduce a la unión de las membranas celulares y virales produciendo el poro de fusión. El modelo muestra una proteína de fusión de clase I, aunque los pasos 4, 5 y 6 son comunes en el

*caso de las clases II y III (ver siguientes apartados). Figura modificada de White et al. (2008).*

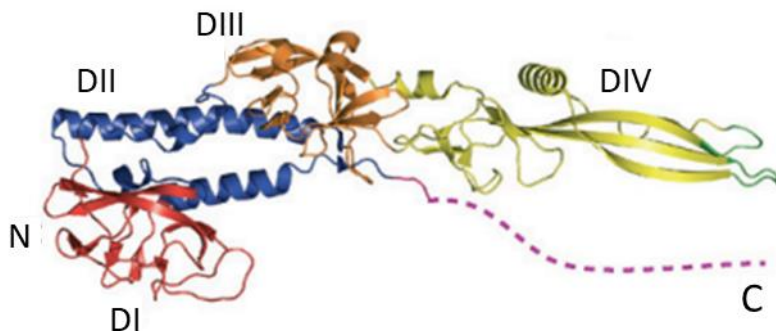
Las proteínas de fusión de **clase II** constan de una estructura característica formada por tres dominios globulares compuestos principalmente por láminas  $\beta$  (**Figura 34A**). El dominio I, formado por ocho barriles  $\beta$ , se localiza entre el dominio II y III. El dominio II, formado por doce láminas  $\beta$  y dos  $\alpha$  hélices contiene el bucle (*loop*) de fusión. Este bucle será el encargado de insertarse en la membrana de la célula hospedadora promoviendo la trimerización de la proteína y la fusión entre las membranas celular y viral. Por otro lado, el dominio III contiene un segmento transmembrana (anclado a la membrana viral) además de diez láminas  $\beta$  que participan en la unión a los receptores celulares (**Figura 34A**). A diferencia de las proteínas de clase I, las de clase II se encuentran en forma monomérica en la superficie viral y sólo trimerizan durante el proceso de fusión (Modis, 2013).

El modelo para la fusión de membranas es el siguiente (**Figura 34B**): tras el reconocimiento y unión a la célula hospedadora, el virus es endocitado. Seguidamente, las condiciones de pH del endosoma estimulan reordenamientos conformacionales que exponen el bucle de fusión, previamente no expuesto, lo que permite su inserción en la membrana celular. Tras la inserción se produce la trimerización de la proteína, alcanzándose un estado intermedio conocido como pre-horquilla (**Figura 34B, etapa 3**). Al igual que en las proteínas de clase I la proteína de fusión se pliega sobre sí misma dirigiendo el bucle de fusión hacia el segmento transmembrana situado en C-terminal dando lugar a un estado de hemifusión (**Figura 34B, etapa 5**). Finalmente, se forman contactos entre el bucle de fusión y el dominio transmembrana, lo que conduce a la fusión de las membranas (Kielian, 2006; Modis, 2013).



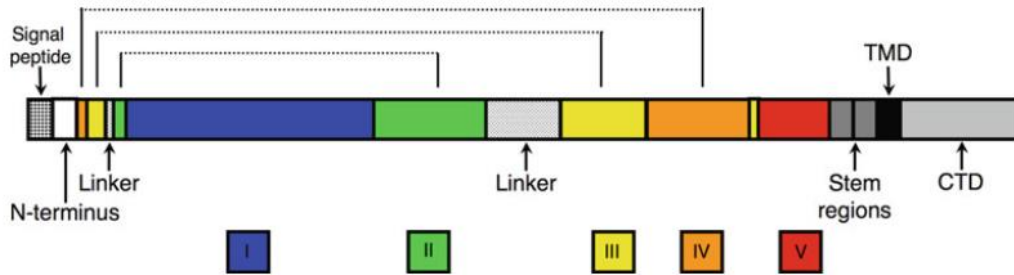
**Figura 34: Estructura secundaria y mecanismo de fusión modelo para las proteínas de fusión de clase II.** **A.** Estructura pre-fusión del monómero de una proteína de fusión de clase II, se muestran el dominio I en rojo, el dominio II en amarillo y naranja, el dominio III en azul y el bucle de fusión (fp) en verde. **B.** Mecanismo de fusión propuesto para las proteínas de fusión de clase II. **1.** El virus se une al receptor de la célula hospedadora. **2.** El virus se internaliza en el endosoma, donde debido al pH ocurre un reordenamiento que exponen el bucle de fusión. **3.** El bucle de fusión se inserta en la membrana del hospedador, promoviendo la trimerización. **4.** Los trímeros interactúan de forma cooperativa para distorsionar las membranas del virus y hospedador. **5.** La fusión se realiza tras un paso de hemifusión transitoria que junta las membranas externas celular y viral. **6.** Las membranas celular y vírica se fusionan y se abre el poro de fusión. Imagen modificada de Kielian (2006) y Modis (2013).

Las proteínas de fusión de **clase III** presentan cinco dominios en su estructura terciaria (**Figura 35**). Como se representa en la **Figura 36**, el dominio I presenta el péptido de fusión, organizado en dos bucles, mientras que el dominio V ancla la proteína a la membrana viral mediante el segmento transmembrana (Backovic and Jardetzky, 2011; Galdiero et al., 2012).



**Figura 35:** Estructura secundaria para la proteína de fusión de clase III del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Los dominios se encuentran coloreados: el dominio I en rojo, el dominio II en azul, el dominio III en naranja, el dominio IV en amarillo y el dominio C-terminal (también llamado dominio V) en magenta. Imagen modificada de Roche et al., 2008.

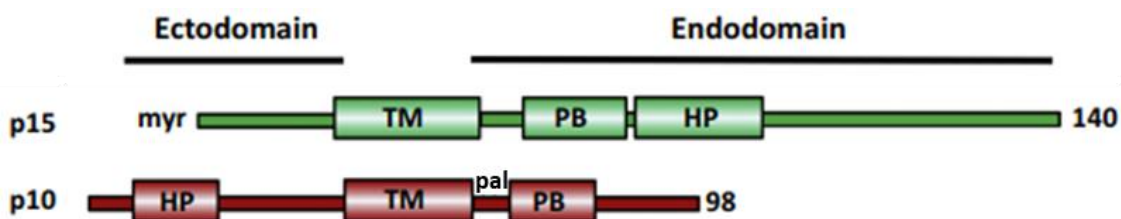
La proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) representa uno de los ejemplos de proteína tipo III mejor estudiados, habiéndose revelado sus estructuras pre y post fusión (Roche et al., 2008). Al igual que las proteínas del tipo I y a diferencia de las del tipo II esta proteína se encuentra en un estado trimérico pre- y post-fusión. Sin embargo, tal y como ocurre en las clases I y II, se ha observado que el péptido de fusión no se encuentra expuesto en su estado pre-fusión. En el caso de la proteína G del VSV las reorganizaciones estructurales previas a la fusión se deben a cambios en el pH una vez el virus se encuentra en el interior endosomal. El dominio I y II rotan debido a modificaciones en la estructura secundaria de las regiones bisagra que se encuentran entre ambos dominios. Estos cambios permiten el acercamiento de los bucles de fusión y del segmento transmembrana. Todo ello, indica un proceso de fusión mediado por una estructura de tipo horquilla como el ya explicado en las proteínas de fusión de clase I y II (Harrison, 2015; Roche et al., 2008).



**Figura 36: Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas de fusión de clase III.** En la Figura se muestra el dominio I (azul) embebido en el dominio II (verde). Éste, se encuentra situado dentro del dominio III (amarillo), que a su vez se inserta en el dominio IV (naranja). El dominio V (rojo) se encuentra cercano al dominio C-terminal. Los linkers corresponden a regiones flexibles necesarias para permitir los cambios conformacionales. TMD designa al dominio transmembrana y el CTD al dominio C-terminal. Imagen de Backovic and Jardetzky (2011).

En este apartado incluimos las proteínas conocidas como proteínas de fusión de **clase IV**, o proteínas FAST (*Fusion-Associated Small Transmembrane proteins*). Estas proteínas sólo se encuentran codificadas por los virus de la familia *Reoviridae*, un virus que carece de envoltura lipídica. No participan, por lo tanto, en el proceso de fusión de la membrana celular y viral, sino que inducen la fusión entre la membrana de dos o más células infectadas dando lugar a un sincitio que facilita la dispersión viral.

Estructuralmente, difieren de las proteínas de fusión descritas hasta ahora en que no forman trímeros ni horquillas. Las proteínas FAST se componen de un ectodominio N-terminal, un endodominio C-terminal y un dominio transmembrana. Además, todas las proteínas FAST son modificadas post-traduccionalmente en residuos de glicina localizados en el extremo N-terminal que pueden ser miristoilados o residuos de cisteína proximales a la membrana que pueden ser palmitoilados (**Figura 37**). Estas modificaciones son importantes para iniciar las interacciones entre la proteína de fusión y membrana celular y así inducir la mezcla entre lípidos necesaria para la fusión de membranas. El ácido mirístico tiene la característica de promover la inserción de forma reversible en la bicapa lipídica, mientras que la palmitoilación produce alteraciones en el empaquetamiento de los lípidos en la membrana, lo que se necesita para facilitar la inducción de la fusión de membranas (Ciechonska and Duncan, 2014; Shmulevitz et al., 2003).



**Figura 37: Motivos estructurales de las proteínas FAST p15 del reovirus baboon (BRV) y p10 del Reovirus aviar (ARV).** HP, zona hidrofóbica; TM, dominio transmembrana; PB, región polibásica; myr, meristoilación; pal, palmitoilación. Se muestra en la imagen el número de aminoácidos de cada proteína. Imagen modificada de (Ciechonska and Duncan, 2014).

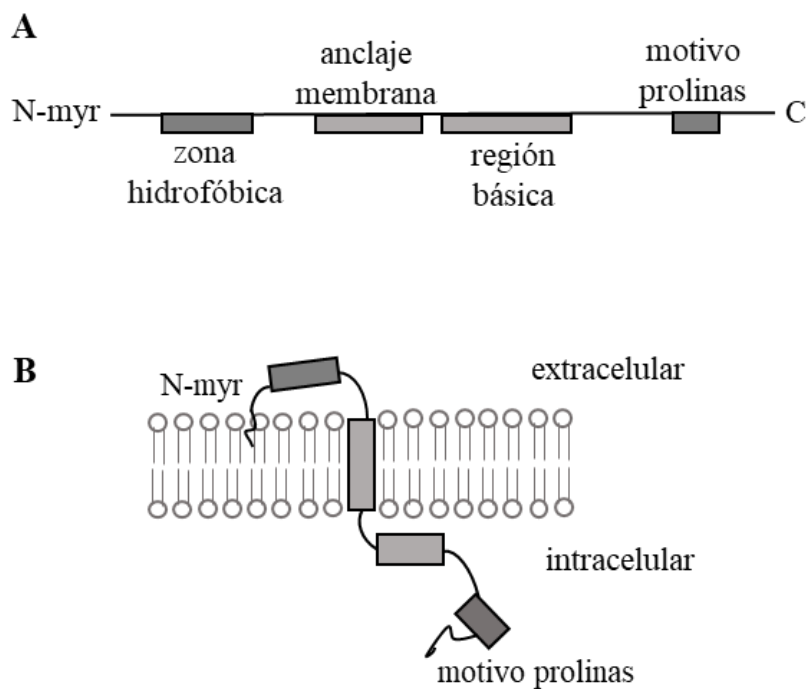
La fusión de membranas mediada por las proteínas FAST se divide en tres etapas que consisten en la pre-fusión, donde ocurre la unión de las membranas celulares, la fusión de membranas en la que se mezclan los lípidos de las membranas y se produce la formación de poros y la post-fusión, en la que ocurre la sincitogénesis.

En el caso de los fusógenos de clase IV, los péptidos de fusión son diversos, por ejemplo, en la proteína p14 del orthoreovirus reptiliano (RRV) consiste en un motivo hidrofóbico (HP) localizado en el ectodominio y compuesto por un alto porcentaje de glicina y alaninas y un N-terminal no miristoilado; en p10 del orthoreovirus aviar (ARV) y del murciélago (NBV) consiste en un HP compuesto por un motivo moderadamente hidrofóbico flanqueado de cisteínas no miristoilado; y en p15 del orthoreovirus del babuino (BRV) en una hélice de poliprolinas miristoilada. Los HP, actúan como péptidos de fusión insertándose en la membrana de la célula no infectada cuando se sitúan en ectodominios. Cuando se localizan en el endodominio, no actúan como péptidos de fusión, dado que se encuentran en el lado citosólico de la membrana, sino como regiones facilitadoras del proceso de fusión, ya que disminuyen la barrera energética para la curvatura de la membrana plasmática (Clancy and Duncan, 2011; Read et al., 2015).

Las proteínas FAST se anclan a la bicapa lipídica de la célula infectada mediante el segmento transmembrana, mientras que los péptidos de fusión o del ácido mirístico presentes en el ectodominio se insertan en la membrana celular diana (**Figura 38**). En el caso de las proteínas de fusión de clase IV, el proceso de fusión no se desencadena por la unión al receptor o el pH del medio, sino por la acumulación de proteínas FAST en la membrana plasmática (Clancy et al., 2010).



La inserción del péptido de fusión en la membrana externa de la bicapa celular, induce una curvatura, generando un proceso de hemifusión similar al descrito para las anteriores proteínas de fusión. La expansión del poro en la etapa post-fusión para formar un sincitio es dependiente de la anexina A1. La interacción de la anexina con los endodominios de las proteínas FAST altera la dinámica y polimerización de la actina, promoviendo la expansión del poro y la formación del sincitio (Ciechonska and Duncan, 2014; Kanai et al., 2019).



**Figura 38: Topología de las proteínas FAST en la membrana de la célula infectada.** Motivos estructurales (A) y modelo de inserción (B) de la proteína FAST p14 del orthoreovirus reptiliano (RRV). Se muestra la ubicación de la secuencia de miristoilación (N-my), el anclaje de membrana, la región polibásica y la región de poliprolinas. Imagen modificada de Corcoran et al. (2004).

### 3. Desensamblaje de la cápside

El proceso de replicación viral implica un paso de desensamblaje de la cápside que permita la liberación del genoma. Este proceso depende de estímulos provenientes de la célula hospedadora. Estas señales se pueden categorizar en estímulos basados en receptores, en señales químicas y mecánicas (Kilcher and Mercer, 2015; Suomalainen and Greber, 2013).

En el caso de los virus sin envoltura las señales para la decapsidación pueden ocurrir en el espacio extracelular o al entrar en contacto con los receptores celulares. En el caso de los virus con envoltura se produce la pérdida de la cápside después de la fusión de membranas, lo que ocurrirá necesariamente en el interior de la célula.

Algunos virus, tanto de DNA como de RNA, se replican en el núcleo. En estos casos, la decapsidación se puede producir en el citosol y a continuación el genoma es transportado al núcleo para su replicación, mientras que en otros la decapsidación ocurre, o bien acoplada al proceso de transporte del genoma a través de los poros nucleares o bien, una vez la cápside atraviesa el núcleo (Cohen et al., 2011; Greber and Fassati, 2003).

### **16.2.3 Replicación del genoma viral**

Después de la penetración, el genoma puede ser transportado al núcleo o permanecer en el citosol según la estrategia de replicación viral. A continuación, se explican generalidades de la replicación de los virus que contienen DNA y RNA, aunque hay que resaltar que existen virus que siguen mecanismos de replicación diferentes.

#### **1. Replicación de los virus de RNA**

La replicación del RNA a partir de un molde de RNA, es un fenómeno único en virus. Los virus de RNA se pueden dividir entre los de cadena positiva, negativa y de doble cadena, así mismo los genomas de RNA pueden ser de simple (ss) o doble (ds) cadena (ver apartado **I6.1**), aunque es cierto que estos últimos son mucho menos abundantes.

##### *Virus con genoma de +ssRNA*

En aquellos virus con un genoma de +ssRNA el ácido nucleico puede actuar directamente como RNAm. La traducción dará lugar a una poliproteína viral que será escindida en múltiples proteínas funcionales. Para permitir que el RNA de sentido positivo se replique y dé lugar a copias nuevas del genoma viral, se deberá sintetizar la hebra negativa complementaria, la cual servirá como molde para la producción de nuevas hebras positivas de RNA.

Existen familias de virus con variaciones en su replicación. Un ejemplo es el caso de los retrovirus, que presentan RNA de cadena sencilla y positiva, sin embargo, su genoma se transcribe a DNA de doble cadena mediante la enzima transcriptasa reversa (RT). Esta enzima es una DNA polimerasa dependiente de RNA codificada por el virus. Este dsDNA se integra en el genoma del hospedador y sirve de molde para la síntesis de RNAm y para nuevas hebras de RNA de sentido positivo que participarán en la formación de nuevos viriones (Harwig et al., 2017; Louten, 2016; Strauss and Strauss, 1983).

#### *Virus con genoma de -ssRNA*

En los virus -ssRNA el genoma servirá como molde para sintetizar +RNA (RNAm). Este proceso tiene lugar mediante la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). Estas polimerasas se encuentran codificadas por el genoma viral, ya que en las células hospedadoras no existen polimerasas equivalentes. Estos +RNA pueden tener una longitud equivalente al genoma viral (se conocen como genómicos) o equivalente a cada una de las pautas de lectura de las diferentes proteínas virales (sub-genómicos). Mientras que los +RNA genómicos servirán como molde para la producción de RNA genómico de sentido negativo, los sub-genómicos actuarán como mRNA de cada una de las proteínas virales.

El genoma de -ssRNA puede ser una molécula única o estar segmentado. En este último caso, el genoma se encuentra dividido en múltiples partes y, generalmente, cada segmento codifica para una proteína diferente (Harwig et al., 2017; Louten, 2016; Strauss and Strauss, 1983).

#### *Virus con genoma de dsRNA*

Los virus de RNA de doble cadena tienen el genoma segmentado. En este caso, la hebra negativa es utilizada como molde para la síntesis del RNAm. Después de la traducción, el +RNA monocatenario se ensambla parcialmente junto a las proteínas virales en lo que se conoce como viriones inmaduros. La transcripción del +RNA monocatenario a bicatenario ocurre dentro de los viriones mediante la actuación de una RdRP viral (Louten, 2016).

## 2. Replicación de los virus de DNA

La transcripción de los virus de DNA ocurre en el núcleo (excepto en el caso de los poxvirus) utilizando en la mayoría de los casos la maquinaria celular para la síntesis del RNAm. Sin embargo, hay virus que codifican para sus propias polimerasas (Louten, 2016; Murray, 2013).

La replicación del DNA viral sigue las mismas rutas bioquímicas que en el caso del DNA celular. Así pues, la transcripción de los genes virales se regula por la interacción de proteínas específicas de unión al DNA que son codificadas por el genoma viral, como son elementos promotores y potenciadores (*enhancers*). Estos elementos son similares a los de la célula hospedadora y permite la unión de factores de activación transcripcional y de la RNA polimerasa celular. La RNA polimerasa sintetizará el RNAm viral que será posteriormente traducido dando lugar a las proteínas virales.

De la misma forma que ocurre en la célula, la síntesis del DNA viral es semiconservativa. Esto implica que cada hebra de DNA sirve como molde para una cadena complementaria. La síntesis del DNA se inicia en una región denominada origen de replicación. Esta secuencia es reconocida por múltiples factores celulares y/o virales incluyendo la DNA polimerasa y dará lugar al DNA genómico viral.

La mayor parte de los virus de DNA conocidos son de doble cadena, aunque también han sido descritos virus de cadena sencilla (ssDNA). El ciclo de replicación de los virus de ssDNA es similar al de dsDNA, pero con un paso adicional en el que el genoma será convertido a una molécula de dsDNA que servirá como molde para sintetizar el RNAm, que servirá de molde para la traducción de las proteínas virales.

### 16.2.4 Síntesis proteica y su procesamiento postranscripcional

La traducción de las proteínas virales y su procesamiento postraduccional, se realiza empleando la maquinaria celular, sin embargo, muchos de los virus han evolucionado para incorporar diferentes herramientas que les permiten inhibir la síntesis de proteínas del hospedador, promoviendo de esta manera la síntesis de proteínas virales.

Por ejemplo, los picornavirus codifican para una proteasa llamada 2A-pro que escinde el factor de iniciación de la traducción eIF4G en su N-terminal. El fragmento C-terminal de

eIF4G, ahora escindido, se une con mayor afinidad a los RNAm víricos que a los celulares, iniciando la traducción de las proteínas virales de manera independiente de la caperuza (cap) (Schneider and Mohr, 2003).

Otro ejemplo, es el virus del herpes simplex (HSV), en este caso la proteína vhs (*virion host shutoff*) limita la expresión génica en las células infectadas desestabilizando los RNAm celulares del complejo de iniciación (Cuesta et al., 2000).

Una vez el proceso de traducción ha tenido lugar, algunas proteínas virales requieren modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, glicosilaciones, acilaciones o sulfataciones entre otras. Estas modificaciones son importantes para modular, activar o reprimir la actividad de las proteínas virales.

### **16.2.5 Ensamblaje, formación y liberación de las partículas virales**

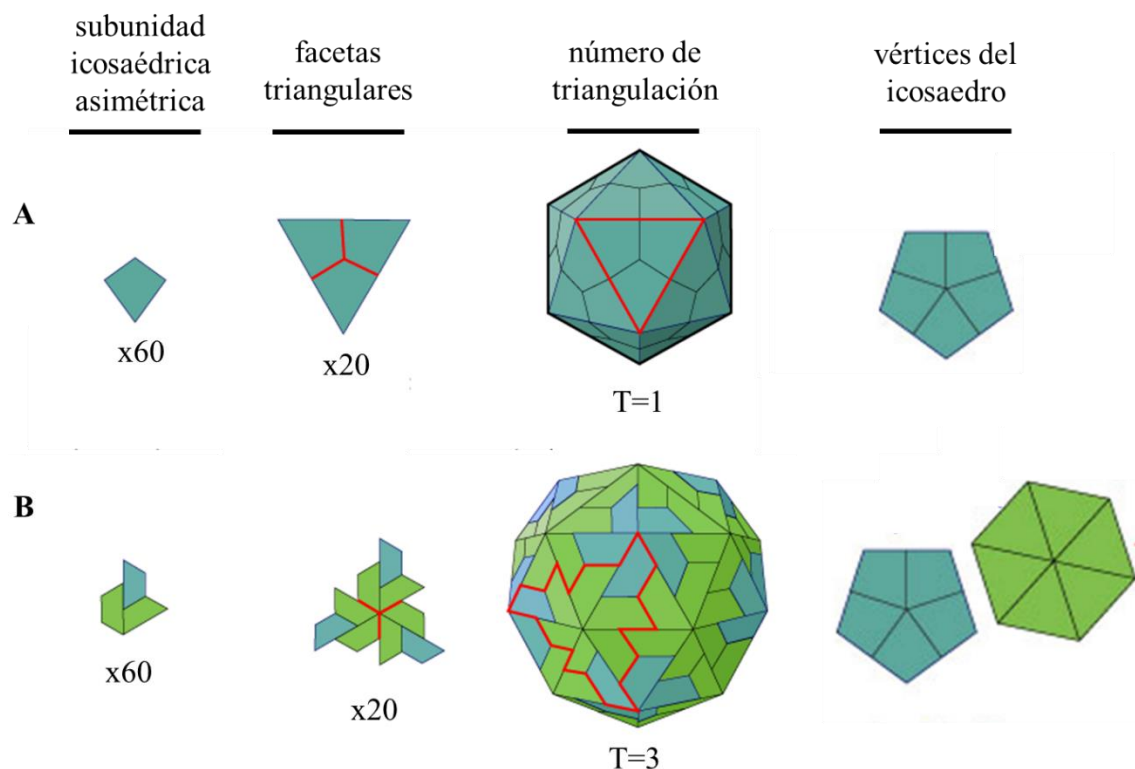
#### *Estructura de las partículas virales*

Tal y como se ha explicado en el apartado **I6**, las partículas virales se componen de un ácido nucleico y una cápside que en ocasiones pueden estar rodeadas por una envoltura. Las cápsides son estructuras proteicas simétricas que protegen el material genético y que actúan como vehículos de transporte para llevar el genoma hasta la célula hospedadora. La cápside está formada por grupos de proteínas denominados capsómeros, que se repiten para dar lugar a estructuras geométricas. A su vez, las unidades que componen los capsómeros son llamadas protómeros.

Las cápsides se clasifican según su estructura en icosaédricas, helicoidales y mixtas (Condit et al., 2006; Katen and Zlotnick, 2009; Perlmutter and Hagan, 2015; Prasad and Schmid, 2012):

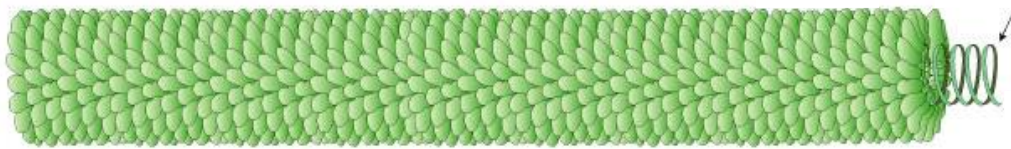
**1. Cápsides icosaédricas:** la mayoría de las cápsides virales son icosaédricas, ya que su estructura presenta una ratio volumen:superficie muy elevada. Este tipo de cápside se forma mediante al menos tres subunidades idénticas que forman un total de 20 caras triangulares, utilizándose, por lo tanto, un total de 60 capsómeros (3 proteínas x 20 facetas = 60 proteínas). Como se aprecia en la **Figura 39A**, en estos virus icosaédricos se forman pentámeros en los vértices, producto de la unión de cinco capsómeros vecinos.

Así mismo se han descrito cápsides con más de 60 subunidades. La teoría de la casi-equivalencia explica la forma mediante la que se construyen icosaedros más grandes en el que las subunidades no se distribuyen simétricamente. Esta teoría explica cómo los virus utilizan las subunidades formando pentones y hexones (o hexámeros) para rellenar una geometría icosaédrica (Caspar and Klug, 1962). Los virus forman pentámeros que se ensamblan en los vértices del icosaedro, mientras que los hexámeros rellenan las caras y los vértices de los icosaedros más grandes (**Figura 39B**).



**Figura 39: Modelo de cápsides icosaédricas con número de triangulación (T) 1 (A) y 3 (B).** La teoría de Caspar y Klug se basa en que las cápsides icosaédricas se componen de 60 subunidades idénticas organizadas en 20 facetas triangulares que forman las caras de un icosaedro. Así, T hace referencia al número de proteínas en que se dividen las facetas triangulares. Para  $T=1$ , 20 facetas por 3 proteínas = 60 y por lo tanto 60 dividido por 60 subunidades es igual a 1. Para  $T=3$ , 20 facetas por 9 proteínas que las componen = 180, por lo que 180 dividido 60 subunidades es igual a 3. Se muestran en la Figura la geometría de los vértices para cada caso que consta de pentones en el caso de la cápside  $T=1$  y de pentones y hexones para la cápside  $T=3$ . Imagen adaptada de <https://viralzone.expasy.org>.

**2. Cápsides helicoidales:** los virus filamentosos se componen de un solo tipo de capsómero que se encuentra apilado alrededor de un eje central. Así, se forma una estructura helicoidal en cuyo interior se encuentra el genoma (**Figura 40**). La cápside adquiere entonces una forma simétrica, cilíndrica, alargada y flexible. Algunas ventajas que permiten este tipo de estructura es que sólo se requiere un tipo de proteína que se repite hasta formar la cápside completa. Por lo tanto, esta estructura requiere menos energía libre para ensamblarse que una cápside formada por varios tipos de proteína. Además, sólo es necesario un gen para codificar la proteína estructural de la nucleocápside, por lo que se reduce la longitud del ácido nucleico. Una última ventaja es que una estructura de este tipo puede empaquetar genomas más grandes ya que la capsíde puede variar de longitud en función del tamaño del genoma (Caspar and Klug, 1962).



**Figura 40: Modelo de cápside helicoidal.** Las cápsides helicoidales se ensamblan alrededor de DNA o RNA genómico viral (flecha) haciendo que el ensamblaje de los viriones y el empaquetamiento del genoma se produzcan al mismo tiempo. Imagen adaptada de [https://viralzone.expasy.org/51?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species).

**3. Cápsides mixtas:** existen virus con estructuras en sus cápsides que no se pueden categorizar en helicoidales o icosaédricas. Ejemplos de ello son los poxvirus, que forman partículas ovales o con forma de ladrillo (Burrell et al., 2017). Por su parte, los geminivirus están formados por dos cabezas icosaédricas unidas por una de sus caras (Hesketh et al., 2018). Mientras que, en el caso de los bacteriófagos, las cápsides están constituidas por una cabeza icosaédrica unida a una cola cilíndrica (Cuervo and Carrascosa, 2012).

### *Ensamblaje y liberación de los viriones*

El proceso de replicación finaliza con la salida de los viriones de la célula hospedadora. Para ello, los virus utilizan proteínas y procesos celulares tales como sistemas de transporte intracelular, chaperonas o exportinas que permiten a los viriones salir del núcleo.

Previamente a la liberación de los viriones, éstos deben ensamblar sus diferentes componentes. Este proceso tiene unos pasos comunes para todos los virus, como son la formación de la cápside, el empaquetamiento del ácido nucleico viral dentro de ella y la unión de las proteínas virales entre sí. Sin embargo, los virus con envoltura, deben, además, adquirir su membrana lipídica, proceso que puede ocurrir después o al mismo tiempo que el ensamblaje de la cápside mediante un proceso llamado gemación (*budding* en inglés).

En gran parte de los casos, la gemación ocurre en la membrana plasmática. Durante este proceso, la membrana plasmática se adhiere a la cápside viral a través de interacciones mediadas entre las proteínas de la cápside y la bicapa lipídica.

Se ha observado que, con excepción de la membrana mitocondrial, todas las membranas de la célula pueden servir como sitio de gemación para los virus. Por ejemplo, la maduración de los herpesvirus ocurre mediante gemación en la membrana nuclear interna, mientras que los coronavirus geman en el RE y los bunyavirus en el complejo de Golgi.

Cuando el proceso de gemación ocurre en la membrana plasmática, los viriones se liberan al espacio extracelular, como en el caso de los paramyxovirus, alfavirus o retrovirus. Pero en el caso de que la salida de los viriones ocurra en las membranas intracelulares, la liberación requiere el transporte de los viriones en vesículas hasta la superficie celular. Esta etapa depende del transporte secretor celular y es regulada por el virus.

Un ejemplo de cómo los virus se liberan al espacio extracelular lo encontramos en los retrovirus, estos presentan dominios específicos en las proteínas virales llamados dominios tardíos o dominios L. Estas secuencias son las responsables de reclutar la maquinaria ESCRT o proteínas asociadas a la maquinaria ESCRT, empleada habitualmente por la célula para funciones la formación de vesículas. Este último caso



permite la liberación de los viriones mediante fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Hurley et al., 2010; Sundquist and Krausslich, 2012).

Sin embargo, en los virus sin envoltura, el método para liberar las partículas virales es, generalmente, la lisis celular. Este proceso consiste en la disrupción de las membranas celulares, lo que termina en la muerte celular y la liberación de los componentes citoplasmáticos y las partículas virales al espacio extracelular.

El proceso de lisis celular está regulado por el virus. Por ejemplo, algunos virus codifican para viroporinas. Éstas son unas proteínas pequeñas e hidrofóbicas que forman canales en la membrana celular. Esto permite modificar la permeabilidad de la membrana celular a iones y pequeñas moléculas facilitando así la lisis celular. Un ejemplo de virus no envuelto que utiliza viroporinas para la liberación de los viriones es el SV40 (Raghava et al., 2011).

Las viroporinas tienen diversas funciones en las diferentes etapas del ciclo vital, más allá de la liberación de viriones al medio como puede ser facilitar la penetración del genoma viral en la célula o participar en la replicación del genoma (Giorda and Hebert, 2013). Esto hace que se puedan encontrar viroporinas en virus con envoltura, como es el caso de los alfavirus (Sanz et al., 2005).

## **17. La importancia de estudiar los virus**

La virología es importante por una amplia variedad de razones. Algunas razones están relacionadas con la salud humana, de animales y plantas, ya que todos los organismos vivos tienen parásitos virales. Además, la replicación viral está íntimamente relacionada con la estructura, el metabolismo y la maquinaria bioquímica de la célula, por lo que la investigación con virus ha permitido ampliar nuestros conocimientos sobre biología molecular y bioquímica. Por último, más recientemente los virus se han empleado como herramientas biotecnológicas para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer o en agricultura como tratamiento contra plagas (Enquist, 2009; Imperiale and Casadevall, 2015).

### *El impacto de los virus en la salud humana*

El impacto de los virus sobre la salud pública es enorme. Sirva de ejemplo el hecho de que más de 33 millones de personas en todo el mundo viven hoy en día con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De igual modo, la mitad de las personas sexualmente activas se infectan con el virus del papiloma humano (VPH) en algún momento de sus vidas (Diamond et al., 2016). El VPH está relacionado con cáncer de cérvix vagina, vulva, pene, ano y orofaringe (Frazer, 2004) y, de hecho, el 99% de los casos de cáncer de cuello útero están vinculados con la infección por VPH.

La investigación con virus permite el desarrollo de vacunas y medicamentos antivirales. Sin embargo, carecemos de medicamentos o vacunas efectivas para numerosas enfermedades virales por lo que la investigación y mejora de los mismos es una prioridad en la investigación en salud humana.

#### **I7.1 Tratamientos profilácticos (vacunación)**

La vacunación, principal método para prevenir enfermedades virales, tiene un importante impacto sanitario, económico y social, ya que reduce costes en la salud pública, disminuyendo la pérdida de productividad laboral y contribuyendo al desarrollo social y económico (Mirelman et al., 2014; Rémy et al., 2015). A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la investigación, no existen vacunas eficaces contra todos los virus. Un ejemplo de ello es el virus de la hepatitis C (HCV), donde, la alta tasa de mutación de su genoma, sumada a las grandes diferencias entre los genotipos de HCV y a la falta de un modelo animal adecuado para ensayar la eficacia de las vacunas en desarrollo, han provocado que todavía no exista una vacuna para su control (Smith, 2004; Walker and Grakoui, 2015; Zingaretti et al., 2014).

Existen varios métodos para la preparación de vacunas, pudiendo contener como antígenos virus atenuados (debilitados o alterados), inactivados o fragmentos del patógeno.

Un método alternativo para la generación de vacunas, se basa en la utilización de las conocidas como partículas similares a virus (VLP, del inglés *Virus Like Particles*). Las

VLPs son estructuras que imitan la organización y composición de los virus, pero carecen del genoma viral, por lo que no son infecciosas. Por lo tanto, las VLPs no requieren atenuación o inactivación. Esta variación en el proceso de elaboración de la vacuna es importante, dado que los tratamientos de atenuación pueden producir la modificación de los epítomos virales reduciendo la eficacia de la vacuna.

Las VLPs pueden estar compuestas por una o más proteínas estructurales e incluso contener envuelta lipídica. A pesar de ser incapaces de replicarse, pueden estimular el sistema inmune. De hecho, las VLPs inducen no sólo la respuesta humoral en el hospedador, sino también la celular, algo que no es común en las vacunas de subunidades (Zhang et al., 2009). Esta elevada inmunogenicidad se debe a que las VLPs presentan los epítomos de manera parecida a los virus naturales y a su naturaleza repetitiva (Jennings and Bachmann, 2007; Naskalska and Pyrc, 2015; Zhao and Frazer, 2002). Así, al imitar la estructura del virus nativo y la manera que éste es presentado, se mejora la reactividad de los antígenos y la respuesta del sistema inmune (Roldão et al., 2010).

Existen diversos sistemas de expresión para la producción de las VLPs como son células de *E. coli*, levadura, células de insecto, de mamífero o de plantas, que son empleados teniendo en cuenta según las necesidades específicas de cada una de las vacunas generadas (Fuenmayor et al., 2017).

Para la generación de estas partículas los genes que codifican para las proteínas virales que darán lugar a las VLPs se introducen en la célula huésped mediante transfección de plásmidos (estable o transitoria) o transducción viral (como con retrovirus, lentivirus, adenovirus o baculovirus). Las proteínas virales expresadas son capaces de ensamblarse de forma espontánea dando lugar estructuras similares a los viriones de una infección viral en ausencia del genoma viral.

## **17.2 Tratamientos terapéuticos (medicamentos antivirales)**

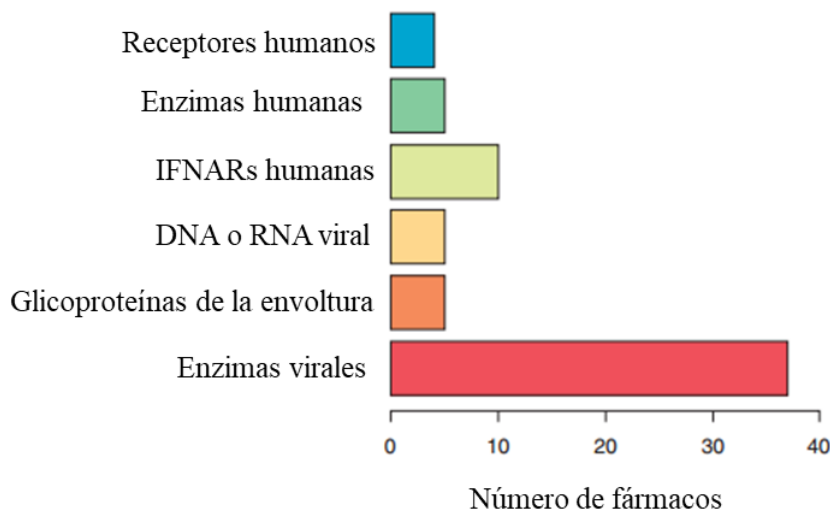
Al igual que en el caso de las vacunas, los fármacos antivirales han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las infecciones virales. Sin embargo, el número de virus para el cual tenemos un tratamiento específico es muy reducido.

Los fármacos antivirales pueden ser de dos tipos (Amarelle et al., 2017; Cagno et al., 2018; Furuta et al., 2013; Soriano, 2015; Zhu et al., 2015):

1. Específicos de virus, que tienen como objetivo la inhibición de la acción de una proteína viral, también llamados DAA (*Direct- Acting Antivirals*). La ventaja de estos medicamentos es que, al estar dirigidos contra proteínas virales, tienen, potencialmente, una elevada efectividad y una toxicidad baja. Sin embargo, este tipo de compuestos tienen mayores probabilidades de presentar resistencias debido a la alta tasa de mutación de los virus. Es por eso que de ser posible suelen administrarse en combinación con otros fármacos antivirales (Strasfeld and Chou, 2010).

Los DAA pueden ser específicos de un único virus, como en el caso de la enfuvirtida, la cual se une a la glicoproteína gp41 del HIV impidiendo la entrada del virus en la célula. Asimismo, los DAA también pueden ser de amplio espectro, los cuales permiten controlar la infectividad de un amplio rango de virus interviniendo sobre procesos comunes a todos ellos. Un ejemplo de este tipo de antivirales sería el favipiravir, actualmente en fase 2 experimental (<https://clinicaltrials.gov/>). Este compuesto inhibe la RNA polimerasa dependiente de RNA, resultando efectivo contra virus tales como el IAV, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla, algunos arenavirus, enterovirus o paramyxovirus.

2. Antivirales dirigidos contra proteínas del hospedador. Este tipo de compuestos, algunos de los cuales ya se han estudiado en ensayos clínicos, actúan interrumpiendo las rutas que utilizan los virus durante su ciclo vital (**Figura 41**). Este tipo de antivirales presenta diversas ventajas. Por un lado, aumentan la cantidad de posibles dianas terapéuticas y, por lo tanto, de potenciales fármacos. Además, podría actuar como antivirales de amplio espectro debido a que numerosos virus utilizan las mismas vías celulares. Finalmente, debido a que estos medicamentos están dirigidos contra proteínas celulares teóricamente la aparición de resistencias disminuye en comparación con los antivirales clásicos. Es importante resaltar que este tipo de antiviral puede utilizarse en combinación con los fármacos dirigidos contra proteínas virales, aumentando la eficacia del tratamiento y retrasando aún más la aparición de resistencias (de Chassey et al., 2014; Lin and Gallay, 2013; Ortega and Rangel, 2013).



**Figura 41: Distribución de fármacos antivirales aprobados por la FDA de acuerdo a la naturaleza de su diana: receptores humanos, enzimas humanas, receptores humanos del interferón tipo I, material genético viral, glicoproteínas de la envuelta viral y enzimas virales. Imagen de de Chassey et al. (2012).**

Un ejemplo de este tipo de antiviral es el dirigido contra la proteína celular TSG101, utilizada como diana antiviral. TSG101 regula el proceso de salida de algunos virus con envoltura, como el HIV y el Ébola. Coincidiendo temporalmente con la liberación de los virus, se ha observado que TSG101 se sitúa en la membrana externa de aquellas células infectadas con VIH. Se ha comprobado que mediante el uso de anticuerpos específicos que se unen a la TSG101 expuesta en la superficie celular, se consigue una reducción de la producción de virus en células infectadas (Diaz et al., 2010).

### I7.3 Agentes terapéuticos

#### I7.3.1 Fagos

Los virus también se han estudiado por su uso como agentes terapéuticos. Hace casi 100 años, Felix d'Herelle utilizó bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas. La terapia basada en fagos disminuyó tras el descubrimiento de los antibióticos, pero recientemente ha experimentado un renacimiento con la evolución de ciertas cepas de bacterias resistentes a los antibióticos.

Algunas enfermedades que se pueden tratar mediante el uso de fagos son úlceras de la piel producidas por *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*; infecciones producidas por *S. aureus* resistente a la meticilina; en quemaduras para impedir la infección de *Pseudomonas aeruginosa*, en el tracto respiratorio para tratar infecciones contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, o en infecciones del tracto urogenital para tratar *Enterococcus faecalis* (Abedon et al., 2011).

### **17.3.2 Virus oncolíticos**

Otro punto importante en terapia mediada por virus es el uso de virus oncolíticos (OVs) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Los OVs infectan preferentemente a células cancerosas, lo que puede conducir a la lisis de las células tumorales. Además, los OVs son capaces de estimular el sistema inmune del hospedador (Marelli et al., 2018).

La selectividad de los OVs por las células tumorales se da por diferentes motivos (Lawler et al., 2017; Marelli et al., 2018; Sanchala et al., 2017; Stojdl et al., 2000):

1. En algunos casos los receptores reconocidos por el virus para su entrada en la célula son expresados en mayor número en las células tumorales. Así mismo, mediante manipulación genética, se pueden alterar el tropismo de los virus para que reconozcan receptores específicos de los tumores.
2. La rapidez de la división celular en los tumores y la mayor tasa metabólica de sus células, incrementa la tasa de replicación vírica.
3. Muchas células tumorales tienen deficiencias en la señalización de la ruta del interferón tipo I, por lo que permiten una elevada tasa de replicación vírica.

Los estudios clínicos han mostrado resultados positivos utilizando algunos OVs en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Virus modificados genéticamente para ser más selectivos y potentes contra los tumores y la combinación con otras terapias, repercute en mejoras en la efectividad de los tratamientos con pacientes, especialmente en aquellos tumores resistentes a otras terapias.

Un ejemplo de OV es un virus de la familia Herpesviridae genéticamente modificado que fue aprobado por la FDA en 2015 para el tratamiento del melanoma bajo el nombre de *talimogene laherparepvec* (OncoVex, T-VEC) (*Food and Drug Administration*).

### **17.3.3 Vectores virales en terapia génica**

La terapia génica es una técnica que permite el tratamiento de algunas enfermedades mediante la administración de material genético como agente terapéutico.

Algunas aplicaciones que tiene la terapia génica son la introducción en pacientes de una copia sana de un gen mutado que codifica para una copia no funcional de una proteína; sustituir la secuencia de un gen no funcional por la secuencia normal para reestablecer su función; inhibir la expresión de un gen mutado cuya función es patológica; o introducir un gen nuevo que permita combatir una enfermedad, por ejemplo, genes que codifican para proteínas tóxicas y que eliminan una célula diana o genes estimuladores de la respuesta inmune (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>).

En terapia génica, el sistema que permite introducir material genético exógeno en las células son los denominados vectores. Así, los vectores pueden clasificarse en virales y no virales. En esta última categoría se consideran los vectores físicos como la electroporación, químicos como la utilización de lípidos y biológicos como los liposomas. Por su parte, los virus tienen la propiedad natural de enviar material genético al interior de las células, característica que los hace susceptibles de ser utilizados como vectores (Lundstrom, 2018). Algunas propiedades deseables en un vector viral ideal son facilidad de producción, capacidad para integrarse en el genoma del hospedador, facilidad de inserción de material genético de elevado tamaño y un coste de producción razonable (Verma and Somia, 1997).

Por ejemplo, un tratamiento aprobado es el Gendicine (Zhang et al., 2012), que contiene un vector adenoviral con el gen terapéutico p53, un gen supresor de tumores y que resulta eficaz en pacientes con diversos tipos de cáncer.

## 17.4 Bioinsecticidas

Los virus son también utilizados como insecticidas, existiendo en el mercado productos basados en este sistema, como es el caso de los baculovirus. Algunos ejemplos de especies de insectos plaga que se tratan con virus son *Spodoptera exigua* en cultivos de pimiento (*Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de Spodoptera exigua* o SeMNPV) (<http://biocolor.es/virex/>), *Grapholita molesta* y *Cydia pomonella* en frutales de pepita como manzanos o perales (*Virus granulosis carpocapsa* o CpGV) (<http://agrichembio.com/producto/madex-twin/>), *Helicoverpa armígera* en algodón (*Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* o HaNPV), *Lymantria dispar* en bosques madereros (*Lymantria dispar multicapsid nuclear polyedrosis virus* o LdMNPV) (Murhammer, 2016). Algunas de las ventajas que presentan estos insecticidas respecto a los químicos son: un estrecho rango de hospedador, no presentan patogenicidad cruzada con insectos no diana que pueden actuar como enemigos naturales frente a las mismas plagas, se pueden multiplicar *in vitro*, se pueden modificar genéticamente para modificar la eficiencia o que no generan alergias en las personas (Ojeda and Rocha, 2002).

## 18. El virus Nipah

El virus Nipah (NiV) se encuentra englobado en el género *Henipavirus*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*, la cual está compuesta por virus con genomas de ssRNA de cadena negativa y presentan envuelta lipídica.

### 18.1 Distribución geográfica y zoonosis

El principal reservorio de NiV son murciélagos del género *Pteropus*. Existen unas 58 especies de murciélagos considerados hospedadores naturales del virus que se extienden por la costa este de África, el sur y suroeste de Asia, el este de Filipinas, las islas del Pacífico y Australia (**Figura 42**). Algunos países que han detectado el virus Nipah mediante métodos serológicos o moleculares en murciélagos han sido Bangladesh, Camboya, China, India, Indonesia, Madagascar, Taiwan, Tailandia, Gana y Filipinas (**Figura 42**) ([http://www.searo.who.int/entity/emerging\\_diseases/links/nipah\\_virus\\_faq](http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/links/nipah_virus_faq)). Por lo tanto, se ha observado que la distribución geográfica de NiV coincide con la de los



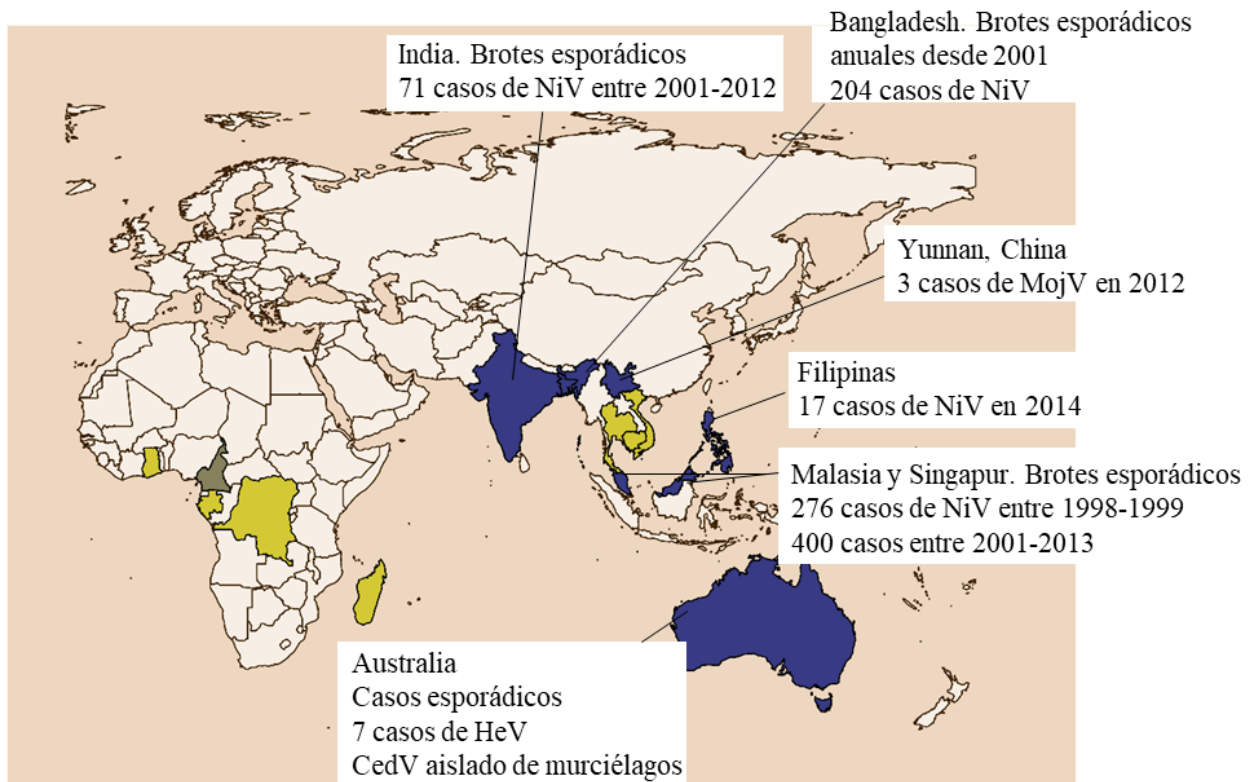
murciélagos del género *Pteropus* (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/nipah-virus>). Además, se han encontrado anticuerpos positivos contra Nipah en murciélagos frutívoros del género *Eidolon*, presente en algunas zonas de África, como Gana y Madagascar ([http://rebrand.ly/CDS\\_Nipah\\_Virus](http://rebrand.ly/CDS_Nipah_Virus)).

La transmisión entre murciélagos y humanos se produce fundamentalmente por el consumo de fruta contaminada por la saliva de los murciélagos infectados, o por contacto con las heces u orina de estos mismos. Alternativamente la transmisión a humanos desde los murciélagos se puede producir por contacto directo con un animal doméstico el cual ha sido previamente infectado por el murciélago (Luby et al., 2009).

Se ha observado que los brotes de NiV en el sudeste asiático tienen un patrón estacional (entre diciembre y mayo) y un rango geográfico limitado. Lo cual se asocia a varios factores como la temporada de reproducción de los murciélagos, la fecha de recolección de la savia de palma para el consumo y el aumento de propagación del virus por parte de los murciélagos ([http://rebrand.ly/nipah\\_virus\\_outbreaks\\_sear](http://rebrand.ly/nipah_virus_outbreaks_sear)).

Aunque de manera minoritaria también se han producido casos de transmisión persona-persona, en este caso debido al contacto directo con secreciones y excreciones de individuos infectados. La necesidad de un contacto extenso para las transmisiones persona-persona hace que éstas sean más comunes entre familiares o trabajadores de la salud que tratan a pacientes enfermos (<http://www.who.int/csr/don/07-august-2018-nipah-virus-india/en/>).

Además de murciélagos y humanos, se han encontrado evidencias de infecciones naturales por NiV en animales domésticos como caballos, perros, cerdos, gatos y cabras. Experimentalmente, se ha comprobado que también otras especies son susceptibles a la infección, como cobayas, hurones, embriones de pollo, hámster dorado, monos ardilla y monos verdes (Marsh and Wang, 2012; Weingartl et al., 2009).



**Figura 42: Distribución geográfica de NiV en poblaciones humanas y de murciélagos.** El mapa indica los países donde se han producido brotes (azul), donde se han identificado humanos seropositivos al virus (verde) y donde hay evidencias de murciélagos infectados de NiV (amarillo). Además, se indican los casos aislados de enfermedad por tres miembros del género *Henipavirus*: *MojV* (*Mòjiāng virus*), *CedV* (*Cedar virus*) y *HeV* (*Hendra virus*). Figura modificada de Watkinson and Lee (2016).

NiV se identificó por primera vez en Malasia y Singapur en 1998 como el agente causante de un brote severo de encefalitis que afectó a 276 personas y cuya tasa de letalidad alcanzó el 38%. En este caso, la transmisión se asoció al contacto con cerdos infectados (Chattu et al., 2018). Sin embargo, en posteriores brotes en Bangladesh ocurridos entre 2001 y 2008, cuya tasa de mortalidad llegó al 71,5%, la infección se relacionó con el consumo de savia de palmera datilera, de la que los murciélagos *Pteropus* spp se alimentan con frecuencia. A partir de entonces se han producido brotes casi anuales en Bangladesh y el este de India. Finalmente, en 2018, tuvo lugar el último brote registrado del virus Nipah en Kerala (India), en la que murieron 17 personas (Ang et al., 2018; Chattu et al., 2018) [http://www.searo.who.int/entity/emerging\\_diseases/links/nipah\\_virus\\_outbreaks\\_sear/en/](http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/links/nipah_virus_outbreaks_sear/en/)).

Así pues, los brotes registrados de NiV muestran una tasa de mortalidad que varía entre el 50 y el 100% (Marsh and Wang, 2012). La alta tasa de virulencia y la amplia zoonosis, sumada a la ausencia de vacunas y de tratamiento efectivo, ha hecho que el NiV se clasifique con un nivel de Bioseguridad 4 (BSL4) (Wang et al., 2010).

## **18.2 Sintomatología**

Los síntomas de la enfermedad son variados, pudiendo ser asintomática, resultar en encefalitis, o provocar una enfermedad respiratoria aguda que puede terminar en neumonía. Generalmente, los pacientes presentan fiebre, dolor de cabeza, mareos y vómitos al principio de la infección. Estos síntomas pueden ir seguidos de encefalitis severa, presentando somnolencia, mareos, síntomas neurológicos como meningitis o afectación del tronco cerebral y alteración de la consciencia (Ang et al., 2018).

Aproximadamente el 20% de los afectados por NiV mantienen a lo largo de su vida secuelas neurológicas como convulsiones, además un menor porcentaje presentan posteriormente encefalitis tardía (Kum Thong Wong et al., 2002), síntomas que aparecen aproximadamente 8 meses después de la infección. Los factores que determinan la aparición de esta encefalitis recurrente y tardía son todavía desconocidos, aunque es probable que NiV permanezca en estado inactivo en el cerebro tras la recuperación. Posteriormente, factores todavía desconocidos llevarían a una activación de la replicación viral causante de estos nuevos síntomas de encefalitis (Tan et al., 2002; Wong et al., 2002) (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/nipah-virus>).

## **18.3 Prevención y tratamiento**

Actualmente, se están estudiando dos estrategias de vacunación para la prevención de la enfermedad causada por NiV:

1. La primera de ellas, restringida para uso veterinario, está basada en la utilización como vector del virus de la viruela del canario. El virus de la viruela del canario es patógeno en algunas especies de aves, pero es incapaz de completar su ciclo vital en humanos, así como en otras especies de mamíferos, de hecho, en el mercado, existen vacunas

comercialmente disponibles para gatos, perros y caballos que incluyen el vector de la viruela del canario (Di Pilato et al., 2013; Poulet et al., 2007).

En el caso de la vacuna contra NiV, el virus de la viruela del canario codifica para las proteínas F y G (descritas con más detalle en el próximo apartado) de NiV. Se ha demostrado que esta vacuna ofrece una protección contra NiV en cerdos y en el hámster dorado (Guillaume et al., 2004; Weingartl et al., 2006).

2. La segunda estrategia, la única aprobada para su uso en humanos, se basa en la proteína G del *Henipavirus* virus Hendra (HeV) y se encuentra en fase preclínica, habiéndose estudiado en modelos de hámster, gato, hurón, cerdo y mono (Broder et al., 2013; McEachern et al., 2008; Satterfield et al., 2016). Esta vacuna es efectiva tanto frente a NiV como HeV debido a que las glicoproteínas G de ambos virus comparten un 83% de identidad aminoacídica.

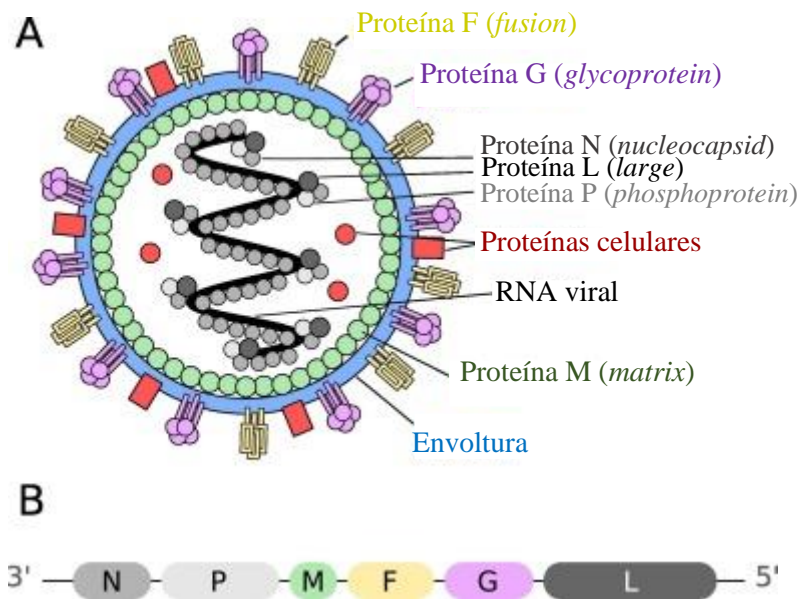
La glicoproteína utilizada para el diseño de la vacuna (sGHeV) carece de los dominios transmembrana y citoplasmático. A pesar de estas modificaciones, la proteína retiene algunas de sus características nativas, como la capacidad de oligomerizar o de unirse a sus receptores en las células hospedadoras (Broder et al., 2013; McEachern et al., 2008; Pallister et al., 2013). La sGHeV ha sido probada frente a NiV en mono verde africano entre otros animales con resultados positivos. Los animales vacunados en ensayos realizados en laboratorio desarrollan altos niveles de anticuerpos contra NiV sin evidencia de enfermedad clínica o virus infecciosos en los tejidos analizados (Bossart et al., 2012).

Sin embargo, en el proceso de vacunación, las aproximaciones basadas en subunidades son, en general, menos efectivas que la presentación de partículas completas al sistema inmunitario debido, entre otras causas, al incorrecto plegamiento de las proteínas diana o a una pobre presentación al sistema inmune (Jennings and Bachmann, 2007). Por lo tanto, se está estudiando el potencial de las VLPs como una alternativa para el desarrollo de una vacuna efectiva contra NiV (Walpita et al., 2011).

#### **18.4 Genoma y composición del virus Nipah**

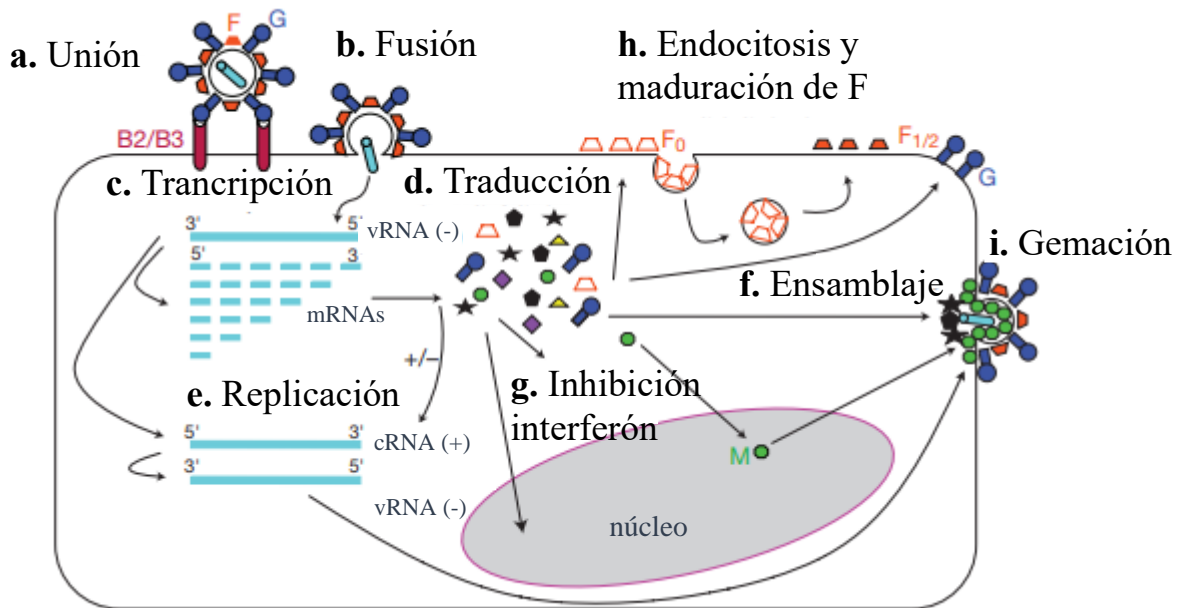
El genoma de NiV tiene un tamaño de aproximadamente 18,2 kb y contiene seis genes que codifican para nueve proteínas (**Figura 43**): Los genes N, P, M, F, G y L codifican

proteínas del mismo nombre y, adicionalmente, el gen P codifica las proteínas V, W y C. (Arankalle et al., 2011; Yoneda et al., 2010).



**Figura 43: Representación esquemática del NiV.** **A**, Representación de la estructura de un virión, las diferentes proteínas incorporadas se indican en diferentes colores. Las coloreadas en rojo, representan proteínas provenientes del hospedador que se incorporan al virión ya sea de forma inespecífica o específica. **B**, Representación esquemática del genoma del NiV.

A continuación, vamos a hacer una breve descripción de las proteínas codificadas por el NiV comenzando por su orden en el genoma. Comenzaremos con las proteínas N, P y L, dado que actúan juntas. Seguiremos con las proteínas C, V y W, las cuales participan en el proceso de la evasión del sistema inmune. Continuaremos con la proteína M, siendo ésta necesaria para la formación de la partícula viral y la salida del NiV de la célula. Por último, caracterizaremos F y G, que son las primeras que actúan durante el ciclo biológico del virus (**Figura 44**), participando en la unión y entrada del virus en la célula hospedadora.



**Figura 44: Ciclo de replicación de Henipavirus.** Los números indican las fases de la replicación: **1.** Unión del virus a la membrana celular. **2.** Fusión de las membranas viral y celular y liberación del genoma viral al interior del hospedador. **3.** Transcripción del genoma viral. **4.** Traducción de las partículas virales a partir del mRNA. **5.** Endocitosis y maduración de la proteína de fusión. **6.** Replicación del genoma viral a partir del antígeno. **7.** Evasión del sistema inmune. **8.** Ensamblaje de las partículas virales. **9.** Liberación de las partículas virales, el virus adquiere su envuelta lipídica a partir de la membrana plasmática del hospedador. Imagen adaptada de Aguilar and Lee (2011).

#### 18.4.1 Las proteínas N, L y P

La nucleoproteína N (58 kDa) está implicada en la encapsidación del genoma viral. Además, unida a la fosfoproteína P (78 kDa) y la polimerasa L (257 kDa), forma los llamados complejos de ribonucleoproteínas (RNPs), los cuales son esenciales y suficientes para la síntesis del RNA viral.

El complejo polimerasa, compuesto por L y P, tiene funciones transcriptasa y replicasa. Así, mediante la función transcriptasa, los RNAm virales son transcritos a partir del ssRNA de cadena negativa. Por otro lado, mediante la función replicasa, se produce RNA viral antígenómico de cadena positiva (+vRNA), que servirá como molde para producir el RNA genómico (vRNA, también producido por la polimerasa viral) que formará parte

de la progenie viral. El RNA genómico es entonces encapsidado mediante la acción de la proteína N para la formación de RNPs. Además, N se une a P para mejorar la especificidad de N por el genoma viral en lugar del celular (Diederich and Maisner, 2007; Ranadheera et al., 2018)

La proteína N es por tanto importante para la encapsidación del genoma, pero también para activar la actividad replicasa y regular la síntesis de RNA viral. El proceso se produce de la siguiente forma:

Durante el ciclo de replicación del NiV, ocurre la fusión de la membrana vírica con la celular. Entonces, las RNPs virales son liberadas al citoplasma, donde tiene lugar la transcripción del genoma viral mediada por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) viral.

Una vez que la proteína N es producida en cantidad suficiente, la polimerasa L cambia su función de transcripción a replicación, generando los RNA antígenomas de cadena positiva, que servirán como molde para producir el ssRNA(-) genómico viral (Cox and Plemper, 2015; Ranadheera et al., 2018; Sun, 2015; Velkov et al., 2014).

#### **18.4.2 Las proteínas C, V, W y P**

El gen P del NiV codifica para las proteínas no estructurales C (19,7 kDa), V (50,3 kDa) y W (49,5 kDa), además de para la fosfoproteína P (78,3 kDa). Para ello, NiV genera la proteína P a partir del gen P tras el editado de forma co-transcripcional del mRNA, las proteínas V y W. Durante el editado, la polimerasa viral inserta uno o dos residuos de guanina en la posición aminoacídica 406, de los 709 aminoácidos que componen la proteína P, para generar V y W, respectivamente. De este modo, las proteínas P, V y W comparten la misma porción N-terminal. Para producir la proteína C, la polimerasa utiliza una pauta de lectura abierta alternativa del gen P y, por consiguiente, esta proteína no comparte secuencia con la proteína P, W o V.

La localización de las proteínas P, V y C es citoplasmática, pero W se encuentra localizada en el núcleo debido a una señal de localización nuclear contenida en su extremo C-terminal (Lo et al., 2012; Yoneda et al., 2010). Las cuatro proteínas P, V, W y C participan en el bloqueo de la respuesta inmune.

Antes de comentar los pormenores de las proteínas codificadas por el gen P en la evasión del sistema inmune, vamos a hacer una breve introducción sobre el mismo. El sistema inmunitario innato reconoce la invasión viral mediante una clase de receptores proteicos conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR).

Estos PRR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs. El reconocimiento de los PAMPs inicia una cascada de señalización que activa diferentes factores de transcripción. La translocación nuclear de estos factores conduce a la expresión de interferón (IFN) tipo 1 y otras citoquinas implicadas en la respuesta inmune.

El IFN es una familia multifuncional de citoquinas. La respuesta antiviral inducida por IFN se encuentra entre las primeras y más potentes respuestas para combatir las infecciones virales. Los IFN inducen la transcripción de los llamados genes estimulados por IFN (ISG) que median los efectos antivíricos, inmunomoduladores e inhibidores del ciclo celular. Además, los ISG pueden estimular la vía apoptótica, limitando la diseminación viral vía muerte celular (Basler, 2012; Brasier et al., 2009; Fleming, 2016).

Las proteínas P y V bloquean, en el citoplasma celular, la vía de señalización del IFN JAK/STAT al unirse al factor de transcripción STAT1 y evitar su translocación al núcleo. Además, la proteína V se une a MDA5 y RIG-I (PPRs) para suprimir el reconocimiento del RNA viral. Por otro lado, la localización nuclear de la proteína W en NiV permite el bloqueo de la activación de IFN mediante su unión a IRF-3. Así mismo, la proteína C exhibe efecto inhibitorio sobre los TLR7/9, dos miembros de la familia de PRRs, alterando la expresión de IFN (Basler, 2012; Weingartl, 2015).

### **18.4.3 La proteína M**

La proteína de la matriz M es la responsable del ensamblaje y salida de las partículas virales. M tiene un peso molecular de 40 kDa y se encuentra en la célula predominantemente como homodímeros. Esta proteína es capaz de reorganizar el citoesqueleto para facilitar la liberación y el ensamblaje de los viriones. No obstante, todavía no se ha determinado si la proteína M interacciona directamente con la actina, con las proteínas reguladoras actina o con ambas. Esta interacción y la oligomerización de M, tienen como objetivo inducir el proceso de curvatura de la membrana plasmática



del hospedador alrededor de las proteínas estructurales y del genoma del virus durante el proceso de envoltura del virión (Sun et al., 2014; Watkinson and Lee, 2016).

La proteína M de NiV y de otros paramyxovirus atraviesa el núcleo de la célula hospedadora antes de alcanzar la membrana celular, siendo este el lugar de ensamblaje del virion (Pentecost et al., 2015). No se conoce la relevancia funcional de este proceso, aunque se barajan varias hipótesis:

1. Es posible que M sea dirigida al núcleo para ser secuestrada temporalmente y que no interrumpa la eficiencia de la replicación en sus etapas tempranas, ya que M puede formar VLPs en ausencia del genoma y la nucleocápside (Watkinson and Lee, 2016).

Alternativamente, la proteína M podría estar secuestrada en el núcleo porque podría inhibir la actividad de la RdRP, tal y como ocurre en el virus de la rubeola, en el virus de Newcastle, o en el virus Sendai (SeV). En estos casos, la proteína M tiene la capacidad de inhibir la actividad de la transcriptasa viral antes del empaquetamiento. La acumulación de M en el núcleo viral podría asegurar que la replicación del RNA viral y la transcripción en el citoplasma se realizara hasta alcanzar cierto nivel de RNA y expresión proteica. En este punto, la proteína M sería transportada a la membrana celular para participar en el ensamblaje y gemación de los virus (Duan et al., 2019; Ghildyal et al., 2006; Iwasaki et al., 2009; Watkinson and Lee, 2016).

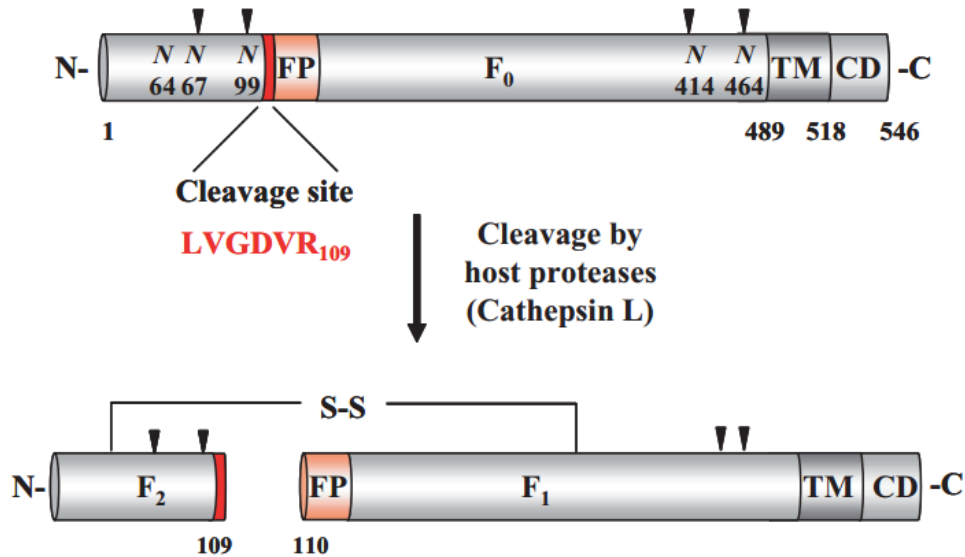
2. Por otra parte, también es posible que, en el núcleo, M realice una función requerida en el ciclo viral. Se ha especulado con el papel de M como antagonista de la respuesta inmune del hospedador o como modulador del ciclo celular (Bharaj et al., 2016).

#### **18.4.4 La proteína de fusión F**

La proteína de fusión F es una proteína de membrana tipo I de 60 kDa. Esta proteína es la encargada de la fusión de las membranas de la envoltura del virus con la célula hospedadora o entre membranas celulares, permitiendo la propagación del virus de células infectadas a no infectadas (Lee and Ataman, 2011).

La proteína F, considerada una proteína de fusión de clase I, se sintetiza como un precursor inactivo llamado F0 (**Figura 45**). Este precursor consta de un dominio N-

terminal, un péptido de fusión hidrofóbico; dos regiones de repetición que forman tres hélices alfa y que se encuentran situadas junto al péptido de fusión y al dominio transmembrana; un dominio transmembrana y una cola citoplasmática terminal.



**Figura 45: Representación esquemática de la proteína de fusión F de NiV.** F<sub>0</sub>, precursor no cortado de la proteína F. F<sub>1</sub>, producto C-terminal de la proteína F. F<sub>2</sub>, producto N-terminal de la proteína F. FP, péptido de fusión. TM, dominio transmembrana. CD, dominio citoplasmático. N, sitio de glicosilación potencial, importante para la integridad estructural y funcional de la proteína. Las flechas negras indican los N-glicanos, importantes para el plegamiento y transporte. Imagen de Diederich and Maisner (2007).

Después de la síntesis la proteína F pasa a través del aparato de Golgi y es transportada a la membrana plasmática. Una vez en la membrana, se produce la endocitosis de la proteína F, donde se pone en contacto en el endosoma con la catepsina L, una proteasa celular (Aguilar et al., 2007), que permite la maduración por escisión de F<sub>0</sub>. Las dos partes de la forma madura, se denominan F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> y se mantienen unidas mediante un puente disulfuro situado entre los residuos 71 y 192. Este corte proteolítico expone el péptido de fusión y permite que la proteína pueda ejercer su función. Tras la escisión, la proteína es reciclada y reenviada a la superficie celular, donde será incorporada a los nuevos viriones.

La activación de la proteína F<sub>0</sub> es otro de los factores necesarios para determinar el rango de hospedadores, el tropismo a los tejidos y la patogenicidad del virus (Diederich and Maisner, 2007).

### **I8.4.5 La glicoproteína G**

La glicoproteína G es una proteína de membrana tipo II de 67 kDa que se asocia en homotetrámeros. Esta proteína está implicada en la unión del virión a la membrana plasmática del hospedador, mediante el reconocimiento de las efrinas B2 y B3 como receptores celulares.

La identificación de las efrinas B2 y B3 coincide con el espectro de hospedadores en los que el NiV puede completar su ciclo biológico. Estos receptores se encuentran altamente conservados entre diferentes especies, (humano, gato, cerdo, hámster o murciégalo) lo que otorga al virus un amplio tropismo.

A su vez, el tropismo tisular del virus también depende de la expresión del receptor en el tipo celular específico.

La efrina B2 es una proteína que se expresa en linfocitos, neuronas, células musculares y endoteliales que rodean las arterias pequeñas. Del mismo modo, la efrina B3 se expresa en algunas regiones del cerebro. La presencia de las efrinas B2 y B3 en los tejidos descritos explica los síntomas de la enfermedad como la encefalitis o la afectación respiratoria (Maisner et al., 2009; Weingartl, 2015; Xu et al., 2008).



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



#### **M4. Producción de las VLPs del virus Nipah**

Para la producción de las VLPs del NiV, se cultivaron células embrionarias del riñón humano HEK293T (ATCC) en placas de 100 mm usando medio completo DMEM (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco).

Las células se transfectaron 24 horas después de la siembra con plásmido de expresión en mamíferos (pCAGGS) que contiene las proteínas de NiV seleccionadas. Concretamente, el medio DMEM, sin suero añadido, se mezcló con 2 µg del plásmido pCAGGS codificando para las siguientes proteínas de NiV (cepa de Malasia 2012): F (Uniprot Q9IH63), G (Uniprot Q9IH62) y M (Uniprot Q9IK90, que incluye cola HA) y polietilenimina (PEI) en una ratio 3:1 (w/w) de PEI y DNA. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente antes de añadirse a las HEK293T. Las células se cultivaron durante 2 días en nuevo medio DMEM suplementado con un 3% de suero fetal bovino.

#### **M5. Purificación de las VLPs**

A continuación, se realizó la purificación de las VLPs del NiV. Primero, se tomó el medio de cultivo con cuidado para no coger las células. El medio se centrifugó dos veces a 200 g durante 10 min a 4 °C para separar las VLPs de las células HEK293T que se han arrastrado.

A continuación, se realizaron dos pasos de ultracentrifugación para la purificación y limpieza de las muestras. Para ello, los sobrenadantes provenientes de la centrifugación, que contenían las VLPs, se ultracentrifugaron en tubos *Ultra Clear* (Beckman Coulter) con TBS pH 7,5 y sacarosa al 20% a 35.000 rpm durante 2 h a 4 °C en un rotor SW41TI (Beckman Coulter). Los precipitados conteniendo las VLPs, se resuspendieron en TBS y ultracentrifugaron nuevamente en un colchón de TBS con sacarosa al 20% a 50.000 rpm durante 15 min y 4 °C en un rotor TLA55 (Beckman Coulter).

La técnica de centrifugación en colchón de sacarosa en un rotor basculante permite purificar y concentrar vesículas lipídicas como son las partículas virales. Las partículas virales se acumulan en el fondo del tubo sin generar estrés mecánico, por lo que se obtienen partículas morfológicamente intactas

Tras el último proceso de centrifugación, los precipitados se recogieron y se comprobó la calidad de las VLPs purificadas mediante microscopía electrónica y *western blot*.

#### **M6. *Western blotting***

Con el objetivo de comprobar la ausencia de restos celulares en la preparación de las VLPs, se realizó un *Western blot* en el que se analizó la presencia de la Histona 3. También mediante esta técnica se estudió la presencia de proteína M en las muestras de VLPs y en las células transfectadas, ya que esta proteína incluye una etiqueta HA que nos permitió identificarla mediante el uso de anticuerpos.

Las muestras de VLPs purificadas fueron sometidas a una separación mediante SDS-PAGE al 12% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween 20 (0,1%) (TBS-T) suplementado con un 5% de leche en polvo desnatada (Oxoid) durante 1 h a 25 °C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-HA (Sigma) y anti-Histona3 (Sigma). A continuación, las membranas se lavaron dos veces con TBS-T e incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Las bandas correspondientes a las proteínas se visualizaron mediante quimoluminiscencia usando un analizador de imagen ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare).

#### **M7. Microscopía electrónica de transmisión**

La segunda prueba para comprobar la pureza de las VLPs se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Las VLPs purificadas se resuspendieron en fijador Karnovsky (**ANEXO 1**), que contiene una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído para una penetración más rápida en las muestras. Este proceso permite preservar la estructura y proteger las muestras de alteraciones durante los procesos de manipulación y observación al microscopio electrónico.

Las partículas se depositaron en una rejilla de cobre y se dejaron secar durante 10 min. Estas rejillas son unos finos discos de metal de unos 2-3 mm de diámetro y 50-100 mm de grosor, que se utilizan para visualizar las muestras en el microscopio electrónico de



transmisión y que, incluso, pueden ser colocadas sobre un portamuestras si se van a utilizar en un microscopio electrónico de barrido. Las rejillas pueden ser fabricadas con una gran variedad de materiales, por ejemplo, de metales conductores tales como el cobre, el oro o el platino, de metales no magnéticos como el níquel, el rodio o acero o materiales no metálicos como el carbono o algunos polímeros (Echlin, 2009).

Una vez colocadas en la rejilla, las VLPs se tiñeron con un 2% de acetato de uranilo durante 10 min y un 2% de citrato de plomo durante 10 min. Ambos compuestos son metales pesados que se usan como contraste para la observación de las muestras. De este modo, cuando los electrones del microscopio electrónico se encuentran con estos materiales, no los atraviesan y en el microscopio se observa una imagen proveniente del contorno de los materiales biológicos contrastados.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-101 Jeol en el servicio de microscopía de la Universitat de València.

#### **M8. Purificación y análisis de las proteínas asociadas a las VLPs del virus Nipah**

Después del análisis de la pureza y morfología de las VLPs, se separaron las proteínas celulares asociadas a las partículas virales. Se utilizaron para ello los sobrenadantes de las células transfectadas. Tras dos rondas de centrifugación realizadas del modo descrito en el apartado **M5**, los precipitados se resuspendieron en PNGase-F Glycoprotein Denaturing Buffer (New England Biolabs) para a continuación añadir PNGase-F con objeto de deglicosilar las proteínas que forman parte de las VLPs. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La glicosilación introduce variaciones en la masa molecular y afecta a la carga neta de las proteínas. Esto se traduce en que las glicosilaciones reducen la eficiencia de la tripsina y la eficiencia de ionización durante la cromatografía por lo que para un correcto análisis mediante espectrometría de masas es conveniente eliminarlas (Geyer and Geyer, 2006; Mariño et al., 2010).

### **M9. Preparación de las muestras para espectrometría de masas**

Para el análisis proteómico, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% a 100 V durante 30 min. Las proteínas se escindieron del gel para su análisis en el Servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València.

En primer lugar, se reducen los puentes disulfuro presentes en las proteínas mediante la adición de 10 mM de DTT. El siguiente paso es el uso de un agente alquilante como la iodoacetamida utilizada a 10 mM, que reacciona con los grupos sulfhidrilo para formar S-carboxiamidometil-cisteína, que no se puede reoxidar para volver a formar los enlaces disulfuro. Ambos pasos son importantes para permitir el acceso de la tripsina. A continuación, la proteína se escinde en péptidos mediante la adición de 500 ng de tripsina. Los péptidos resultantes se llaman péptidos trípticos y tienen el tamaño adecuado para en análisis por espectrometría de masas. Finalmente, las muestras se analizaron mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (**M3.1** y **M3.4**) para su cuantificación mediante *shotgun* (**M3.2**). La abundancia de las proteínas identificadas se calculó mediante la técnica del Top3 (**M3.5.1**). Se realizaron un total de cuatro réplicas.

### **M10. Análisis de los datos de espectrometría**

Los datos provenientes de la espectrometría de masas se utilizaron para identificar las proteínas asociadas a las VLPs de NiV. En primer lugar, los datos se limpiaron y filtraron, después de calculó la abundancia de las proteínas identificadas y, por último, los datos se normalizaron.

Para el filtrado de los datos, se comenzó seleccionando únicamente las proteínas que se encontraron en los cuatro experimentos realizados. Las proteínas identificadas en las muestras derivadas de las células HEK293T sin transfectar y por tanto constitutivamente secretadas por los exosomas fueron utilizadas como muestras control, y se usaron para eliminar las proteínas inespecíficas presentes en las VLPs. Las proteínas restantes se filtraron usando la base de datos CRAPome. La base de datos CRAPome ha sido desarrollada como un repositorio común de contaminantes en análisis de espectrometría de masas de purificación por afinidad. Esta base de datos contiene otros contaminantes

encontrados a menudo en la identificación por MS, independientemente de la naturaleza del experimento que se esté llevando a cabo.

La abundancia de proteínas presentes en las muestras se expresó en partes por millón (ppm) y se calculó de acuerdo a la expresión  $\text{ppm} = 10^6 \cdot (I/It)/Mw$ , donde I corresponde a la suma de los tres péptidos más intensos, It es la suma de la intensidad de todos los péptidos de la muestra y Mw el peso molecular de la proteína (Ning et al., 2012; Silva et al., 2006). De esta forma, la abundancia de cada proteína se expresa relativa al total de moléculas de proteína presente en la muestra y relativizada al tamaño de la proteína. La descripción original de la aproximación del Top3 emplea tres péptidos por proteína. Para aquellas proteínas para las que se identificaron menos de tres péptidos también pueden ser cuantificadas utilizando este método (Ning et al., 2012). Experimentalmente, se ha observado una correlación lineal entre la señal de intensidad y la abundancia de proteínas usando el procedimiento descrito, incluso entre proteínas con menos de tres péptidos. Finalmente, las muestras fueron normalizadas usando la réplica 1 como valor de referencia.

### **M11. Localización e identificación funcional de las proteínas identificadas**

Para conocer la localización subcelular de las proteínas identificadas en las VLPs de NiV se recurrió al programa Hum-mPLoc 2.0 (Shen and Chou, 2009, 2007). Este algoritmo predice la localización subcelular de las proteínas humanas basándose en los términos GO (Gene Ontology Consortium, <http://www.geneontology.org/>) y a su composición de aminoácidos (Shen and Chou, 2008). Adicionalmente, la presencia de segmentos transmembrana se analizó usando la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org>).

Las ontologías son bases de datos que almacenan la información sobre productos génicos conocidos. El proyecto Gene Ontology proporciona un vocabulario estructurado de uso general para describir a los genes y los productos de los mismos en una amplia variedad de organismos. Esto se hace mediante los llamados términos GO, que estructuran la información en tres ontologías: la función molecular de los productos génicos, que hace referencia a la actividad bioquímica de un producto génico, por ejemplo, “transporte” o “actividad catalítica”; el proceso biológico en el que participan los productos génicos, por

ejemplo, “señalización” o “respuesta a estímulos”; y el componente celular, que indica el lugar los productos génicos se encuentran activos como “ribosoma” o “núcleo”.

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento usando la herramienta GSEA del Instituto Broad (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>). El GSEA (también conocido como análisis de enriquecimiento funcional) es un método para identificar clases de genes o proteínas que están sobre-representadas en un conjunto de genes o proteínas entre muestras biológicas, permitiendo la identificación de asociaciones. El método utiliza un enfoque estadístico para la identificación de los grupos significativamente enriquecidos. El análisis de enriquecimiento utiliza conjuntos de genes que se han agrupado por su participación en la misma vía biológica según los términos GO o tienen una relación común como estar implicados en una enfermedad o se encuentran en una localización próxima en un cromosoma. La base de datos de estos conjuntos predefinidos se denomina MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (Ashburner et al., 2000; Subramanian et al., 2005).

Finalmente, los perfiles de expresión de las proteínas seleccionadas en los tejidos humanos se obtuvieron del Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org), versión 17 y Ensembl versión 83.38). Este programa tiene como objetivo el mapeo de las proteínas humanas en las diferentes células, tejidos y órganos mediante el uso de diferentes tecnologías ómicas como imágenes basadas en anticuerpos, espectrometría de masas, transcriptómica y biología de sistemas. El porcentaje de distribución de las proteínas fue calculado dividiendo el número de veces que una proteína fue detectada (teniendo en cuenta si su abundancia es baja, media o alta) por el número de veces que dicha proteína fue investigada.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



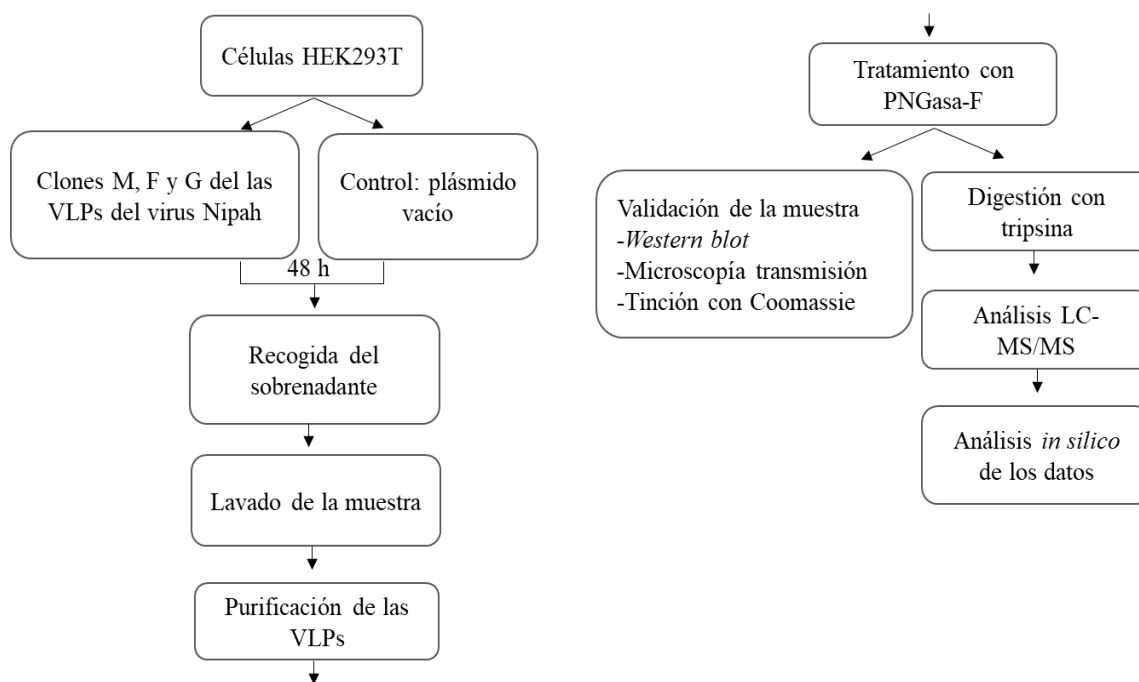
## **R6. Generación de las VLPs del virus Nipah**

Para producir las VLPs del NiV se utilizaron células embrionarias humanas HEK293T. Esta línea se escogió porque tanto el NiV como el HeV son capaces de replicarse en este tipo celular y porque se ha demostrado previamente su capacidad para generar VLPs de ambos paramixovirus (Ciancanelli and Basler, 2006; Park et al., 2016a; Wynne et al., 2014).

Se ha comprobado experimentalmente que la proteína M del NiV es capaz de formar y liberar VLPs por sí misma en ausencia de otros componentes virales. Del mismo modo, las proteínas G y F por separado también tienen la capacidad para liberar las partículas, aunque de forma menos eficiente que M. Sin embargo, la coexpresión de M, G y F da lugar a un proceso de salida de las partículas más eficiente (Patch et al., 2007; Walpita et al., 2011). Además, se ha observado que las VLPs constituidas en ausencia de M tienen una forma irregular, habiéndose observado defectos en la envoltura como la presencia de una superficie desigual o la aparición de ampollas. Estas irregularidades implican que la integridad de la membrana se encuentra comprometida. Por lo tanto, los datos demuestran que tanto M como F y G son importantes para el correcto ensamblaje de las VLPs del NiV (Ciancanelli and Basler, 2006; Dietzel et al., 2016; Harrison et al., 2010).

De este modo, determinamos que para obtener partículas virales morfológicamente parecidas a los viriones en su forma natural y debido a que el contenido viral de las VLPs puede influenciar en las proteínas celulares incorporadas en ellas, las VLPs preparadas en nuestros experimentos incluyeran las proteínas M, F y G del NiV.

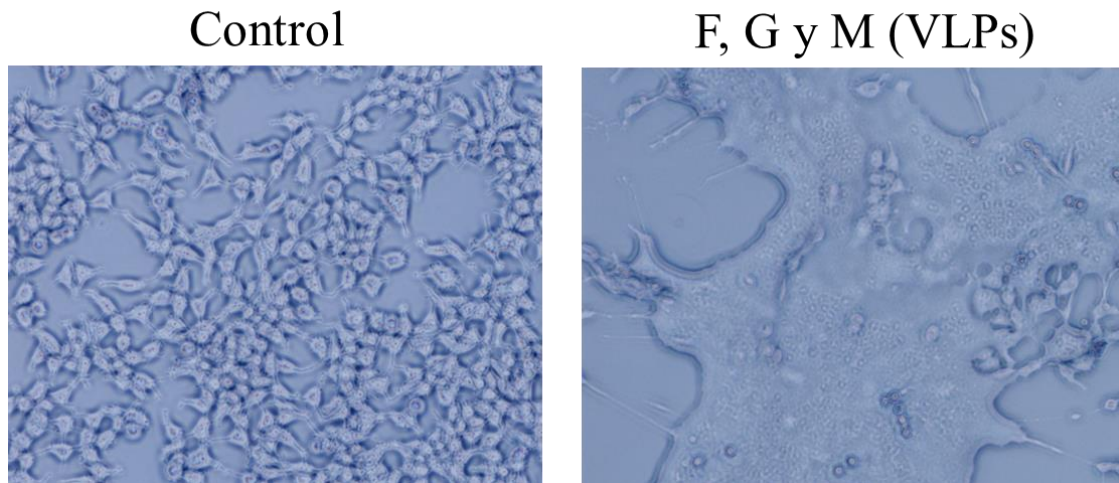
En nuestros experimentos las células HEK293T fueron co-transfectadas con plásmidos que codificaban para la proteína M (41 kDa), F (60 kDa) y G (60 kDa) de NiV. Pasadas 48 horas de la transfección, el medio de cultivo fue recogido y las VLPs purificadas mediante ultracentrifugación (**Figura 46**) (ver materiales y métodos para una descripción detallada de la metodología empleada).



**Figura 46: Purificación de VLPs:** Flujo de trabajo llevado a cabo para la producción, purificación, análisis y validación de las VLPs y sus proteínas asociadas.

En el momento de la recolección, las células transfectadas presentaban una morfología sincitial (Hooper et al., 2001), lo que confirmó la expresión y maduración de ambas glicoproteínas (**Figura 47**). Recordemos que la proteína F es capaz de fusionar las membranas de las células que contienen receptores de las efrinas B2 o B3 tras la unión del virión a la célula hospedadora mediada por G. Este proceso tiene como resultado la formación de un sincitio que puede observarse mediante microscopía óptica.

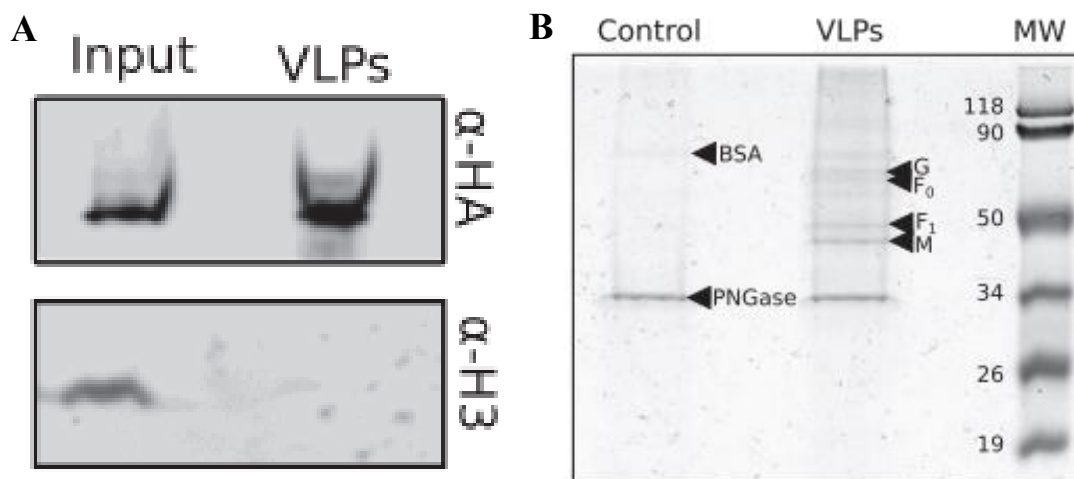




**Figura 47: Visualización del sincitio.** Imágenes de las células HEK293T a las 48 h post transfección, se observa la muestra control transfectada con el plásmido vacío y la muestras con los plásmidos codificando para las proteínas F, G y M.

Para confirmar la presencia de la proteína M tanto en las células transfectadas como en las VLPs purificadas, se realizó un inmunoensayo empleando un anticuerpo anti-HA, dado que la proteína M presenta esta etiqueta. El resultado demostró la presencia de M en ambas fracciones (**Figura 48**). La presencia y maduración de las proteínas transfectadas corrobora la validez del método para la purificación de VLPs del NiV.

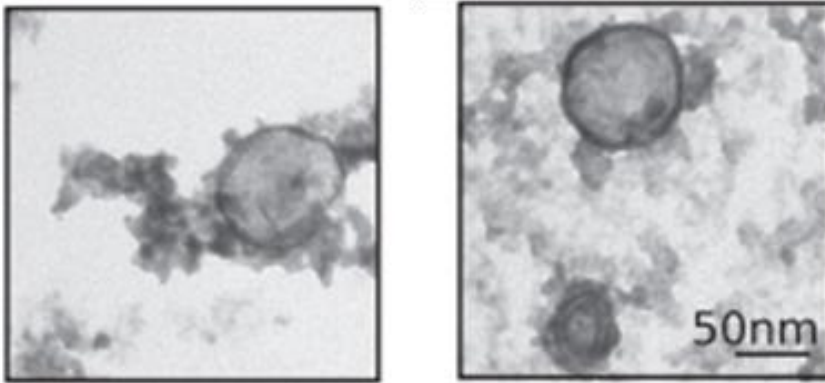
Para el análisis de la presencia de restos celulares en la preparación de las VLPs, analizamos en las muestras la presencia de la Histona 3 (H3) (**Figura 48**). Como control positivo se incluyeron extractos de células transfectadas. Tras el inmunoensayo, no se encontró H3 en la preparación de VLPs, lo que indica la ausencia de restos celulares en la preparación de VLPs.



**Figura 48: Identificación en gel de las proteínas transfectadas.** **A.** Identificación mediante Western blot de la proteína *M* con etiqueta HA (panel superior) y de la Histona 3 (panel inferior) en células HEK293T transfectadas y en VLPs purificadas. **B.** SDS-PAGE de las proteínas deglicosiladas de muestra control y la que contiene las VLPs. Las flechas indican la posición de la PNGasa-F, BSA y las proteínas F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, G y M.

Adicionalmente analizamos la morfología y el tamaño de las VLPs de NiV, mediante microscopía de transmisión, para comprobar si ambas características son similares a las observadas previamente en viriones (**Figura 49**). La mayoría de las partículas observadas presentaba forma esférica mientras que una pequeña proporción presentaba una morfología filamentosa.

A continuación, se calculó el diámetro de las VLPs utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ, este resultó ser de  $91,2 \pm 37,3$  nm. Las medidas observadas son consistentes con mediciones realizadas en trabajos previos, lo que indica que las VLPs son un modelo apropiado, al menos desde un punto de vista estructural, para realizar nuestros experimentos (Ciancanelli and Basler, 2006; Hyatt et al., 2001).



**Figura 49:** Imagen de microscopía electrónica de transmisión donde se muestran las VLPs a un aumento de 40.000x.

### **R7. Identificación de las proteínas celulares asociadas a las VLPs de Nipah**

Muchos estudios proteómicos llevados a cabo para detectar los constituyentes de los viriones han identificado proteínas celulares. Algunas de estas proteínas se ensamblan de forma inespecífica en los viriones, pero otras se incorporan de forma específica y juegan un papel importante en la replicación viral. Estas proteínas pueden ser dianas para terapias antivirales porque podrían llevar a cabo funciones críticas en el ciclo de vida del virus (Saphire et al., 2006).

Antes de la identificación de las proteínas asociadas a las VLPs, tanto las muestras de VLPs como el control fueron deglicosilados con PNGasa-F. Esta enzima corta entre los GlcNAc y los residuos de asparagina de oligosacáridos con alto contenido en manosa (Maley et al., 1989). Tanto F como G son proteínas de membrana con múltiples sitios de glicosilación, es recomendable, por lo tanto, la eliminación de las glicosilaciones para aumentar la eficiencia de la tripsina y la eficiencia de ionización e identificación durante el ensayo de espectrometría (ver materiales y métodos).

A continuación, el contenido proteico de las VLPs fue analizado mediante SDS-PAGE utilizando Coomassie coloidal para su observación en geles de acrilamida. Este análisis nos permitió observar bandas de origen proteico con un peso molecular equivalente al tamaño de M (41 kDa), F<sub>1</sub> (51 kDa) y G (67 kDa). Además, se observaron dos bandas, presentes en el control (células sin transfectar) y en las VLPs, cuya movilidad

electroforética corresponde con la PNGasa-F, añadida de manera exógena, y con la albúmina de suero bovino (BSA), proteína derivada de los medios de cultivo (**Figura 48B**). Es importante resaltar que la cantidad de PNGasa-F y BSA presente en las preparaciones de VLPs fue lo bastante baja como para no interferir en la identificación por LC-MS/MS.

Una vez identificadas las proteínas presentes en las muestras control y las preparaciones de VLPs se procedió al análisis y cribado de los datos (ver materiales y métodos). Brevemente, las proteínas identificadas en las muestras control se eliminaron de las muestras de VLPs, considerándose contaminantes o constituyentes de las vesículas extracelulares, puesto que no dependen de la presencia de las partículas virales. Adicionalmente, para eliminar falsos positivos, usamos, la base de datos CRAPome, la cual recoge los contaminantes comunes para los datos de MS y eliminamos aquellas proteínas candidatas que se encontraban presentes en la base de datos.

A continuación, seleccionamos aquellas proteínas que se encontraban en las cuatro réplicas realizadas de nuestros experimentos. Asumimos que un elevado número de réplicas nos permitiría eliminar los falsos positivos y las proteínas accidentalmente incorporadas a las VLPs. En total se identificaron 67 proteínas del hospedador (**Tabla 9**). Para todas ellas se calculó la abundancia mediante el método del Top3 (ver materiales y métodos). Los péptidos escogidos para realizar el cálculo fueron aquellos que presentaron una confianza igual o mayor del 95% según los parámetros definidos en el ProteinPilot.

En la **Tabla 9**, para cada proteína identificada en el experimento de LC-MS/MS, se indica el código UniProt, el nombre de cada proteína, su abundancia relativa, el peso molecular y la localización subcelular. De acuerdo a la base de datos UniProt, el 58% de las proteínas están asociadas a orgánulos membranosos, aunque sólo el 22% presentan algún segmento transmembrana. El número de segmentos transmembrana de las proteínas identificadas también se muestra en la tabla.

**Tabla 9:** Proteínas del hospedador identificadas en las VLPs del virus Nipah.

Código Uniprot	Nombre*	Nombre completo	MW (kDa)	Péptidos <sup>a</sup>	Cobertura <sup>b</sup>	Abundancia relativa <sup>c</sup>	#TM <sup>d</sup>	Localización <sup>e</sup>	Ref#	Ref#
O00560	SDCB1	Syntenin-1	32,44	34,0	52,3	220,80	0	Citoesqueleto, RE, núcleo	(Gräßel et al., 2016)	(Chertova et al., 2006; Hutchinson et al., 2014; Lussignol et al., 2016)
P53985	MOT1	Monocarboxylate transporter 1	53,94	11,0	19,8	91,65	12	Membrana	(Hutchinson et al., 2014)	(Hutchinson et al., 2014)
P61026	RAB10*	Ras-related protein Rab-10	22,54	6,0	29,2	82,51	0	Golgi	(Chertova et al., 2006; Lietzén et al., 2011; Stegen et al., 2013)	(Chertova et al., 2006; Stegen et al., 2013)
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	12,48	2,0	12,2	69,43	0	Extracelular	(Assunção-Miranda et al., 2010; Stegen et al., 2013)	(Stegen et al., 2013)
P61006	RAB8A*	Ras-related protein Rab-8A	23,67	5,3	37,6	61,92	0	Golgi, núcleo	(da Silva et al., 2013; Santos et al., 2012; Xu et al., 2008)	(da Silva et al., 2013; Santos et al., 2012)
Q01650	LAT1	Large neutral amino acids transporter	55,01	4,7	9,6	45,29	12	Membrana		
O43657	TSN6	Tetraspanin-6	27,56	5,7	27,7	39,68	4	Membrana	(Soares et al., 2016; Thali, 2011; Wang et al., 2012)	(Soares et al., 2016; Thali, 2011)
P21926	CD9*	CD9 antigen	25,42	2,3	17,2	38,34	4	Membrana	(Shaw et al., 2008; Soares et al., 2016; Thali, 2011)	(Shaw et al., 2008; Soares et al., 2016; Thali, 2011)
Q13501	SQSTM1	Sequestosome-1	47,69	14,7	35,4	38,26	0	núcleo	(Shi et al., 2013)	
P61106	RAB14*	Ras-related protein Rab-14	23,90	5,3	25,3	36,24	0	Citoplasma, RE, Golgi	(Qi et al., 2013)	(Qi et al., 2013)
Q9H444	CHM4B <sub>4b</sub>	harged multivesicular body protein	24,95	3,7	16,9	35,68	0	Citoplasma	(Morita et al., 2011)	
P08754	GNAI3* <sub>G</sub>	Guanine nucleotide-binding protein	40,53	6,7	20,5	33,99	0	Ubicua	(Hutchinson et al., 2014)	(Hutchinson et al., 2014)
P61586	RHOA*	Transforming protein RhoA	21,77	7,7	30,0	32,60	0	Ubicua	(Gower et al., 2001; Santos et al., 2012)	(Santos et al., 2012)
P51148	RAB5C*	Ras-related protein Rab-5C	23,48	6,3	35,4	31,40	0	Membrana, endosoma	(Krishnan et al., 2007; Santos et al., 2012)	(Santos et al., 2012)

Q9Y696	CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	28,77	4,3	27,7	29,60	1	Ubicua	(Hutchinson et al., 2014)
P30626	SORCN	Sorcin	21,68	4,7	26,3	28,40	0	Membrana, citoplasma	(Tran et al., 2016)
Q969P0	IGSF8*	Immunoglobulin superfamily member 8	65,03	12,7	29,3	25,48	1	Extracelular	(Potel et al., 2013; Soares et al., 2016)
P02786	TFR1*	Transferrin receptor protein 1	84,87	19,0	35,4	25,20	1	Membrana, endosoma	(Martin and Uprichard, 2013; Soares et al., 2016)
P07741	APT	Adenine phosphoribosyltransferase	19,61	3,3	30,2	22,9	0	citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
O75131	CPNE3	Copine-3	60,13	13	37,7	17,8	0	citoplasma	(Chertova et al., 2006; Hutchinson et al., 2014; Kipkorir et al., 2015)
Q92783	STAM1*	Signal transducing adapter molecule 1	59,18	6,7	17,5	16,67	0	citoplasma	
Q9P2B2	FPRP*	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	98,56	15,7	27,1	16,49	1	RE, extracelular	(Lussignol et al., 2016; Soares et al., 2016)
P08133	ANXA6	Annexin A6	75,87	11,7	28,2	15,7	0	citoplasma	(Ma et al., 2012; Soares et al., 2016)
P16152	CBR1	Carbonyl reductase [NADPH] 1	30,38	7,7	32,6	15,44	0	Microsoma	
P00492	HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	24,58	4,7	24,3	15,39	0	Citoplasma	(Paganin et al., 1997)
Q15043	S39AE	Zinc transport RE ZIP14	54,21	6	28,4	15,12	6	Membrana	(Zhou et al., 2011)
Q15181	IPYR	Inorganic pyrophosphatase	32,66	3,3	17	14,36	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
Q53EZ4	CEP55*	Centrosomal protein of 55 kDa	54,18	8	22,3	13,89	0	Centrosoma, citoplasma	(Carlton and Martin-Serrano, 2007)
P13797	PLST	Plastin-3	70,81	12,7	24,3	13,06	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014; Yoo et al., 2015)
P54577	SYYC	Tyrosine-tRNA ligase	59,14	7	21,1	12,5	0	Citoplasma, extracelular	
Q9H0H5	RGAP1	Rac GTPase-activating protein 1	71,03	4,7	11,7	12,45	0	Núcleo	

Q12846	STX4*	Syntaxin-4	34,18	4	18,1	11,88	1	Membrana, citoplasma	(Ren et al., 2017)
Q92597	NDRG1	Protein NDRG1	42,84	2,7	15,4	11,65	0	citoplasma, núcleo	(Hutchinson et al., 2014)
Q5JWF2	GNAS1*	Guanine nucleotide-binding protein G alpha 1ias	111,03	7	12,1	11,11	0	Membrana, citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
Q5ZPR3	CD276	CD276 antigen	57,24	6	20,4	11,01	1	membrana	(Chertova et al., 2006; Luan et al., 2012; Soares et al., 2016)
O60637	TSN3	Tetraspanin-3	28,02	1,7	6,2	10,78	4	Membrana	
P31939	PUR9	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,62	9,7	19	10,43	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014; Kroeker et al., 2013)
P06744	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase	63,15	8	24,1	9,3	0	Extracelular	(Hutchinson et al., 2014)
P49006	MRP	MARCKS-related protein	19,53	4,3	28,9	9,23	0	Membrana	(Hutchinson et al., 2014)
P08243	ASNS	Asparagine synthetase	64,37	4	13,6	8,8	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
P61158	ARP3	Actin-related protein 3	47,37	3,3	12,4	8,69	0	Citoesqueleto	(Chertova et al., 2006; Cureton et al., 2009; Santos et al., 2012)
P28072	PSB6	Proteasome subunit beta type-6	25,36	2	15,9	8,24	0	Núcleo	(Hutchinson et al., 2014)
O14964	HGS*	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase	86,19	9	14,5	8,21	0	Citoplasma, endosoma	
Q8IV08	PLD3	Phospholipase D3	54,71	2,3	5,7	7,03	1	RE	(Brown et al., 2017)
Q92542	NICA	Nicastrin	78,41	4	16,2	4,88	1	RE, Golgi	
P49588	SYAC	Alanine-tRNA ligase	106,81	5	11,4	4,82	0	Citoplasma	
Q99961	SH3G1	Endophilin-A2	41,49	3,7	14,2	4,65	0	Citoplasma	(Lemmitzer et al., 2013)
Q99615	DNJC7	DnaJ homolog subfamily C member 7	56,44	3,7	13,8	4,59	0	Núcleo	(Khachatoorian, 2016)
P52209	6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	53,14	1,7	8,1	4,12	0	Citoplasma	(Cheng et al., 2016; Hutchinson et al., 2014)

Q9Y6G9	DC1L1	Citoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	56,58	2,3	11,2	4,06	0	Núcleo	(Döhmer et al., 2005)
O00186	STXB3	Syntaxin-binding protein 3	67,76	3,7	9,3	3,94	0	Membrana	(Hutchinson et al., 2014)
Q02241	KIF23*	Kinesin-like protein KIF23	110,06	5	13,6	3,73	0	Núcleo	(Hutchinson et al., 2014)
Q9H223	EHD4	EH domain-containing protein 4	61,18	3,7	12,9	3,72	0	Membrana, endosoma, RE, núcleo	(Bregnard et al., 2013; Santos et al., 2012)
P17812	PYRG1	CTP synthase 1	66,69	5,7	12,6	3,52	0	Citoplasma, extracelular	(Hutchinson et al., 2014)
P61221	ABCE1	ATP-binding cassette sub-family E membre 1	67,31	2,3	5,5	3,4	0	Citoplasma, núcleo	(Krishnan et al., 2008)
P50570	DYN2*	Dynamain-2	98,06	5,7	17,3	3,25	0	Membrana, citoplasma, sinapsis	(Mendez et al., 2014)
P11171	41	Protein 4,1	97,02	3,3	5,5	3,2	0	Citoesqueleto	
Q14254	FLOT2	Flotillin-2	47,06	1,7	5,5	2,88	0	Membrana	(Hutchinson et al., 2014; Laliberte et al., 2006)
P45974	UBP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	95,79	7,3	13,1	2,77	0	Lisosoma	
P41250	SYG	Glycine-tRNA ligase	83,17	3,7	11,4	2,65	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
Q9NTK5	OLA1	Obg-like ATPase 1	44,74	1,7	10,4	2,6	0	Citoplasma	(Hutchinson et al., 2014)
Q96QK1	VPS35*	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	91,71	3,3	5,9	1,84	0	Endosoma	(Chertova et al., 2006; Hutchinson et al., 2014; Yin et al., 2016)
P26639	SYTC	Threonine-tRNA ligase	83,44	1,7	4,9	1,72	0	Citoplasma	
Q06210	GFPT1	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1	78,81	1,7	5	1,62	0	Citoplasma	
Q99829	CPNE1	Copine-1	59,06	1,7	6,3	1,6	0	Citoplasma	(Santos et al., 2012)
O00410	IPO5	Importin-5	123,63	2,3	3,3	0,86	0	Citoplasma, núcleo	(Deng et al., 2006; Hutchinson et al., 2014)
Q9Y678	COPG1*	Coatomer subunit gamma-1	97,72	1,3	6,8	0,42	0	Golgi	(Hutchinson et al., 2014; Watanabe et al., 2014)



- <sup>a</sup> Número medio de péptidos observados con una confianza mayor del 95%.
  - <sup>b</sup> Cobertura media de las proteínas medida por LC-MS/MS.
  - <sup>c</sup> Abundancia relativa media.
  - <sup>d</sup> Número de dominios transmembrana identificados mediante UniProt.
  - <sup>e</sup> Localización subcelular basado en el programa Hum-mPLoc 2.0. Ubicua: más de cuatro localizaciones.
  - <sup>f</sup> Previamente identificadas como participante en infecciones virales.
  - <sup>g</sup> Previamente identificadas en viriones o VLPs.
- \* Pertenece a la red de proteínas descrita en la **figura 9**.

Se observó que un 79% de las proteínas han sido identificadas asociadas a otros virus como interactores directos o indirectos, esta información también ha sido incluida en la **Tabla 9**. Concretamente, las dos últimas columnas hacen referencia a si la proteína ha sido identificada previamente con infecciones virales o si se ha detectado su presencia en otras partículas virales, ya sean en viriones o en VLPs.

Muchos virus utilizan los mismos procesos celulares, de forma que es de esperar una red de interacción patógeno-hospedador similar. El hecho de que diferentes familias de virus usen los mismos procesos celulares para completar su ciclo vital es, desde el punto de vista terapéutico, favorable ya que la inhibición temporal de alguno de ellos puede suponer el bloqueo de más de una familia viral independientemente de su naturaleza (Heaton et al., 2016; Rialdi et al., 2017).

La identificación de proteínas de membrana del hospedador presentes en las VLPs resulta especialmente atractiva. La presencia de componentes celulares en la superficie de los viriones promueve la unión del virus a la célula y su infectividad, posiblemente interviniendo en la concentración del virus en la superficie viral, donde la unión del virus con el receptor celular se daría con mayor facilidad (Fortin et al., 1997; Walker et al., 2002). De acuerdo con este punto de vista, hemos identificado en nuestros ensayos proteínas de adhesión celular como la CD9 y receptores como el TFR1.

En las VLPs también hemos encontrado miembros de la familia de proteínas Rab y Vps, participantes en procesos de transporte vesicular. De hecho, la familia de proteínas Vps está relacionada con la salida de algunos virus de las células hospedadoras (Chen and Lamb, 2008). Esto sugeriría que NiV podría utilizar las vías endosómicas o exosómicas en su ciclo biológico. Lo cual parece respaldado por el hecho de que en nuestras muestras encontramos proteínas del citoesqueleto como la actina y la anexina. Además, se ha observado que algunas formas de la anexina pueden participar en la fusión y acoplamiento de orgánulos secretorios en la membrana plasmática. Por lo tanto, es posible que algunas de las proteínas de membrana celulares adquiridas por los viriones participen en el proceso de entrada a las células hospedadoras (Chertova et al., 2006; Morita and Sundquist, 2004)

Las proteínas virales no incluidas en las VLPs son proteínas de unión al genoma viral que no contribuyen a la formación de las partículas virales, tales como la proteína N, P y L (**Figura 43**). A pesar de ello, no podemos descartar que estas proteínas incorporen

proteínas del hospedador a través de las interacciones proteína-proteína. Incluso la ausencia de aquellas proteínas que no son incluidas en el virion, pero si producidas en el ciclo viral podrían tener un impacto en la composición de las VLPs. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína C de NiV recluta a la proteína Tsg101 para promover la liberación eficiente de los viriones en una vía dependiente de ESCRT y, de hecho, la interrupción de esta interacción o la inhibición de Tsg101, afecta a la liberación de NiV *in vivo* (Park et al., 2016). Además, también pueden existir interacciones entre el RNA viral no incluido en las VLPs con proteínas de la célula. Todas estas interacciones incorporarían en los viriones proteínas celulares que no serán detectadas en nuestros ensayos.

Por todo esto somos conscientes de que la elección de las VLPs sobre los viriones para determinar el contenido de proteínas del hospedador puede tener algún impacto en los resultados.

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio para la producción de VLPs fueron desarrollados en la línea celular HEK293T (células derivadas de riñón humano). Aunque el NiV puede replicarse en la línea celular seleccionada (Ciancanelli and Basler, 2006; Park et al., 2016), las células renales no son su sitio primario de infección. Algunas de las células que infecta NiV en su ciclo biológico incluyen células epiteliales que recubren las vías respiratorias, células del músculo liso arterial, neumocitos, epitelio respiratorio bronquial, macrófagos alveolares, leucocitos, células dendríticas y neuronas (Baseler et al., 2016; Talekar et al., 2011; Tiong et al., 2018). En cualquier caso, como se puede ver en la **Tabla 10** el perfil de expresión de las proteínas identificadas indica que la mayoría de ellas se expresan de forma ubicua. Por lo tanto, el impacto que la línea celular tenga sobre los resultados, aunque podría existir, no debería ser significativo. La **Tabla 10** muestra un resumen de la expresión de las proteínas identificadas en 83 tipos celulares de diferentes tejidos humanos (para ver la tabla ampliada consultar el **ANEXO 4**). En la tabla se muestra el número de veces que la proteína se detectó, las que no se detectó y el número de veces en la que no existían datos en los tipos celulares analizados. El porcentaje de distribución que se indica se basa en el número de veces que se detectó una proteína en cualquier tipo celular o tejido en comparación con el número total de eventos (número de veces detectado / número de veces detectado + no detectado). La información sobre la expresión para cada proteína se extrajo del *Human Protein Atlas*.

**Tabla 10:** Proteínas del hospedador identificadas en las VLPs del virus Nipah.

Código Uniprot	Nombre	MW (kDa)	Detectado	No detectado	Sin datos	% distribución
O00560	SDCB1	32,44	50	29	5	63,29
P53985	MOT1	53,94	42	35	7	54,55
P61026	RAB10*	22,54	74	6	4	92,5
P14174	MIF	12,48	56	17	11	76,71
P61006	RAB8A*	23,67	0	0	84	–
Q01650	LAT1	55,01	66	16	2	80,49
O43657	TSN6	27,56	39	41	4	48,75
P21926	CD9*	25,42	56	20	8	73,68
Q13501	SQSTM	47,69	62	18	4	77,5
P61106	RAB14*	23,9	69	9	6	88,46
Q9H444	CHM4B	24,95	61	21	2	74,39
P08754	GNAI3*	40,53	26	50	8	34,21
P61586	RHOA*	21,77	64	14	6	82,05
P51148	RAB5C*	23,48	65	9	10	87,84
Q9Y696	CLIC4	28,77	14	67	3	17,28
P30626	SORCN	21,68	30	49	5	37,97
Q969P0	IGSF8*	65,03	8	68	8	10,53
P02786	TFR1*	84,87	54	27	3	66,67
P07741	APT	19,61	40	43	1	48,19
O75131	CPNE3	60,13	67	15	2	81,71
Q92783	STAM1*	59,18	65	15	4	81,25
Q9P2B2	FPRP*	98,56	47	32	5	59,49
P08133	ANXA6	75,87	57	25	2	69,51
P16152	CBR1	30,38	66	15	3	81,48
P00492	HPRT	24,58	61	19	4	76,25
Q15043	S39AE	54,21	73	3	8	96,05
Q15181	IPYR	32,66	71	10	3	87,65
Q53EZ4	CEP55*	54,18	33	47	4	41,25
P13797	PLST	70,81	67	14	3	82,72
P54577	SYYC	59,14	81	1	2	98,78
Q9H0H5	RGAP1	71,03	29	52	3	35,8
Q12846	STX4*	34,18	61	15	8	80,26
Q92597	NDRG1	42,84	75	4	5	94,94
Q5JWF2	GNAS1*	111,03	47	32	5	59,49
Q5ZPR3	CD276	57,24	70	11	3	86,42
O60637	TSN3	28,02	37	40	7	48,05
P31939	PUR9	64,62	65	16	3	80,25
P06744	G6PI	63,15	74	8	2	90,24
P49006	MRP	19,53	56	24	4	70
P08243	ASNS	64,37	31	48	5	39,24
P61158	ARP3	47,37	66	11	7	85,71
P28072	PSB6	25,36	73	4	7	94,81
O14964	HGS*	86,19	56	25	3	69,14

Q8IV08	PLD3	54,71	67	15	2	81,71
Q92542	NICA	78,41	53	26	5	67,09
P49588	SYAC	106,81	71	9	4	88,75
Q99961	SH3G1	41,49	64	15	5	81,01
Q99615	DNJC7	56,44	68	11	5	86,08
P52209	6PGD	53,14	56	25	3	69,14
Q9Y6G9	DC1L1	56,58	75	7	2	91,46
O00186	STXB3	67,76	52	28	4	65
Q02241	KIF23*	110,06	79	1	4	98,75
Q9H223	EHD4	61,18	24	57	3	29,63
P17812	PYRG1	66,69	78	0	6	100
P61221	ABCE1	67,31	77	4	3	95,06
P50570	DYN2*	98,06	62	18	4	77,5
P11171	41	97,02	0	81	3	0
Q14254	FLOT2	47,06	81	0	3	100
P45974	UBP5	95,79	62	13	9	82,67
P41250	SYG	83,17	79	1	4	98,75
Q9NTK5	OLA1	44,74	81	2	1	97,59
Q96QK1	VPS35*	91,71	70	9	5	88,61
P26639	SYTC	83,44	73	7	4	91,25
Q06210	GFPT1	78,81	0	0	84	–
Q99829	CPNE1	59,06	42	40	2	51,22
O00410	IPO5	123,63	58	21	5	73,42
Q9Y678	COPG1*	97,72	79	1	4	98,75

\* Pertenece a la red de proteínas descrita en la **Figura 50**.

#### *Identificación de la localización celular y función de las proteínas del hospedador incluidas en las VLPs*

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, ver materiales y métodos) con las proteínas obtenidas (**Tabla 11**). Este estudio reveló que las proteínas del hospedador incorporadas o unidas a las VLPs participan principalmente en el transporte de vesículas de membrana desde los compartimentos membranosos internos a la membrana plasmática o viceversa. De hecho, los compartimentos celulares enriquecidos por el análisis, corresponden principalmente a componentes intracelulares de las rutas endocítica y secretora. Estas proteínas celulares podrían encontrarse en el virión porque participan en el transporte de partículas virales a la superficie celular o porque transportan componentes celulares que se integran dentro del virión.

**Tabla 11:** Análisis de enriquecimiento GSEA de las proteínas del hospedador identificadas en las VLPs del NiV.

Nombre del conjunto de genes [# Genes]	Overlap <sup>a</sup>	q-value <sup>b</sup>
<b>GO Biological process</b>		
<i>Vesicle mediated transport [1239]</i>	12	8,52 e – 8
<i>Establishment of protein localization [1423]</i>	12	1,4 e – 7
<i>Membrane organization [899]</i>	9	4,79 e – 6
<i>Protein oligomerization [248]</i>	6	8,5 e – 6
<i>Vacuolar transport [253]</i>	6	8,5 e – 6
<i>Response to endogenous stimulus [1450]</i>	10	1,03 e – 5
<i>Single organism membrane fusion</i>	4	3,45 e – 4
<i>Golgi vesicle transport [319]</i>	5	4,36 e – 4
<b>GO Cellular component</b>		
<i>Endosome [793]</i>	12	6,13 e – 11
<i>Vacuole [1180]</i>	13	1,27 e – 10
<i>Perinuclear region of cytoplasm [642]</i>	9	3,9 e – 8
<i>Intracellular vesicle [1259]</i>	11	3,94 e – 8
<i>Anchoring junction [489]</i>	8	9,46 e – 8
<i>Endocytic vesicle [256]</i>	6	1,19 e – 6
<i>Secretory vesicle [461]</i>	7	1,28 e – 6
<i>Recycling endosome [131]</i>	5	1,4 e – 6

<sup>a</sup> # número de genes

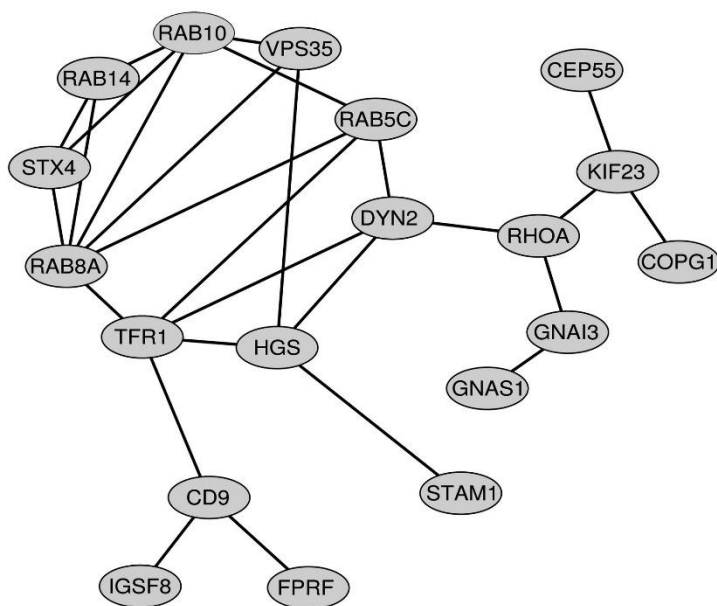
<sup>b</sup> False Discovery Rate, p-valor ajustado

Se indican en inglés los términos GO asignados por el GSEA a las proteínas analizadas.

Seguidamente, se utilizó la base de datos STRING (Szklarczyk et al., 2017) para identificar grupos e interacciones entre las proteínas celulares detectadas en nuestros análisis. La presencia de una red de interacciones entre las proteínas celulares encontradas en las VLPs puede ayudar a definir el papel de estas proteínas en la infección viral dado que refuerza la implicación de una determinada ruta/proceso celular. STRING es un repositorio de interacciones proteína-proteína que incluye asociaciones directas e indirectas demostradas en la bibliografía, así como interacciones predichas.

Así pues, se analizaron las interacciones existentes entre las proteínas celulares identificadas en las VLPs del NiV, revelándose una red de interacción entre un subgrupo

de dichas proteínas (**Figura 50 y Tabla 9**). Una vez más, se analizó la función y localización de este subgrupo de proteínas usando la herramienta GSEA (**Tabla 12**). Como se muestra en la tabla, las proteínas de la red analizadas están asociadas con vesículas endocíticas y secretoras. Alternativamente, analizamos la función de las proteínas celulares incorporadas en las VLPs, pero no incluidas en la red de interacción encontrada. En este caso el GSEA reveló el enriquecimiento de procesos GO relacionados con la oligomerización de proteínas, la respuesta a iones calcio o iones metálicos, procesos metabólicos y de biosíntesis de lípidos y las ya mencionadas uniones célula-célula (**Tabla 13**).



**Figura 50:** Representación de la red de interacción entre las proteínas encontradas en las VLPs de NiV. Se representan un total de 27 interacciones (líneas) y 19 proteínas (nodos). El nombre de las proteínas se incluye en los nodos. Los datos se obtuvieron de la base de datos STRING.

**Tabla 12:** Análisis de enriquecimiento GSEA de las proteínas del hospedador del pertenecientes a la red de proteínas detectadas mediante la herramienta STRING.

Nombre del conjunto de genes [# Genes]	Overlap <sup>a</sup>	q-valor <sup>b</sup>
<b>GO Biological process</b>		
<i>Protein localization [1805]</i>	10	1.09 e-8
<i>Vesicle mediated transport [1239]</i>	9	1.44 e-8
<i>Intracellular protein transport [781]</i>	7	1.09 e-6
<i>Membrane organization [899]</i>	7	2.41 e-6
<i>Vacuolar transport [253]</i>	5	5.92 e-6
<i>Single organism membrane fusion [128]</i>	4	2.27 e-5
<i>Membrane fusion [157]</i>	4	4.36 e-5
<i>Cell division [460]</i>	5	5.33 e-5
<i>Response to endogenous stimulus [1008]</i>	6	6.62 e-5
<i>Secretion [588]</i>	5	1.3 e-4
<i>Cytokinesis [84]</i>	3	3.91 e-4
<i>Nuclear transport [355]</i>	4	5.42 e-4
<b>GO Cellular component</b>		
<i>Vacuole [1180]</i>	9	4.87 e-9
<i>Endosome [793]</i>	8	6.03 e-9
<i>Secretory vesicle [461]</i>	6	2.29 e-7
<i>Midbody [132]</i>	4	3.69 e-6
<i>Transgolgi network [193]</i>	4	1.54 e-5
<i>Cell projection [1786]</i>	7	1.73 e-5
<i>Lytic vacuole membrane [275]</i>	4	5.34 e-5
<i>Cell substrate junction [398]</i>	4	1.37 e-4
<i>Extrinsic component of membrane [136]</i>	3	2.09 e-4
<i>Centrosome [487]</i>	4	2.5 e-4
<i>Anchoring junction [489]</i>	4	2.5 e-4
<i>Lytic vacuole [526]</i>	4	2.9 e-4
<i>Cytoplasmic side of membrane [170]</i>	3	3.18 e-4

<sup>a</sup> # número de genes

<sup>b</sup> False Discovery Rate, p-valor ajustado

Se indican en inglés los términos GO asignados por el GSEA a las proteínas analizadas.



**Tabla 13:** Análisis de enriquecimiento GSEA de las proteínas del hospedador excluidas de la red de proteínas mostrada en la **Figura 50**.

Nombre del conjunto de genes [# Genes]	Overlap <sup>a</sup>	q-valor <sup>b</sup>
<b>GO Biological process</b>		
<i>Protein oligomerization [434]</i>	6	2,56 e-5
<i>Macromolecular complex assembly [1398]</i>	7	6,24 e-4
<i>Cellular response to calcium ion [49]</i>	3	7,52 e-4
<i>Response to metal ion [333]</i>	4	4,63 e-3
<i>Single organism biosynthesis [1340]</i>	6	4,63 e-3
<i>Organophosphate metabolic process [885]</i>	5	8,08 e-3
<i>Prostanoid biosynthetic process [19]</i>	2	9,95 e-3
<i>Glutamine metabolic process [23]</i>	2	1,08 e-2
<i>Small molecule metabolic process [1767]</i>	6	1,11 e-2
<i>Lipid biosynthetic process [539]</i>	4	1,18 e-2
<b>GO Cellular component</b>		
<i>Perinuclear region of cytoplasm [642]</i>	5	2,24 e-3
<i>Cell junction [383]</i>	4	3,84 e-3
<i>Anchoring junction [489]</i>	4	6,66 e-3
<i>Recycling endosome membrane [42]</i>	2	1,43 e-2
<i>Cell surface [757]</i>	4	1,61 e-2
<i>Endosome [793]</i>	4	1,61 e-2

<sup>a</sup> # número de genes

<sup>b</sup> *False Discovery Rate*, p-valor ajustado

Se indican en inglés los términos GO asignados por el GSEA a las proteínas analizadas.

Como se ha mencionado, las proteínas del hospedador participan principalmente en el transporte de proteínas y vesículas desde compartimentos membranosos internos hasta la superficie celular. La interacción de esta categoría funcional de proteínas con un virus

envuelto no es inesperada. Al reclutar la maquinaria de clasificación o transporte, el virus garantiza que sus vesículas egresen de la célula y sean internalizadas en la siguiente ronda de infección de forma eficiente. Del mismo modo, la presencia de proteínas que participan en la oligomerización puede estar relacionada con el ensamblaje celular y la salida del virus. Sin embargo, la presencia de proteínas relacionadas con la respuesta a iones metálicos y componentes de los receptores de calcio observados, a pesar de su identificación previa en partículas virales es más intrigante (Hutchinson et al., 2014). (Krishnan et al., 2008). En cualquier caso, para llegar a comprender totalmente el papel de estas proteínas durante el ciclo biológico del NiV, se necesitaría realizar experimentos de tipo *knock down/out* utilizando siRNA o CRISPR.

El proceso por el cual las proteínas celulares se incorporan o unen a los viriones es otra pregunta compleja que podemos hacernos. Probablemente, el virus incorpora, a través de las interacciones patógeno-hospedador, aquellas proteínas o funciones que son fundamentales o beneficiosas para completar su ciclo biológico.

Por el contrario, algunas otras proteínas, que también podrían ser necesarias para el virus, podrían ser incorporadas al virión de forma pasiva sin que existan interacciones virus-hospedador que faciliten su incorporación. En este caso, la presencia de estas proteínas en el sitio de ensamblaje es la explicación más sencilla para su localización final en las VLPs. En el caso del virus de la Influenza A se ha propuesto que algunas proteínas podrían ser incorporadas en el virión debido a su ubicación en balsas lipídicas, que es precisamente en el sitio de salida del virus (Shaw et al., 2008). Asumiendo que este fenómeno es común en el ensamblaje y salida de los virus envueltos, un estudio detallado de la localización subcelular de las proteínas del hospedador incorporados en los viriones del virus Nipah, podría ofrecer una indicación del punto de ensamblaje del virus y del sitio de salida.

Finalmente, algunas proteínas celulares pondrían estar en el virión como resultado de la interacción de las proteínas virales y los mecanismos de defensa celular (Liu et al., 2012; Longhi et al., 2007; Shaw et al., 2008). En ocasiones, estas interacciones ocurren con el propósito de inhibir la respuesta inmunitaria del hospedador mediante la unión a proteínas celulares que actúan como mediadores de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se ha descrito que la glicoproteína G del metapneumovirus, se une a RIG-I, un sensor intracelular del RNA viral (Bao et al., 2008).

Finalmente, con el objetivo de comenzar la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas basándonos en los resultados obtenidos nos pareció interesante utilizar la base de datos DrugBank (Wishart, 2006) con la intención de identificar potenciales fármacos para tratar la infección de NiV teniendo en cuenta los nuevos conocimientos adquiridos. DrugBank es un recurso bioinformático que combina información de medicamentos y sus dianas celulares (Dapat and Oshitani, 2016).

Así, las secuencias de proteínas de las 67 proteínas del hospedador identificadas en las VLPs de NiV se introdujeron en el motor de búsqueda de DrugBank y se recopilieron 129 fármacos dirigidos contra éstas (ver materiales y métodos). Estos 129 compuestos son inhibidores de las funciones celulares utilizadas por el virus y por tanto representan tratamientos potenciales (**ANEXO 5**). Es necesario indicar que la base de datos DrugBank busca medicamentos basados en la homología de secuencia de las proteínas, de forma que el nombre de la proteína mostrado en el **ANEXO 5** podría no coincidir con las proteínas incluidas en nuestra lista de resultados. Hay que destacar también que las proteínas diana, a pesar de ser incorporadas en las VLPs, pueden no ser necesarias para la infección viral. Por tanto, su potencial como antivirales debería ser probado en ensayos funcionales.

## **R8. Identificación de proteínas virales en las VLPs del virus Nipah**

Como se ha demostrado previamente, hemos establecido un sistema basado en las VLPs del NiV, que nos ha permitido estudiar las proteínas de la célula hospedadora asociadas a dichas estructuras.

Llegados a este punto, decidimos identificar mediante LC-MS/MS la presencia las proteínas F, G y M del NiV en las preparaciones de las VLPs, así como las ratios entre ellas. La **Tabla 14** muestra el número medio de péptidos identificados, el porcentaje medio de cobertura y la abundancia relativa de cada proteína viral.

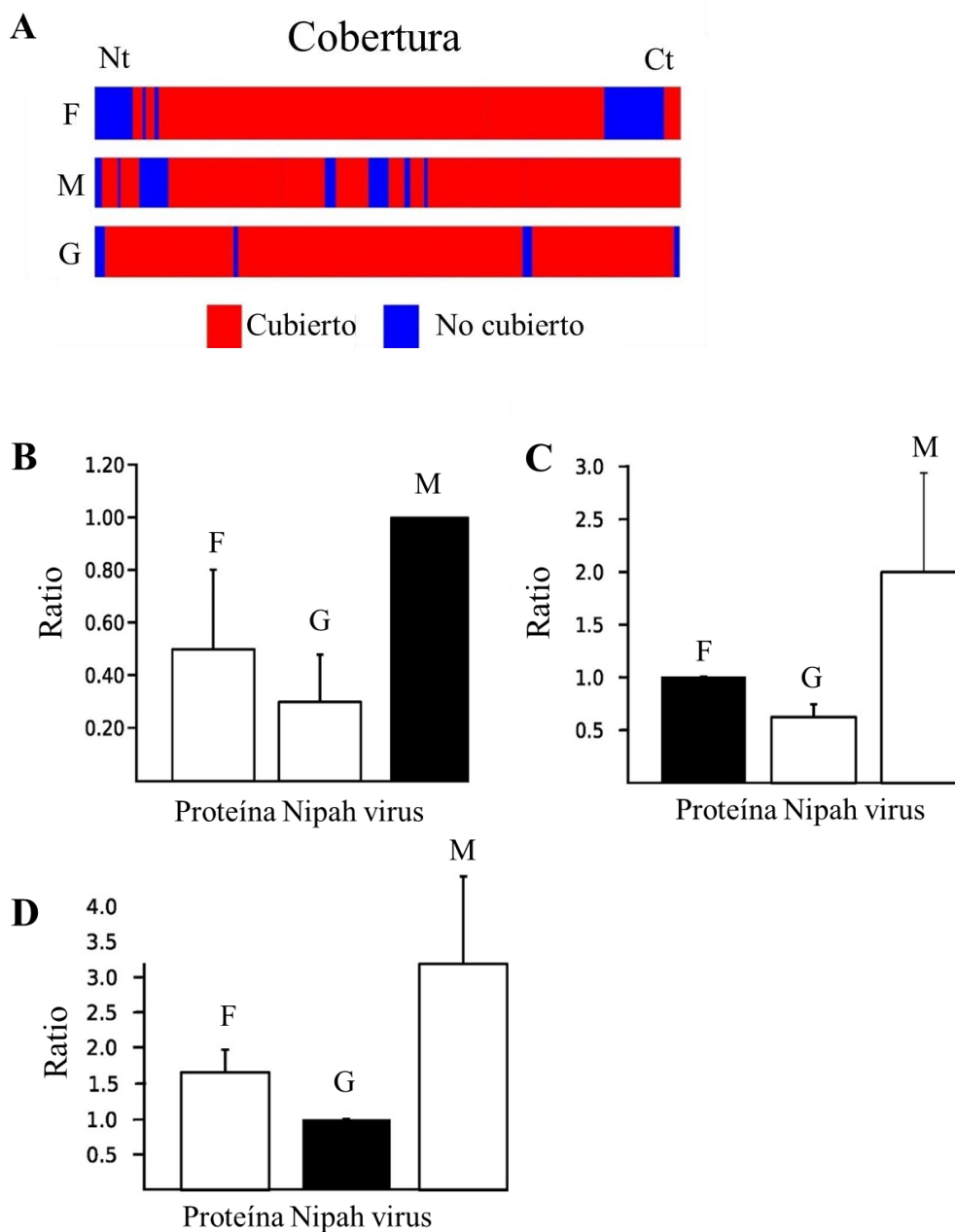
**Tabla 14:** *Proteínas virales identificadas en las VLPs del virus Nipah.*

<b>Código Uniprot</b>	<b>Nombre proteína</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Péptidos<sup>a</sup></b>	<b>Cobertura<sup>b</sup></b>	<b>Abundancia relativa<sup>c</sup></b>
Q9IH63	F	60,28	153	70,5	1.373
Q9IH62	G	67,04	158	77,5	823
Q9IK90	M	39,93	112	81,4	2.753

<sup>a</sup> Número de péptidos observados con un 95% de confianza

<sup>b</sup> Cobertura media de las proteínas por LC-MS/MS

<sup>c</sup> Abundancia relativa media



**Figura 51: Las proteínas F, G y M del virus Nipah en las VLPs.** *A.* Representación esquemática de las regiones cubiertas por el LC-MS/MS de las proteínas F, M y G. En rojo se representa la zona cubierta y en azul la no cubierta. *B, C y D* son gráficas de barra que representan la abundancia de las proteínas F, G y M de las VLPs de NiV. La proteína considerada como valor de referencia está marcada en negro.

El LC-MS/MS indica una ratio 2:1:1 (M:F:G) para las proteínas (**Figura 51B-D**). Es necesario tener en cuenta que la relación de plásmidos M:F:G puede influir en la tasa de producción de las VLPs (Walpita et al., 2011) y también el contenido de las proteínas virales de las VLPs (Johnston et al., 2017). Trabajos cualitativos anteriores basados en análisis con SDS-PAGE, informaron de una correlación inversa entre la abundancia de proteína en los viriones y VLPs y su orden en el genoma. Así, se ha observado, que, durante la replicación, el NiV transcribe más abundantemente los genes proximales al extremo 3'. Esta estequiometría es importante para la interacción entre las proteínas virales y la eficiencia de producción (Walpita et al., 2011; Wang et al., 2001). De acuerdo a trabajos publicados, se ha observado que M es la proteína más abundante en las VLPs seguidos de F y G (**Tabla 14**) (Johnston et al., 2017; Landowski et al., 2014; Patch et al., 2007). Nuestros datos están de acuerdo con valores publicados, a pesar de las diferentes metodologías empleadas, lo cual valida nuestros resultados e incrementa la confianza en nuestro análisis.

La relación entre las proteínas virales y celulares, también puede estimarse mediante los resultados de LC-MS/MS. Aproximadamente el 78% del contenido proteico en las VLPs tiene un origen viral, consistente con datos previos que indican la presencia de muchas más proteínas virales que celulares en los viriones de virus envueltos (Shaw et al., 2008).

En conjunto, nuestros datos pueden contribuir al conocimiento del ciclo de vida del NiV. Además, una mejor comprensión de la infección viral podría facilitar el diseño de más estudios experimentales y futuros intentos de desarrollar agentes antivirales eficaces.



# **CONCLUSIONES**





1. En total se identificaron 67 proteínas celulares asociadas a las VLPs de NiV, de las cuales pudimos calcular su abundancia relativa.
2. Las proteínas celulares identificadas participaban, principalmente, en el transporte de proteínas y/o vesículas desde compartimentos membranosos internos hasta la superficie celular.
3. Las proteínas virales representaron el 78% de las proteínas encontradas en las VLPs.
4. Se determinó que la ratio era de aproximadamente 1:1:2 entre las proteínas F, G y M en las partículas virales.



# BIBLIOGRAFÍA



- Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., Kutter, E.M., 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1, 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Aebersold, R., Mann, M., 2016. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347–355. <https://doi.org/10.1038/nature19949>
- Aguilar, H.C., Lee, B., 2011. Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 13. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001754>
- Aguilar, H.C., Matreyek, K.A., Choi, D.Y., Filone, C.M., Young, S., Lee, B., 2007. Polybasic KKR motif in the cytoplasmic tail of Nipah virus fusion protein modulates membrane fusion by inside-out signaling. *J. Virol.* 81, 4520–4532. <https://doi.org/10.1128/JVI.02205-06>
- Ahmad, S.B., Tin Tan, C., 2014. Nipah encephalitis – an update. *Med J Malaysia* 69, 9.
- Amarelle, L., Lecuona, E., Sznajder, J.I., 2017. Tratamiento antigripal: fármacos actualmente utilizados y nuevos agentes en desarrollo. *Arch. Bronconeumol.* 53, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.07.004>
- Ang, B.S.P., Lim, T.C.C., Wang, L., 2018. Nipah virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 56, e01875-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01875-17>
- Aoki, T., 2017. A Comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. *membranes* 7, 56. <https://doi.org/10.3390/membranes7040056>
- Arankalle, V.A., Bandyopadhyay, B.T., Ramdasi, A.Y., Jadi, R., Patil, D.R., Rahman, M., Majumdar, M., Banerjee, P.S., Hati, A.K., Goswami, R.P., Neogi, D.K., Mishra, A.C., 2011. Genomic characterization of Nipah virus, West Bengal, India. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 907–909. <https://doi.org/10.3201/eid1705.100968>
- Aschtgen, M.S., Zoued, A., Lloubès, R., Journet, L., Cascales, E., 2012. The C-tail anchored TssL subunit, an essential protein of the enteroaggregative *Escherichia coli* Sci-1 Type VI secretion system, is inserted by YidC: Characterization of the T6SS TssL Protein. *Microbiology Open* 1, 71–82. <https://doi.org/10.1002/mbo3.9>
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L.,

Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>

Assunção-Miranda, I., Amaral, F.A., Bozza, F.A., Fagundes, C.T., Sousa, L.P., Souza, D.G., Pacheco, P., Barbosa-Lima, G., Gomes, R.N., Bozza, P.T., Da Poian, A.T., Teixeira, M.M., Bozza, M.T., 2010. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J.* 24, 218–228. <https://doi.org/10.1096/fj.09-139469>

Azim, M.K., Goehring, W., Song, H.K., Ramachandran, R., Bochtler, M., Goettig, P., 2005. Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci.* 14, 1357–1362. <https://doi.org/10.1110/ps.04970405>

Backovic, M., Jardetzky, T.S., 2011. Class III viral membrane fusion proteins, in: Dittmar, T., Zänker, K.S. (eds.), *Cell Fusion in Health and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 950. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0782-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0782-5_3)

Bai, Y., 2015. Detecting protein-protein interactions by gel filtration chromatography, in: Meyerkord, C.L., Fu, H. (Eds.), *Protein-Protein Interactions*. Springer New York, New York, NY, pp. 223–232. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_13)

Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.*, 35, 7.

Bao, X., Liu, T., Shan, Y., Li, K., Garofalo, R., Casola, A., 2008. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS pathogens*. 4, e1000077. [10.1371/journal.ppat.1000077](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000077).

Baseler, L., Scott, D.P., Saturday, G., Horne, E., Rosenke, R., Thomas, T., Meade-White, K., Haddock, E., Feldmann, H., de Wit, E., 2016. Identifying early target cells of Nipah virus infection in syrian hamsters. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005120. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005120>

Basler, C.F., 2012. Nipah and Hendra Virus interactions with the innate immune system, in: Lee, B., Rota, P.A. (Eds.), *Henipavirus*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 123–152. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_209](https://doi.org/10.1007/82_2012_209)

- Bauer, M., Ahrné, E., Baron, A.P., Glatter, T., Fava, L.L., Santamaria, A., Nigg, E.A., Schmidt, A., 2014. Evaluation of data-dependent and -independent mass spectrometric workflows for sensitive quantification of proteins and phosphorylation sites. *J. Proteome Res.* 13, 5973–5988. <https://doi.org/10.1021/pr500860c>
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., Avaeva, S.M., 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171, 266–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90484-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90484-8)
- Baytshtok, V., Fei, X., Grant, R.A., Baker, T.A., Sauer, R.T., 2016. A Structurally dynamic region of the HslU intermediate domain controls protein degradation and ATP hydrolysis. *structure* 24, 1766–1777. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.08.012>
- Beha, D., Deitermann, S., Müller, M., Koch, H.G., 2003. Export of  $\beta$ -lactamase is independent of the signal recognition particle. *J. Biol. Chem.* 278, 22161–22167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300929200>
- Bekdemir, A., Sanavio, B., Martinelli, C., Donalisio, M., Rameix Welti, M.A., Eleouet, J.F., Han, Y., Kaiser, L., Vukovic, L., Tapparel, C., Král, P., Krol, S., Lembo, D., Stellacci, F., 2018. Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism. *Nat. Mater.* 17, 195–203. <https://doi.org/10.1038/nmat5053>
- Bharaj, P., Wang, Y.E., Dawes, B.E., Yun, T.E., Park, A., Yen, B., Basler, C.F., Freiberg, A.N., Lee, B., Rajsbaum, R., 2016. The matrix protein of Nipah virus targets the E3-ubiquitin ligase TRIM6 to inhibit the IKK $\epsilon$  kinase-mediated type-I IFN antiviral response. *PLOS Pathog.* 12, e1005880. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005880>
- Birkhead, M., Paweska, J., 2015. A Microscopic introduction to virus taxonomy. *Communicable diseases surveillance bulletin*, 13, 52-61.
- Blattmann, P., Stutz, V., Lizzo, G., Richard, J., Gut, P., Aebersold, R., 2019. Generation of a zebrafish SWATH-MS spectral library to quantify 10,000 proteins. *Sci. Data* 6, 190011. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.11>
- Boekel, C., 2009. Integration and topology of membrane proteins. Department of Biochemistry and Biophysics. (Tesis). Stockholm University, Stockholm.

- Bollinger, J.G., Stergachis, A.B., Johnson, R.S., Egertson, J.D., MacCoss, M.J., 2016. Selecting optimal peptides for targeted proteomic experiments in human plasma using in vitro synthesized proteins as analytical standards, in: Sechi, S. (Ed.), quantitative proteomics by mass spectrometry. Springer New York, New York, NY, pp. 207–221. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3524-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3524-6_12)
- Borgese, N., Brambillasca, S., Colombo, S., 2007. How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.019>
- Borgese, N., Righi, M., 2010. Remote origins of tail-anchored proteins. *Traffic* 11, 877–885. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01068.x>
- Bossart, K.N., Rockx, B., Feldmann, F., Brining, D., Scott, D., LaCasse, R., Geisbert, J.B., Feng, Y.R., Chan, Y.P., Hickey, A.C., Broder, C.C., Feldmann, H., Geisbert, T.W., 2012. A Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects african green monkeys from Nipah virus challenge. *Sci. Transl. Med.* 4(146), 146ra107. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004241>
- Brahma, A., De, D., Bhattacharyya, D., 2009. Rayleigh scattering technique as a method to study protein–protein interaction using spectrofluorimeters. *Current Science*, 96; 7, 940-946
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., Borgese, N., 2006. Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* 175, 767–777. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608101>
- Brasier, García-Sastre, Lemon (Eds.), 2009. Cellular signaling and innate immune responses to RNA virus infections. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555815561>
- Bregnard, C., Zamborlini, A., Leduc, M., Chafey, P., Camoin, L., Saib, A., Benichou, S., Danos, O., Basmaciogullari, S., 2013. Comparative Proteomic Analysis of HIV-1 Particles Reveals a Role for Ezrin and EHD4 in the Nef-Dependent Increase of Virus Infectivity. *J. Virol.* 87, 3729–3740. <https://doi.org/10.1128/JVI.02477-12>
- Broder, C.C., Xu, K., Nikolov, D.B., Zhu, Z., Dimitrov, D.S., Middleton, D., Pallister, J., Geisbert, T.W., Bossart, K.N., Wang, L.F., 2013. A treatment for and vaccine against the



deadly Hendra and Nipah viruses. *Antiviral Res.* 100, 8–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.012>

Brown, H.A., Thomas, P.G., Lindsley, C.W., 2017. Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 351–367.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.252>

Brudner, M., Karpel, M., Lear, C., Chen, L., Yantosca, L.M., Scully, C., Sarraju, A., Sokolovska, A., Zariffard, M.R., Eisen, D.P., Mungall, B.A., Kotton, D.N., Omari, A., Huang, I.-C., Farzan, M., Takahashi, K., Stuart, L., Stahl, G.L., Ezekowitz, A.B., Spear, G.T., Olinger, G.G., Schmidt, E.V., Michelow, I.C., 2013. Lectin-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection via Soluble and Transmembrane C-type Lectin Receptors. *PLoS ONE* 8, e60838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060838>

Burrell, C.J., Howard, C.R., Murphy, F.A., 2017. Poxviruses, in: Fenner and White's *Medical Virology*. Elsevier, pp. 229–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00016-3>

Cagno, V., Andreozzi, P., D'Alicarnasso, M., Jacob Silva, P., Mueller, M., Galloux, M., Le Goffic, R., Jones, S.T., Vallino, M., Hodek, J., Weber, J., Sen, S., Janeček, E.-R., Bekdemir, A., Sanavio, B., Martinelli, C., Donalisio, M., Rameix Welti, M.-A., Eleouet, J.-F., Han, Y., Kaiser, L., Vukovic, L., Tapparel, C., Král, P., Krol, S., Lembo, D., Stellacci, F., 2018. Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism. *Nat. Mater.* 17, 195–203. <https://doi.org/10.1038/nmat5053>

Cáceres-Martínez, J., Vasquez Yeomans, R., 2004. Cómo clasificar y nombrar a los virus. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA.* 1. 3-5.

Campillo-Balderas, J.A., Lazcano, A., Becerra, A., 2015. Viral genome size distribution does not correlate with the antiquity of the host lineages. *Front. Ecol. Evol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00143>

Carlton, J.G., Martin-Serrano, J., 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1143422>

- Castanié-Cornet, M.-P., Bruel, N., Genevaux, P., 2014. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1442–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.007>
- Caspar, D.L.D., Klug, A., 1962. Physical principles in the construction of regular Viruses. *cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24. <https://doi.org/10.1101/SQB.1962.027.001.005>
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K., 1986. A Direct Calorimetric Assay for Ca<sup>2+</sup>-Stimulated ATPase Activity. *Analytical Biochemistry*, 157,375-380. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)
- Chattu, V., Kumar, R., Kumary, S., Kajal, F., David, J., 2018. Nipah virus epidemic in southern India and emphasizing “One Health” approach to ensure global health security. *J. Fam. Med. Prim. Care* 7, 275. [https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc\\_137\\_18](https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_137_18)
- Chen, B.J., Lamb, R.A., 2008. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.008>
- Chen, G., Walmsley, S., Cheung, G.C.M., Chen, L., Cheng, C.-Y., Beuerman, R.W., Wong, T.Y., Zhou, L., Choi, H., 2017. Customized consensus spectral library building for untargeted quantitative metabolomics analysis with data independent acquisition mass spectrometry and MetaboDIA workflow. *Anal. Chem.* 89, 4897–4906. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05006>
- Chen, J., 2015 Analysis of protein-protein interaction by in vivo quantitative proteomics in *Caenorhabditis elegans*. (Tesis). Humboldt-Universität zu Berlin.
- Cheng, F., Murray, J.L., Zhao, J., Sheng, J., Zhao, Z., Rubin, D.H., 2016. Systems biology-based investigation of cellular antiviral drug targets identified by gene-trap insertional mutagenesis. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1005074. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005074>
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Sowder, R.C., Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J., Nagashima, K., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lifson, J.D., Ott, D.E., 2006. Proteomic and biochemical analysis of purified human

immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 80, 9039–9052. <https://doi.org/10.1128/JVI.01013-06>

Chou, K.-C., Shen, H.-B., 2007. MemType-2L: A Web server for predicting membrane proteins and their types by incorporating evolution information through Pse-PSSM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.027>

Chung, L., Colangelo, C., Zhao, H., 2014. Data pre-processing for label-free multiple reaction monitoring (MRM) experiments. *Biology* 3, 383–402. <https://doi.org/10.3390/biology3020383>

Ciancanelli, M.J., Basler, C.F., 2006. Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J. Virol.* 80, 12070–12078. <https://doi.org/10.1128/JVI.01743-06>

Ciechonska, M., Duncan, R., 2014. Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends Microbiol.* 22, 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.08.005>

Clancy, E.K., Barry, C., Ciechonska, M., Duncan, R., 2010. Different activities of the reovirus FAST proteins and influenza hemagglutinin in cell–cell fusion assays and in response to membrane curvature agents. *Virology* 397, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.039>

Clancy, E.K., Duncan, R., 2011. Helix-destabilizing, -branched, and polar residues in the Baboon Reovirus p15 transmembrane domain influence the modularity of FAST proteins. *J. Virol.* 85, 4707–4719. <https://doi.org/10.1128/JVI.02223-10>

Clercq, E.D., 2012. Highlights in antiviral drug research: antivirals at the horizon: highlights in antiviral drug research. *Med. Res. Rev.* 0, 1–34. <https://doi.org/10.1002/med.21256>

Cohen, S., Au, S., Panté, N., 2011. How viruses access the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813, 1634–1645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.009>

- Colangelo, C.M., Chung, L., Bruce, C., Cheung, K.-H., 2013. Review of software tools for design and analysis of large scale MRM proteomic datasets. *Methods* 61, 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.004>
- Condit, R.C., Moussatche, N., Traktman, P., 2006. In a nutshell: structure and assembly of the Vaccinia virion, in: *advances in virus research*. Elsevier, pp. 31–124. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66002-8)
- Cook, H., Doncheva, N., Szklarczyk, D., von Mering, C., Jensen, L., 2018. Viruses.STRING: a virus-host protein-protein interaction database. *Viruses* 10, 519. <https://doi.org/10.3390/v10100519>
- Corbin, R.W., Paliy, O., Yang, F., Shabanowitz, J., Platt, M., Lyons, C.E., Root, K., McAuliffe, J., Jordan, M.I., Kustu, S., Soupene, E., Hunt, D.F., 2003. Toward a protein profile of Escherichia coli: Comparison to its transcription profile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533294100>
- Corcoran, J.A., Syvitski, R., Top, D., Epand, R.M., Epand, R.F., Jakeman, D., Duncan, R., 2004. Myristoylation, a protruding loop, and structural plasticity are essential features of a nonenveloped virus fusion peptide motif. *J. Biol. Chem.* 279, 51386–51394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406990200>
- Cosset, F.L., Lavillette, D., 2011. Cell entry of enveloped viruses, in: *advances in genetics*. Elsevier, pp. 121–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380860-8.00004-5>
- Cox, R., Plemper, R.K., 2015. The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00459>
- Cuervo, A., Carrascosa, J.L., 2012. Bacteriophages: structure, in: John Wiley & Sons, Ltd (ed.), *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024053>
- Cuesta, R., Xi, Q., & Schneider, R. J., 2000. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *The EMBO journal*, 19(13), 3465–3474. doi:10.1093/emboj/19.13.3465

Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., Whelan, S.P.J., 2009. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* 5, e1000394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000394>

Cymer, F., von Heijne, G., White, S.H., 2015. Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding. *J. Mol. Biol.* 427, 999–1022. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.014>

Dalbey, R.E., Kuhn, A., 2004. YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *J. Cell Biol.* 166, 769–774. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405161>

Dapat, C., Oshitani, H., 2016. Novel insights into human respiratory syncytial virus-host factor interactions through integrated proteomics and transcriptomics analysis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 14, 285–297. <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1141676>

da Silva, E., Mulinge, M., Bercoff, D., 2013. The frantic play of the concealed HIV envelope cytoplasmic tail. *Retrovirology* 10, 54. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-54>

de Chasse, B., Meyniel-Schicklin, L., Vonderscher, J., André, P., Lotteau, V., 2014. Virus-host interactomics: new insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome Med.* 6. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0115-1>

de Crouy-Chanel, A., Kohiyama, M., Richarme, G., 1999. Interaction of DnaK with native proteins and membrane proteins correlates with their accessible hydrophobicity. *Gene* 230, 163–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00083-9)

Deng, T., Engelhardt, O.G., Thomas, B., Akoulitchev, A.V., Brownlee, G.G., Fodor, E., 2006. Role of Ran Binding Protein 5 in Nuclear Import and Assembly of the Influenza Virus RNA Polymerase Complex. *J. Virol.* 80, 11911–11919. <https://doi.org/10.1128/JVI.01565-06>

Diamond, J., McQuillan, J., Spiegel, A.N., Wonch Hill, P., Smith, R., West, J., Wood, C., 2016. Viruses, vaccines and the public. *Mus. Soc. Issues* 11, 9–16. <https://doi.org/10.1080/15596893.2016.1131099>

Diaz, L., Mao, H., Zhou, Y., Kohli, M., Cassella, J., Santos, D., Fesseha, Z., Weng, K., Chen, H., Bamba, D., Marks, J.D., Goldblatt, M., Kinch, M., 2010. TSG101 exposure on the surface of HIV-1 infected cells: implications for monoclonal antibody therapy for HIV/AIDS 14.

Diederich, S., Maisner, A., 2007. Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102, 39–50. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.003>

Dietzel, E., Kolesnikova, L., Sawatsky, B., Heiner, A., Weis, M., Kobinger, G.P., Becker, S., von Messling, V., Maisner, A., 2016. Nipah virus matrix protein influences fusogenicity and is essential for particle infectivity and stability. *J. Virol.* 90, 2514–2522. <https://doi.org/10.1128/JVI.02920-15>

Dimitrov, D.S., 2004. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 109–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro817>

Di Pilato, M., Mejias-Perez, E., Gomez, C.E., Perdiguero, B., Sorzano, C.O.S., Esteban, M., 2013. New vaccinia virus promoter as a potential candidate for future vaccines. *J. Gen. Virol.* 94, 2771–2776. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057299-0>

Di Silvestre, D., Brambilla, F., Agnetti, G., Mauri, P., 2016. Bottom-Up Proteomics, in: Agnetti, G., Lindsey, M.L., Foster, D.B. (Eds.), *Manual of Cardiovascular Proteomics*. Springer International Publishing, Cham, pp. 155–185. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31828-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31828-8_7)

Döhner, K., Nagel, C.H., Sodeik, B., 2005. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol.* 13, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.010>

Drabovich, A.P., Pavlou, M.P., Dimitromanolakis, A., Diamandis, E.P., 2012. Quantitative analysis of energy metabolic pathways in MCF-7 breast cancer cells by selected reaction monitoring assay. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 422–434. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015214>

Duan, Z., Deng, S., Ji, X., Zhao, J., Yuan, C., Gao, H., 2019. Nuclear localization of Newcastle disease virus matrix protein promotes virus replication by affecting viral RNA

synthesis and transcription and inhibiting host cell transcription. *Vet. Res.* 50. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0640-4>

Echlin, P., 2009. *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Springer, New York, NY.

Engelman, D.M., 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578–580. <https://doi.org/10.1038/nature04394>

Enquist, L.W., for the Editors of the *Journal of Virology*, 2009. *Virology in the 21st Century*. *J. Virol.* 83, 5296–5308. <https://doi.org/10.1128/JVI.00151-09>

Fabre, B., Korona, D., Mata, C.I., Parsons, H.T., Deery, M.J., Hertog, M.L.A.T.M., Nicolai, B.M., Russell, S., Lilley, K.S., 2017. Spectral libraries for SWATH-MS assays for *Drosophila melanogaster* and *Solanum lycopersicum*. *PROTEOMICS* 17, 1700216. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700216>

Fernández, V.V., 2015. *Desarrollo de herramientas bioinformáticas para estudios de proteómica a gran escala de Candida albicans*. (Tesis). Universidad Complutense de Madrid.

Fersht, A., 1999. *Structure and mechanism in protein science*. W. H. Freeman and Company, New York. <https://doi.org/10.1142/10574>

Fleming, S., 2016. Viral inhibition of the IFN-induced JAK/STAT signalling pathway: development of live attenuated vaccines by mutation of viral-encoded IFN-antagonists. *vaccines* 4, 23. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030023>

Frederick, K., Ciborowski, P., 2016. SWATH-MS, in: *proteomic profiling and analytical chemistry*. Elsevier, pp. 161–173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00009-4>

Fortin, J.F.O., Cantin, R.J., Lamontagne, G., Tremblay, M., 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J VIROL* 71, 9.

Frazer, I.H., 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 46–55. <https://doi.org/10.1038/nri1260>

Friedman, T. C., Goodwin, S. F., 2011. *Advances in Genetics*. 1st edition. Academic Press.

Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L., 2017. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnol.* 39, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>

Furuta, Y., Gowen, B.B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D.F., Barnard, D.L., 2013. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 100, 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>

Galdiero, S., Vitiello, M., Falanga, A., Cantisani, M., Incoronato, N., Galdiero, M., 2012. Intracellular delivery: exploiting viral membranotropic peptides. *Curr. Drug Metab.* 13, 93–104. <https://doi.org/10.2174/138920012798356961>

Geladopoulos, P., Sotiroidis, G., 1991. A malachite green calorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry* 192, 112-116.

de la Torre Russis, V., Valles, A., Gómez, R., China, G., Pons, T., 2003. Interacciones proteína-proteína: bases de datos y métodos teóricos de predicción. *Biotecnología Aplicada*, 20:201-208

Gelderblom, H., 1996. *Structure and Classification of Viruses*. Medical Microbiology, Edition: 4th, Chapter: Chapter 41, Publisher: University of Texas Medical Branch at Galveston.

Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E., Bruss, V., 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J VIROL* 70, 6.

Geyer, H., Geyer, R., 2006. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1764, 1853–1869. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.10.007>

Ghildyal, R., Ho, A., Jans, D.A., 2006. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 692–705. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x>

Gil, L.M., 2009. Estudio estructural y funcional de proteínas de movimiento viral de virus de plantas. (Tesis). Universitat de València.



Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Reiter, L., Bonner, R., Aebersold, R., 2012. Targeted Data Extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Cellular Proteomics*, 10- 17.

Gilmore, R., Mandon, E.C., 2012. Understanding integration of  $\alpha$ -helical membrane proteins: the next steps. *Trends Biochem. Sci.* 37, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.05.003>

Giorda, K.M., Hebert, D.N., 2013. Viroporins customize host cells for efficient viral propagation. *DNA Cell Biol.* 32, 557–564. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2159>

Goder, V., Spiess, M., 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504, 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02712-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02712-0)

Goebels, F., 2014 Classification of protein protein interactions. (Tesis). Universität Munchen.

Gold, V.A.M., Duong, F., Collinson, I., 2007. Structure and function of the bacterial Sec translocon (Review). *Mol. Membr. Biol.* 24, 387–394. <https://doi.org/10.1080/09687680701416570>

Gottesman, S., 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 465–506. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.465>

Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jun;36(10):3420-35. doi: 10.1093/nar/gkn176. Epub 2008 Apr 29. PMID: 18445632; PMCID: PMC2425479.

Goulding, C.W., Postigo, D., Matthews, R.G., 1997. Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry* 36, 8082–8091. <https://doi.org/10.1021/bi9705164>

Gower, T.L., Peebles, M.E., Collins, P.L., Graham, B.S., 2001. RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *virology* 283, 188–196. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0891>

Gräbel, L., Fast, L.A., Scheffer, K.D., Boukhallouk, F., Spoden, G.A., Tenzer, S., Boller, K., Bago, R., Rajesh, S., Overduin, M., Berditchevski, F., Florin, L., 2016. The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep32337>

Greber, U.F., Fassati, A., 2003. Nuclear import of viral DNA genomes: nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic* 4, 136–143. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00114.x>

Griffith, I.P., 1972. The effect of cross-links on the mobility of proteins in dodecyl sulphate–polyacrylamide gels. *Biochem. J.* 126, 553–560. <https://doi.org/10.1042/bj1260553>

Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Georges-Courbot, M.C., Lefevre, A., Marianneau, P., Chua, K.B., Lam, S.K., Buckland, R., Deubel, V., Wild, T.F., 2004. Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J. Virol.* 78, 834–840. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.834-840.2004>

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R., 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994–999. <https://doi.org/10.1038/13690>

Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>

Harris, N.J., Reading, E., Ataka, K., Grzegorzewski, L., Charalambous, K., Liu, X., Schlesinger, R., Heberle, J., Booth, P.J., 2017. Structure formation during translocon-unassisted co-translational membrane protein folding. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08522-9>

Harrison, M.S., Sakaguchi, T., Schmitt, A.P., 2010. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1416–1429. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.005>

Harrison, S.C., 2015. Viral membrane fusion. *Virology* 479–480, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.043>

Harwig, A., Landick, R., Berkhout, B., 2017. The battle of RNA synthesis: virus versus host. *Viruses* 9, 309. <https://doi.org/10.3390/v9100309>

Haupt, C., Hofmann, T., Wittig, S., Kostmann, S., Politis, A., Schmidt, C., 2017. Combining chemical cross-linking and mass spectrometry of intact protein complexes to study the architecture of multi-subunit protein assemblies. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/56747>

Heaton, N.S., Moshkina, N., Fenouil, R., Gardner, T.J., Aguirre, S., Shah, P.S., Zhao, N., Manganaro, L., Hultquist, J.F., Noel, J., Sachs, D., Hamilton, J., Leon, P.E., Chawdury, A., Tripathi, S., Melegari, C., Campisi, L., Hai, R., Metreveli, G., Gamarnik, A.V., García-Sastre, A., Greenbaum, B., Simon, V., Fernandez-Sesma, A., Krogan, N.J., Mulder, L.C.F., van Bakel, H., Tortorella, D., Taunton, J., Palese, P., Marazzi, I., 2016. Targeting viral proteostasis limits influenza virus, HIV, and dengue virus infection. *Immunity* 44, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.017>

Hegde, R.S., Bernstein, H.D., 2006. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.* 31, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.08.004>

Heijne G, 1986. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.*, 5(11):3021-7.

Henderson, B., Martin, A., 2011. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect. Immun.* 79, 3476–3491. <https://doi.org/10.1128/IAI.00179-11>

Hesketh, E.L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonosoff, G.P., Ranson, N.A., 2018. The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04793-6>

Hooper, P., Zaki, S., Daniels, P., Middleton, D., 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 3, 315–322. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01385-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01385-5)

Hsieh, F.C., Chen, C.T., Weng, Y.T., Peng, S.S., Chen, Y.C., Huang, L.Y., Hu, H.T., Wu, Y.L., Lin, N.C., Wu, W.F., 2011. Stepwise Activity of ClpY (HslU) mutants in the

- processive degradation of *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease substrates. *J. Bacteriol.* 193, 5465–5476. <https://doi.org/10.1128/JB.05128-11>
- Huang, I.C., Farzan, M., Takahashi, K., Stuart, L., Stahl, G.L., Ezekowitz, A.B., Spear, G.T., Olinger, G.G., Schmidt, E.V., Michelow, I.C., 2013. Lectin-dependent enhancement of Ebola virus infection via soluble and transmembrane C-type lectin receptors. *PLoS ONE* 8, e60838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060838>
- Hubbard, S.J., Jones, A.R. (Eds.), 2010. *Proteome bioinformatics*, Springer protocols. Humana, New York, NY. ISBN 978-1-60761-443-2. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-444-9>
- Huber, D., Rajagopalan, N., Preissler, S., Rocco, M.A., Merz, F., Kramer, G., Bukau, B., 2011. SecA interacts with ribosomes in order to facilitate posttranslational translocation in bacteria. *Mol. Cell* 41, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.028>
- Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A., Różycki, B., 2010. Membrane budding. *Cell* 143, 875–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.030>
- Hutchinson, E.C., Charles, P.D., Hester, S.S., Thomas, B., Trudgian, D., Martínez-Alonso, M., Fodor, E., 2014. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5816>
- Hwang Fu, Y.-H., Huang, W.Y.C., Shen, K., Groves, J.T., Miller, T., Shan, S., 2017. Two-step membrane binding by the bacterial SRP receptor enable efficient and accurate Co-translational protein targeting. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.25885>
- Hyatt, A.D., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Wise, T.G., Hengstberger, S.G., 2001. Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect.* 3, 297–306. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01383-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01383-1)
- Imperiale, M.J., Casadevall, A., 2015. The importance of virology at a time of great need and great jeopardy. *mBio* 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00236-15>
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., 2005. Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 4 1265-1272.

- Ishihama, Y., Schmidt, T., Rappsilber, J., Mann, M., Hartl, F.U., Kerner, M.J., Frishman, D., 2008. Protein abundance profiling of the Escherichia coli cytosol. *BMC Genomics* 9, 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-102>
- Iwasaki, M., Takeda, M., Shirogane, Y., Nakatsu, Y., Nakamura, T., Yanagi, Y., 2009. The matrix protein of Measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J. Virol.* 83, 10374–10383. <https://doi.org/10.1128/JVI.01056-09>
- Jeffery, C.J., 2014. An introduction to protein moonlighting. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1679–1683. <https://doi.org/10.1042/BST20140226>
- Jennings, G., Bachmann, M., 2007. Designing recombinant vaccines with viral properties: a rational approach to more effective vaccines. *Curr. Mol. Med.* 7, 143–155. <https://doi.org/10.2174/156652407780059140>
- Jiménez García, L.F., Merchant, H., 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación : Prentice Hall, México. ISBN 970-26-0387-0
- Johnston, G.P., Contreras, E.M., Dabundo, J., Henderson, B.A., Matz, K.M., Ortega, V., Ramirez, A., Park, A., Aguilar, H.C., 2017. Cytoplasmic motifs in the Nipah virus fusion protein modulate virus particle assembly and egress. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02150-16>
- Johnson, N., Powis, K., High, S., 2013. Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 2403–2409. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.008>
- Jolly, C., Sattentau, Q., 2013. Attachment factors. *Advances in experimental medicine and biology*. 790. 1-23. 10.1007/978-1-4614-7651-1\_1.
- Kalwarczyk, T., Tabaka, M., Holyst, R., 2012. Biologistics—diffusion coefficients for complete proteome of Escherichia coli. *Bioinformatics* 28, 2971–2978. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts537>
- Kanai, Y., Kawagishi, T., Sakai, Y., Nouda, R., Shimojima, M., Saijo, M., Matsuura, Y., Kobayashi, T., 2019. Cell–cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances

replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses. *PLOS Pathog.* 15, e1007675. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007675>

Katen, S., Zlotnick, A., 2009. Chapter 14 The thermodynamics of virus capsid assembly, in: *methods in enzymology*. Elsevier, pp. 395–417. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04214-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04214-6)

Khachatoorian, R., 2016. Chaperones in hepatitis C virus infection. *World J. Hepatol.* 8, 9. <https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i1.9>

Kicman, A., Parkin, M., Bansal, S., 2007. An introduction to mass spectrometry based proteomics. Tutorial based mainly on some extracts of an article: ‘An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules’ by Andrew T Kicman, Mark C Parkin and Ray K Iles, *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; Vol 260-262;212-227

Kielian, M., 2006. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology* 344, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.036>

Kilcher, S., Mercer, J., 2015. DNA virus uncoating. *Virology* 479–480, 578–590. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.024>

Kipkorir, T., Colangelo, C.M., Manuelidis, L., 2015. Proteomic analysis of host brain components that bind to infectious particles in Creutzfeldt-Jakob disease. *PROTEOMICS* 15, 2983–2998. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500059>

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H., 2006. Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A Complete Set of E. coli K-12 ORF Archive): Unique Resources for Biological Research. *DNA Res.* 12, 291–299. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi012>

Knipe, D. M., Howley, P. M., 2013. *Fields Virology*, 6th Edition. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2456

Koday, M.T., Nelson, J., Chevalier, A., Koday, M., Kalinoski, H., Stewart, L., Carter, L., Nieuwsma, T., Lee, P.S., Ward, A.B., Wilson, I.A., Dagley, A., Smee, D.F., Baker, D., Fuller, D.H., 2016. A computationally designed hemagglutinin stem-binding protein

provides in vivo protection from influenza independent of a host immune response. *PLOS Pathog.* 12, e1005409. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005409>

Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., Ban, N., 2009. YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol. Cell* 34, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.019>

Koodathingal, P., Jaffe, N.E., Kraut, D.A., Prakash, S., Fishbain, S., Herman, C., Matouschek, A., 2009. ATP-dependent proteases differ substantially in their ability to unfold globular proteins. *J. Biol. Chem.* 284, 18674–18684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900783200>

Koutmos, M., Datta, S., Patridge, K.A., Smith, J.L., Matthews, R.G., 2009. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 18527–18532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906132106>

Krey, J.F., Wilmarth, P.A., Shin, J.-B., Klimek, J., Sherman, N.E., Jeffery, E.D., Choi, D., David, L.L., Barr-Gillespie, P.G., 2014. Accurate label-free protein quantitation with high- and low-resolution mass spectrometers. *J. Proteome Res.* 13, 1034–1044. <https://doi.org/10.1021/pr401017h>

Krishnan, M.N., Ng, A., Sukumaran, B., Gilfoy, F.D., Uchil, P.D., Sultana, H., Brass, A.L., Adametz, R., Tsui, M., Qian, F., Montgomery, R.R., Lev, S., Mason, P.W., Koski, R.A., Elledge, S.J., Xavier, R.J., Agaisse, H., Fikrig, E., 2008. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455, 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature07207>

Krishnan, M.N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J.L., Hodge, T.W., Fikrig, E., 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of Dengue and West Nile viruses. *J. Virol.* 81, 4881–4885. <https://doi.org/10.1128/JVI.02210-06>

Kroeker, A.L., Ezzati, P., Coombs, K.M., Halayko, A.J., 2013. Influenza A infection of primary human airway epithelial cells up-regulates proteins related to purine metabolism and ubiquitin-related signaling. *J. Proteome Res.* 12, 3139–3151. <https://doi.org/10.1021/pr400464p>

- Kumamoto, C.A., 1989. Escherichia coli SecB protein associates with exported protein precursors in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 5320–5324. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5320>
- Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., Nureki, O., 2014. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516–520. <https://doi.org/10.1038/nature13167>
- Kwon, A.-R., Trame, C.B., McKay, D.B., 2004. Kinetics of protein substrate degradation by HslUV. *J. Struct. Biol.* 146, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.003>
- Laliberte, J.P., McGinnes, L.W., Peeples, M.E., Morrison, T.G., 2006. Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J. Virol.* 80, 10652–10662. <https://doi.org/10.1128/JVI.01183-06>
- Lam, H., Deutsch, E.W., Eddes, J.S., Eng, J.K., Stein, S.E., Aebersold, R., 2008. Building consensus spectral libraries for peptide identification in proteomics. *Nat. Methods* 5, 873–875. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1254>
- Lampel, A., Bram, Y., Levy-Sakin, M., Bacharach, E., Gazit, E., 2013. The effect of chemical chaperones on the assembly and stability of HIV-1 capsid protein. *PLoS ONE* 8, e60867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060867>
- Landowski, M., Dabundo, J., Liu, Q., Nicola, A.V., Aguilar, H.C., 2014. Nipah virion entry kinetics, composition, and conformational changes determined by enzymatic virus-like particles and new flow virometry Tools. *J. Virol.* 88, 14197–14206. <https://doi.org/10.1128/JVI.01632-14>
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R., 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A., 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100, 95–97. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90115-5)



- Lawler, S.E., Speranza, M.C., Cho, C.F., Chiocca, E.A., 2017. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol.* 3, 841. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>
- Lee, B., Ataman, Z.A., 2011. Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. *Trends Microbiol.* 19, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.005>
- Lemnitzer, F., Raschbichler, V., Kolodziejczak, D., Israel, L., Imhof, A., Bailer, S.M., Koszinowski, U., Ruzsics, Z., 2013. Mouse cytomegalovirus egress protein pM50 interacts with cellular endophilin-A2: pM50-endophilin interaction. *Cell. Microbiol.* 15, 335–351. <https://doi.org/10.1111/cmi.12080>
- Lewin Benjamin, 2008. *Genes IX*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; Edición: 9. ISBN 9701066855
- Lien, H.Y., Shy, R.S., Peng, S.S., Wu, Y.L., Weng, Y.T., Chen, H.H., Su, P.C., Ng, W.F., Chen, Y.C., Chang, P.Y., Wu, W.F., 2009. Characterization of the Escherichia coli ClpY (HslU) Substrate recognition site in the ClpYQ (HslUV) protease using the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* 191, 4218–4231. <https://doi.org/10.1128/JB.00089-09>
- Linxweiler, M., Schick, B., Zimmermann, R., 2017. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17002. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.2>
- Lietzén, N., Öhman, T., Rintahaka, J., Julkunen, I., Aittokallio, T., Matikainen, S., Nyman, T.A., 2011. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of Influenza A virus-infected human primary macrophages. *PLoS Pathog.* 7, e1001340. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001340>
- Lin, K., Gallay, P., 2013. Curing a viral infection by targeting the host: The example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res.* 99, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.020>
- Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., Zhang, L., Liu, W., 2012. Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein. *PLoS ONE* 7, e31063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031063>
- Lo, M.K., Peeples, M.E., Bellini, W.J., Nichol, S.T., Rota, P.A., Spiropoulou, C.F., 2012. Distinct and overlapping roles of Nipah virus P gene products in modulating the human

endothelial cell antiviral response. *PLoS ONE* 7, e47790.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047790>

Lombana Sacristán, L., 2015. Glicoproteínas de la envoltura del HCV: implicación del péptido fusogénico de E1 y de los dominios transmembrana en las propiedades estructurales y funcionales del complejo E1-E2. (Tesis) Universidad Complutense de Madrid.

Longhi, M.P., Williams, A., Wise, M., Morgan, B.P., Gallimore, A., 2007. CD59a deficiency exacerbates influenza-induced lung inflammation through complement-dependent and -independent mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 37, 1266–1274.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200636755>

Louten, J., Reynolds, N., 2016. *Essential human virology*. Elsevier, Academic Press, London ; New York. ISBN: 9780128009475

Luan, Y., Ju, J., Luo, L., Zhang, Z., Wang, J., Zhu, D.M., Cheng, L., Zhang, S.Y., Chen, L., Wang, F.S., Wang, S., 2012. Potential role of soluble B7-H3 in liver immunopathogenesis during chronic HBV infection: Role of B7-H3 in pathogenesis of chronic HBV infection. *J. Viral Hepat.* 19, 23–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01421.x>

Luby, S.P., Gurley, E.S., Hossain, M.J., 2009. Transmission of human infection with Nipah virus. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1743–1748. <https://doi.org/10.1086/647951>

Ludwig, C., Gillet, L., Rosenberger, G., Amon, S., Collins, B.C., Aebersold, R., 2018. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 14, e8126. <https://doi.org/10.15252/msb.20178126>

Luirink, J., 2004. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.013>

Lundstrom, K., 2018. Viral vectors in gene therapy. *Diseases* 6, 42.  
<https://doi.org/10.3390/diseases6020042>

Lussignol, M., Kopp, M., Molloy, K., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R.A., Dorner, M., Bell, K.L., Chait, B.T., Rice, C.M., Catanese, M.T., 2016. Proteomics of HCV virions reveals

an essential role for the nucleoporin Nup98 in virus morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2484–2489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518934113>

Ma, H., Kien, F., Maniere, M., Zhang, Y., Lagarde, N., Tse, K.S., Poon, L.L.M., Nal, B., 2012. Human annexin A6 interacts with Influenza A virus protein m2 and negatively modulates infection. *J. Virol.* 86, 1789–1801. <https://doi.org/10.1128/JVI.06003-11>

MacLachlan, N. J., Dubovi, E. J., 2016. *Fenner's Veterinary Virology 5th Edition*. Academic Press <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06921-6>

MacLeod, D.T., Nakatsuji, T., Wang, Z., di Nardo, A., Gallo, R.L., 2015. Vaccinia virus binds to the scavenger receptor MARCO on the surface of keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 135, 142–150. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.330>

Maisner, A., Neufeld, J., Weingartl, H., 2009. Organ- and endotheliotropism of Nipah virus infections in vivo and in vitro. *Thromb. Haemost.* 102, 1014–1023. <https://doi.org/10.1160/TH09-05-0310>

Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180, 195–204. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90115-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90115-2)

Marelli, G., Howells, A., Lemoine, N.R., Wang, Y., 2018. Oncolytic viral therapy and the immune system: a double-edged sword against cancer. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00866>

Mares, R.E., Meléndez-López, S.G., Ramos, M.A., 2011. Acid-denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 4625–4636. <https://doi.org/10.3390/ijms12074625>

Mariño, K., Bones, J., Kattla, J.J., Rudd, P.M., 2010. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat. Chem. Biol.* 6, 713–723. <https://doi.org/10.1038/nchembio.437>

Marintcheva, B., 2018. Introduction to Viral structure, diversity and biology. Parts of this chapter were originally published in Marintcheva B. A box of paradoxes: the fascinating world of viruses. *Bridgew Rev* 2013;32(2):25–8.

[http://vc.bridgew.edu/br\\_rev/vol32/iss2/8](http://vc.bridgew.edu/br_rev/vol32/iss2/8) and are reproduced here with the permission of the editor., in: *Harnessing the Power of Viruses*. Elsevier, pp. 1–26.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810514-6.00001-5>

Marsh, G.A., Wang, L.F., 2012. Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly? *Curr. Opin. Virol.* 2, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.006>

Marsh, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* 124, 729–740.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>

Martin, D.N., Uprichard, S.L., 2013. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 10777–10782.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1301764110>

Martinez, J.P., Sasse, F., Brönstrup, M., Diez, J., Meyerhans, A., 2015. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat. Prod. Rep.* 32, 29–48.  
<https://doi.org/10.1039/C4NP00085D>

Martins-de-Souza, D. (Ed.), 2014. *Shotgun proteomics: methods and protocols*, *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York.

Mathieu, K., Javed, W., Vallet, S., Lesterlin, C., Candusso, M.-P., Ding, F., Xu, X.N., Ebel, C., Jault, J.-M., Orelle, C., 2019. Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain. *Sci. Rep.* 9.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39382-0>

McEachern, J.A., Bingham, J., Cramer, G., Green, D.J., Hancock, T.J., Middleton, D., Feng, Y.R., Broder, C.C., Wang, L.F., Bossart, K.N., 2008. A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* 26, 3842–3852. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.016>

Mead, J. A., Bianco, L., Ottone, V., Barton, C., Kay, R. G., Lilley, K. S., Bessant, C., 2009. MRMAid, the web-based tool for designing multiple reaction monitoring (MRM) transitions. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 8(4), 696–705.  
[doi:10.1074/mcp.M800192-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M800192-MCP200)

- Megrian, D., 2017. Identificación de proteínas presentes en vesículas extracelulares con potencial fusogénico basado en su similitud con fusógenos virales. (Tesis) Universidad de la República (Uruguay).
- Mendez, E., Munoz-Yanez, C., Sanchez-San Martin, C., Aguirre-Crespo, G., Banos-Lara, M. D. R., Gutierrez, M., Espinosa, R., Acevedo, Y., Arias, C.F., Lopez, S., Sandri-Goldin, R.M., 2014. Characterization of Human Astrovirus Cell Entry. *J. Virol.* 88, 2452–2460. <https://doi.org/10.1128/JVI.02908-13>
- Meyer, K., Selbach, M., 2015. Quantitative affinity purification mass spectrometry: a versatile technology to study protein–protein interactions. *Front. Genet.* 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00237>
- Mingarro, I., Whitley, P., Heijne, G.V., Lemmon, M.A., 1996. Ala-insertion scanning mutagenesis of the glycoprotein a transmembrane helix: A rapid way to map helix-helix interactions in integral membrane proteins. *Protein Sci.* 5, 1339–1341. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050712>
- Mirelman, A.J., Ozawa, S., Grewal, S., 2014. The economic and social benefits of childhood vaccinations in BRICS. *Bull. World Health Organ.* 92, 454–456. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.132597>
- Miroux, B., Walker, J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>
- Modis, Y., 2013. Class II Fusion Proteins, in: Pöhlmann, S., Simmons, G. (Eds.), *Viral entry into host cells*. Springer New York, New York, NY, pp. 150–166. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_8)
- Monteoliva Diaz, L., Jorge Cerrudo, I., Vázquez Cobos, J., Sánchez del Pino, M.M., 2019. Proteómica Cuantitativa. In: Sociedad Española de Proteómica, editor. *Manual de Proteómica, Volumen II: Elías Rodríguez Toral*; 2019. p. 15-56. (ISBN 978-84-09-13534-9)

- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., Sundquist, W.I., 2011. ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host Microbe* 9, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.02.004>
- Morita, E., Sundquist, W.I., 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 395–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102350>
- Murhammer, D.W. (Ed.), 2016. *Baculovirus and insect cell expression protocols*, Third edition. ed, *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3043-2>
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M., 2012. *Medical Microbiology*, Seventh Edition. Elsevier Health Sciences.
- Naskalska, A., Pyrc, K., 2015. Virus like particles as immunogens and universal nanocarriers. *Polish journal of microbiology*, 64 1, 3-13.
- Ning, K., Fermin, D., Nesvizhskii, A.I., 2012. Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *J. Proteome Res.* 11, 2261–2271. <https://doi.org/10.1021/pr201052x>
- Nijtmans, L., 2002. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00038-5)
- Nouwen, N., Driessen, A.J.M., 2002. SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC: SecDFyajC-YidC complex formation. *Mol. Microbiol.* 44, 1397–1405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02972.x>
- Ojeda, Z., Rocha, P., Calvache, H., 2002. Baculovirus como insecticida biológico / Baculoviruses as biological insecticides. *Palmas* 0121-2923. 23. 27.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200>
- Ortega, J.T., Rangel, H.R., 2013. Blancos celulares como mecanismo alternativo en la terapia antiviral. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 38, 8.

- Orzáez, M., Pérez-Payá, E., Mingarro, I., 2000. Influence of the C-terminus of the glycophorin A transmembrane fragment on the dimerization process. *Protein Sci.* 9, 1246–1253. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1246>
- Paganin, C., Monos, D.S., Marshall, J.D., Frank, I., Trinchieri, G., 1997. Frequency and cytokine profile of HPRT mutant T cells in HIV-infected and healthy donors: implications for T cell proliferation in HIV disease. *J. Clin. Invest.* 99, 663–668. <https://doi.org/10.1172/JCI119209>
- Pallister, J.A., Klein, R., Arkininstall, R., Haining, J., Long, F., White, J.R., Payne, J., Feng, Y.R., Wang, L.F., Broder, C.C., Middleton, D., 2013. Vaccination of ferrets with a recombinant G glycoprotein subunit vaccine provides protection against Nipah virus disease for over 12 months. *Viol. J.* 10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-237>
- Paoletti, A.C., Parmely, T.J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Zhu, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Florens, L., Washburn, M.P., 2006. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18928–18933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606379103>
- Park, A., Yun, T., Vigant, F., Pernet, O., Won, S.T., Dawes, B.E., Bartkowski, W., Freiberg, A.N., Lee, B., 2016a. Nipah virus C protein recruits Tsg101 to promote the efficient release of virus in an ESCRT-dependent pathway. *PLOS Pathog.* 12, e1005659. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005659>
- Patch, J.R., Cramer, G., Wang, L.F., Eaton, B.T., Broder, C.C., 2007. Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Viol. J.* 14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-1>
- Peleato, R.A., 2007. Protein interaction networks and their applications to protein characterization and cancer genes prediction. (Tesis). Universitat Pompeu Fabra.
- Pentecost, M., Vashisht, A.A., Lester, T., Voros, T., Beaty, S.M., Park, A., Wang, Y.E., Yun, T.E., Freiberg, A.N., Wohlschlegel, J.A., Lee, B., 2015. Evidence for ubiquitin-regulated nuclear and subnuclear trafficking among Paramyxovirinae matrix proteins. *PLOS Pathog.* 11, e1004739. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004739>

Perlmutter, J.D., Hagan, M.F., 2015. Mechanisms of virus assembly. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 66, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121637>

Peschke, M., Le Goff, M., Koningstein, G.M., Karyolaimos, A., de Gier, J.-W., van Ulsen, P., Luirink, J., 2018. SRP, FtsY, DnaK and YidC are required for the biogenesis of the *E. coli* tail-anchored membrane proteins DjlC and Flk. *J. Mol. Biol.* 430, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.004>

Phizicky, E.M., Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59, 30.

Potel, J., Rassam, P., Montpellier, C., Kaestner, L., Werkmeister, E., Tews, B.A., Couturier, C., Popescu, C.I., Baumert, T.F., Rubinstein, E., Dubuisson, J., Milhiet, P.E., Cocquerel, L., 2013. EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry: Dynamics and partitioning of CD81. *Cell. Microbiol.* 15, 1234–1252. <https://doi.org/10.1111/cmi.12112>

Poulet, H., Minke, J., Pardo, M.C., Juillard, V., Nordgren, B., Audonnet, J.-C., 2007. Development and registration of recombinant veterinary vaccines. *Vaccine* 25, 5606–5612. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.066>

PrabhuDas, M.R., Baldwin, C.L., Bollyky, P.L., Bowdish, D.M.E., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., McVicker, B., Means, T.K., Moestrup, S.K., Post, S.R., Sawamura, T., Silverstein, S., Speth, R.C., Telfer, J.C., Thiele, G.M., Wang, X.-Y., Wright, S.D., El Khoury, J., 2017. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.* 198, 3775–3789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>

Prasad, B.V.V., Schmid, M.F., 2012. Principles of virus structural organization, in: Rossmann, M.G., Rao, V.B. (Eds.), *Viral Molecular Machines*. Springer US, Boston, MA, pp. 17–47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_3)

Pugsley, A.P., 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *MICROBIOL REV* 57, 59.

Qi, M., Williams, J.A., Chu, H., Chen, X., Wang, J.J., Ding, L., Akhrome, E., Wen, X., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R., Spearman, P., 2013. Rab11-FIP1C and Rab14 direct



plasma membrane sorting and particle incorporation of the HIV-1 envelope glycoprotein complex. *PLoS Pathog.* 9, e1003278. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003278>

Raghava, S., Giorda, K.M., Romano, F.B., Heuck, A.P., Hebert, D.N., 2011. The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog.* 7, e1002116. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002116>

Ranadheera, C., Proulx, R., Chaiyakul, M., Jones, S., Grolla, A., Leung, A., Rutherford, J., Kobasa, D., Carpenter, M., Czub, M., 2018. The interaction between the Nipah virus nucleocapsid protein and phosphoprotein regulates virus replication. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34484-7>

Rao, V.S., Srinivas, K., Sujini, G.N., Kumar, G.N.S., 2014. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int. J. Proteomics* 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>

Read, J., Clancy, E.K., Sarker, M., de Antueno, R., Langelaan, D.N., Parmar, H.B., Shin, K., Rainey, J.K., Duncan, R., 2015. Reovirus FAST proteins drive pore formation and syncytiogenesis using a novel helix-loop-helix fusion-inducing lipid packing sensor. *PLOS Pathog.* 11, e1004962. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004962>

Reed, M.C., Nijhout, H.F., Sparks, R., Ulrich, C.M., 2004. A mathematical model of the methionine cycle. *J. Theor. Biol.* 226, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2003.08.001>

Reithinger, J., 2013. Membrane protein biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Stockholm.

Rémy, V., LARGERON, N., Quilici, S., Carroll, S., 2015. The economic value of vaccination: why prevention is wealth. *J. Mark. Access Health Policy* 3, 29284. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v3.29284>

Ren, H., Elgner, F., Himmelsbach, K., Akhras, S., Jiang, B., Medvedev, R., Ploen, D., Hildt, E., 2017. Identification of syntaxin 4 as an essential factor for the hepatitis C virus life cycle. *Eur. J. Cell Biol.* 96, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.06.002>

Rialdi, A., Hultquist, J., Jimenez-Morales, D., Peralta, Z., Campisi, L., Fenouil, R., Moshkina, N., Wang, Z.Z., Laffleur, B., Kaake, R.M., McGregor, M.J., Haas, K., Pefanis, E., Albrecht, R.A., Pache, L., Chanda, S., Jen, J., Ochando, J., Byun, M., Basu, U., García-

- Sastre, A., Krogan, N., van Bakel, H., Marazzi, I., 2017. The RNA exosome Syncs IAV-RNAPII transcription to promote viral ribogenesis and infectivity. *Cell* 169, 679-692.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.021>
- Roche, S., Albertini, A.A.V., Lepault, J., Bressanelli, S., Gaudin, Y., 2008. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1716–1728. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7534-3>
- Roldão, A., Mellado, M.C.M., Castilho, L.R., Carrondo, M.J., Alves, P.M., 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 9, 1149–1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Rosenberger, G., Koh, C.C., Guo, T., Röst, H.L., Kouvonen, P., Collins, B.C., Heusel, M., Liu, Y., Caron, E., Vichalkovski, A., Faini, M., Schubert, O.T., Faridi, P., Ebhardt, H.A., Matondo, M., Lam, H., Bader, S.L., Campbell, D.S., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Tate, S., Aebersold, R., 2014. A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS. *Sci. Data* 1, 140031. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.31>
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J., 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1154–1169. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>
- Röst, H.L., Rosenberger, G., Navarro, P., Gillet, L., Miladinović, S.M., Schubert, O.T., Wolski, W., Collins, B.C., Malmström, J., Malmström, L., Aebersold, R., 2014. OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. *Nat. Biotechnol.* 32, 219–223. <https://doi.org/10.1038/nbt.2841>
- Ryu, W.S., 2017. Part II. DNA viruses, in: *molecular virology of human pathogenic viruses*. Elsevier, pp. 83–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00043-6>
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E., 2000. YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406, 637–641. <https://doi.org/10.1038/35020586>

Sanchala, D.S., Bhatt, L.K., Prabhavalkar, K.S., 2017. Oncolytic Herpes Simplex Viral therapy: a stride toward selective targeting of cancer cells. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00270>

Santana, N.R., 2015. Optimización y estandarización de un protocolo para el estudio de perfiles peptídicos séricos mediante la tecnología maldi-tof ms. aplicación en la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz. (Tesis). Universitat de Barcelona.

Santos, S., Obukhov, Y., Nekhai, S., Bukrinsky, M., Iordanskiy, S., 2012. Virus-producing cells determine the host protein profiles of HIV-1 virion cores. *Retrovirology* 9, 65. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-65>

Santoro, M.M., Bolen, D.W., 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl .alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 21; 8063-8068 <https://doi.org/10.1021/bi00421a014>

Sanz, M.A., Madan, V., Nieva, J.L., Carrasco, L., 2005. The Alphavirus 6K Protein, in: Fischer, W.B. (Ed.), *Viral membrane proteins: structure, function, and drug design*. Springer US, Boston, MA, pp. 233–244. [https://doi.org/10.1007/0-387-28146-0\\_16](https://doi.org/10.1007/0-387-28146-0_16)

Saphire, A.C.S., Gallay, P.A., Bark, S.J., 2006. Proteomic analysis of human immunodeficiency virus using liquid chromatography/tandem mass spectrometry effectively distinguishes specific incorporated host proteins. *J. Proteome Res.* 5, 530–538. <https://doi.org/10.1021/pr050276b>

Saraogi, I., Shan, S., 2014. Co-translational protein targeting to the bacterial membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1433–1441. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.013>

Satterfield, B.A., Dawes, B.E., Milligan, G.N., 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for Nipah virus. *Vaccine* 34, 2971–2975. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.075>

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A., 2002. The human scavenger receptor class B type

I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017–5025. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529>

Schägger, H., Cramer, W.A., & Jagow, G.V., 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 217 2, 220-30. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Schneider, R.J., Mohr, I., 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* 28, 130–136. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00029-X)

Schubert, O.T., Gillet, L.C., Collins, B.C., Navarro, P., Rosenberger, G., Wolski, W.E., Lam, H., Amodei, D., Mallick, P., MacLean, B., Aebersold, R., 2015. Building high-quality assay libraries for targeted analysis of SWATH MS data. *Nat. Protoc.* 10, 426–441. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.015>

Seong, I.S., Kang, M.S., Choi, M.K., Lee, J.W., Koh, O.J., Wang, J., Eom, S.H., Chung, C.H., 2002. The C-terminal Tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 25976–25982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202793200>

Seong, I.S., Oh, J.Y., Lee, J.W., Tanaka, K., Chung, C.H., 2000. The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulaA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 477, 224–229. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01808-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01808-1)

Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E., Palese, P., 2008. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* 4, e1000085. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000085>

Shen, H.B., Chou, K.C., 2009. A top-down approach to enhance the power of predicting human protein subcellular localization: Hum-mPLoc 2.0. *Anal. Biochem.* 394, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.046>

- Shen, H.B., Chou, K.C., 2008. PseAAC: A flexible web server for generating various kinds of protein pseudo amino acid composition. *Anal. Biochem.* 373, 386–388. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.012>
- Shen, H.B., Chou, K.C., 2007. Hum-mPLoc: An ensemble classifier for large-scale human protein subcellular location prediction by incorporating samples with multiple sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 1006–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.071>
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M., 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>
- Shi, J., Wong, J., Piesik, P., Fung, G., Zhang, J., Jagdeo, J., Li, X., Jan, E., Luo, H., 2013. Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFκB signaling. *Autophagy* 9, 1591–1603. <https://doi.org/10.4161/auto.26059>
- Shi, T., Song, E., Nie, S., Rodland, K.D., Liu, T., Qian, W.-J., Smith, R.D., 2016. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *PROTEOMICS* 16, 2160–2182. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500449>
- Shmulevitz, M., Salsman, J., Duncan, R., 2003. Palmitoylation, Membrane-proximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the Reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J. Virol.* 77, 9769–9779. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9769-9779.2003>
- Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.Z., Vissers, J.P.C., Geromanos, S.J., 2006. Absolute quantification of proteins by LCMS: a virtue of parallel ms acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 144–156. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500230-MCP200>
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720-31. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>

Smith, A.E., 2004. How viruses enter animal cells. *Science* 304, 237–242. <https://doi.org/10.1126/science.1094823>

Soares, H.R., Castro, R., Tomás, H.A., Rodrigues, A.F., Gomes-Alves, P., Bellier, B., Klatzmann, D., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., Coroadinha, A.S., 2016. Tetraspanins displayed in retrovirus-derived virus-like particles and their immunogenicity. *Vaccine* 34, 1634–1641. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.015>

Soriano, E.F., 2015. Broad-spectrum host-acting antivirals: identification and characterization of anti-HIV drugs. (Tesis). Universitat Pompeu Fabra de Barcelona.

Stegen, C., Yakova, Y., Henaff, D., Nadjar, J., Duron, J., Lippé, R., 2013. Analysis of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen. *PLoS ONE* 8, e53276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053276>

Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., Bell, J.C., 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* 6, 821–825. <https://doi.org/10.1038/77558>

Strasfeld, L., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 413–437. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.01.001>

Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1983. Replication Strategies of the Single Stranded RNA Viruses of Eukaryotes, in: White, R.E., Bockris, J.O., Conway, B.E. (Eds.), *Modern aspects of electrochemistry*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–98. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-69159-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-69159-1_1)

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

Summerford, C., Bartlett, J.S., Samulski, R.J., 1999.  $\alpha V\beta 5$  integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5, 78–82. <https://doi.org/10.1038/4768>

- Sundar, S., 2006. Mechanisms of Substrate Recognition by the AAA+ Protease HslUV. (Tesis). University of California.
- Sundar, S., McGinness, K.E., Baker, T.A., Sauer, R.T., 2010. Multiple sequence signals direct recognition and degradation of protein substrates by the AAA+ protease HslUV. *J. Mol. Biol.* 403, 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.008>
- Sun, J., Savva, C.G., Deaton, J., Ronald Kaback, H., Svrakic, M., Young, R., Holzenburg, A., 2005. Asymmetric binding of membrane proteins to GroEL. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.021>
- Sun, W., 2015. Henipavirus assembly and budding. (Tesis). The Pennsylvania State University.
- Sun, W., McCrory, T.S., Khaw, W.Y., Petzing, S., Myers, T., Schmitt, A.P., 2014. Matrix proteins of Nipah and Hendra viruses interact with beta subunits of AP-3 complexes. *J. Virol.* 88, 13099–13110. <https://doi.org/10.1128/JVI.02103-14>
- Sundquist, W.I., Krausslich, H.G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Suomalainen, M., Greber, U.F., 2013. Uncoating of non-enveloped viruses. *Curr. Opin. Virol.* 3, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.004>
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 45, D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Swamy, M., Siegers, G.M., Minguet, S., Wollscheid, B., Schamel, W.W.A., 2006. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Sci. Signal.* 2006, pl4–pl4. <https://doi.org/10.1126/stke.3452006pl4>
- Takamatsu, Y., Kolesnikova, L., Becker, S., 2018. Ebola virus proteins NP, VP35, and VP24 are essential and sufficient to mediate nucleocapsid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 1075–1080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712263115>

Talekar, A., Pessi, A., Porotto, M., 2011. Infection of primary neurons mediated by Nipah virus envelope proteins: role of host target cells in antiviral action. *J. Virol.* 85, 8422–8426. <https://doi.org/10.1128/JVI.00452-11>

Tan, C.T., Goh, K.J., Wong, K.T., Sarji, S.A., Chua, K.B., Chew, N.K., Murugasu, P., Loh, Y.L., Chong, H.T., Tan, K.S., Thayaparan, T., Kumar, S., Jusoh, M.R., 2002. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann. Neurol.* 51, 703–708. <https://doi.org/10.1002/ana.10212>

Taylor, P.D., Toseand, C.P., Attwood, T.K., Flower, D., 2006. Alpha helical transmembrane proteins: Enhanced prediction using a Bayesian approach. Open Access by Biomedical Bioinformatics Publishing Group.

Thali, M., 2011. Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 529–531. <https://doi.org/10.1042/BST0390529>

The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47: D506-515 (2019)

Thomas, P.D., Campbell M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., Narechania, A., 2003. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.*, 13: 2129-2141 .

Tiong, V., Shu, M.H., Wong, W.F., AbuBakar, S., Chang, L.Y., 2018. Nipah Virus infection of immature dendritic cells increases its transendothelial migration across human brain microvascular endothelial cells. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02747>

Tong, Y., Zhu, Y., Xia, X., Liu, Y., Feng, Y., Hua, X., Chen, Z., Ding, H., Gao, L., Wang, Y., Feitelson, M.A., Zhao, P., Qi, Z.T., 2011. Tupaia CD81, SR-BI, Claudin-1, and Occludin support Hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 85, 2793–2802. <https://doi.org/10.1128/JVI.01818-10>

Tran, G.V.Q., Luong, T.T.D., Park, E.M., Kim, J.W., Choi, J.W., Park, C., Lim, Y.S., Hwang, S.B., 2016. Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Regulates Soluble Resistance-Related Calcium-Binding Protein Activity for Viral Propagation. *J. Virol.* 90, 2794–2805. <https://doi.org/10.1128/JVI.02493-15>



- Van Breedam, W., Pöhlmann, S., Favoreel, H.W., de Groot, R.J., Nauwynck, H.J., 2014. Bitter-sweet symphony: glycan–lectin interactions in virus biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 598–632. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12052>
- van Geest, M., Lolkema, J.S., 2000. Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 13–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.13-33.2000>
- Van Lehn, R.C., Zhang, B., Miller, T.F., 2015. Regulation of multispinning membrane protein topology via post-translational annealing. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08697>
- Velkov, T., Carbone, V., Akter, J., Sivanesan, S., Li, J., Beddoe, T., Marsh, G., 2014. The RNA-dependent-RNA polymerase, an emerging antiviral drug target for the Hendra virus. *Curr. Drug Targets* 15, 103–113. <https://doi.org/10.2174/1389450114888131204163210>
- Verma, I. N., Somia, N., 1997. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242. <https://doi.org/10.1038/38410>
- Vidova, V., Spacil, Z., 2017. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Anal. Chim. Acta* 964, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.059>
- Vivian, J.T., Callis, P.R., 2006. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.*, 80, 2093-109. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8)
- Vogt, C., Eickmann, M., Diederich, S., Moll, M., Maisner, A., 2005. Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J. Virol.* 79, 3865–3872. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3865-3872.2005>
- von Heijne, G., 1995. Membrane protein assembly: Rules of the game. *BioEssays* 17, 25–30. <https://doi.org/10.1002/bies.950170107>
- Voorhees, R.M., Fernández, I.S., Scheres, S.H.W., Hegde, R.S., 2014. Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å Resolution. *Cell* 157, 1632–1643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.024>

Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A.J., Klußmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., Nygren, P.-Å., 2007. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(9) 1527-1550. <http://doi.org/10.1074/mcp.M600431-MCP200>

Walker, C.M., Grakoui, A., 2015. Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection? *Curr. Opin. Immunol.* 35, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.010>

Walker, P.J., Firth, C., Widen, S.G., Blasdel, K.R., Guzman, H., Wood, T.G., Paradkar, P.N., Holmes, E.C., Tesh, R.B., Vasilakis, N., 2015. Evolution of genome size and complexity in the Rhabdoviridae. *PLOS Pathog.* 11, e1004664. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004664>

Walker, S.J., Pizzato, M., Takeuchi, Y., Devereux, S., 2002. Heparin binds to Murine Leukemia virus and inhibits Env-independent attachment and infection. *J. Virol.* 76, 6909–6918. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.6909-6918.2002>

Wallin, E., Heijne, G.V., 2008. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029–1038. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070420>

Walpita, P., Barr, J., Sherman, M., Basler, C.F., Wang, L., 2011. Vaccine potential of Nipah virus-like particles. *PLoS ONE* 6, e18437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018437>

Walter, S., 2002. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/PL00012485>

Wang, L.F., Harcourt, B.H., Yu, M., Tamin, A., Rota, P.A., Bellini, W.J., Eaton, B.T., 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 3, 279–287. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01381-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01381-8)

Wang, Y.E., Park, A., Lake, M., Pentecost, M., Torres, B., Yun, T.E., Wolf, M.C., Holbrook, M.R., Freiberg, A.N., Lee, B., 2010. Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding. *PLoS Pathog.* 6, e1001186. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001186>

- Wang, Y., Tong, X., Omoregie, E.S., Liu, W., Meng, S., Ye, X., 2012. Tetraspanin 6 (TSPAN6) Negatively Regulates Retinoic Acid-inducible Gene I-like Receptor-mediated Immune Signaling in a Ubiquitination-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 287, 34626–34634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390401>
- Watanabe, T., Kawakami, E., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J.S., Matsuoka, Y., Tomita, Y., Kozuka-Hata, H., Gorai, T., Kuwahara, T., Takeda, E., Nagata, A., Takano, R., Kiso, M., Yamashita, M., Sakai-Tagawa, Y., Katsura, H., Nonaka, N., Fujii, H., Fujii, K., Sugita, Y., Noda, T., Goto, H., Fukuyama, S., Watanabe, S., Neumann, G., Oyama, M., Kitano, H., Kawaoka, Y., 2014. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* 16, 795–805. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.002>
- Watkinson, R.E., Lee, B., 2016. Nipah virus matrix protein: expert hacker of cellular machines. *FEBS Lett.* 590, 2494–2511. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12272>
- Weingartl, H., 2015. Hendra and Nipah viruses: pathogenesis, animal models and recent breakthroughs in vaccination. *Vaccine Dev. Ther.* 59. <https://doi.org/10.2147/VDT.S86482>
- Weingartl, H.M., Berhane, Y., Caswell, J.L., Loosmore, S., Audonnet, J.-C., Roth, J.A., Czub, M., 2006. Recombinant Nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J. Virol.* 80, 7929–7938. <https://doi.org/10.1128/JVI.00263-06>
- Weingartl, H.M., Berhane, Y., Czub, M., 2009. Animal models of Henipavirus infection: A review. *Vet. J.* 181, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.10.016>
- White, J.M., Delos, S.E., Brecher, M., Schornberg, K., 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43, 189–219. <https://doi.org/10.1080/10409230802058320>
- Wild, J., Altman, E., Yura, T., Gross, C.A., 1992. DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6(7):1165-72. <https://doi.org/10.1101/gad.6.7.1165>
- Wishart, D.S., 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 34, D668–D672. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>

Wong, Kum Thong, Shieh, W.J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Chua, K.B., Lam, S.K., Tan, C.T., Goh, K.J., Chong, H.T., Jusoh, R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., 2002. Pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis 161, 15. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64493-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64493-8)

Wong, K. T., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Tan, C.T., 2002. Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. *Springer Semin. Immunopathol.* 24, 215–228. <https://doi.org/10.1007/s00281-002-0106-y>

Wynne, J.W., Shiell, B.J., Marsh, G.A., Boyd, V., Harper, J.A., Heesom, K., Monaghan, P., Zhou, P., Payne, J., Klein, R., Todd, S., Mok, L., Green, D., Bingham, J., Tachedjian, M., Baker, M.L., Matthews, D., Wang, L.F., 2014. Proteomics informed by transcriptomics reveals Hendra virus sensitizes bat cells to TRAIL-mediated apoptosis 21. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1718798964145132>

Xu, K., Rajashankar, K.R., Chan, Y.P., Himanen, J.P., Broder, C.C., Nikolov, D.B., 2008. Host cell recognition by the henipaviruses: Crystal structures of the Nipah G attachment glycoprotein and its complex with ephrin-B3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9953–9958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804797105>

Xu, X.F., Chen, Z.T., Zhang, J.L., Chen, W., Wang, J.L., Tian, Y.P., Gao, N., An, J., 2008. Rab8, a vesicular traffic regulator, is involved in dengue virus infection in HepG2 cells. *Intervirology* 51, 182–188. <https://doi.org/10.1159/000151531>

Yamauchi, Y., Helenius, A., 2013. Virus entry at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1289–1295. <https://doi.org/10.1242/jcs.119685>

Yeagle, P.L., 2012 Membrane Proteins. Chapter 10 publish in: *The membranes of cells.* 3rd edition. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800047-2.00010-3>

Yin, H.S., Paterson, R.G., Wen, X., Lamb, R.A., Jardetzky, T.S., 2005. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 9288–9293. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503989102>

Yin, P., Hong, Z., Yang, X., Chung, R.T., Zhang, L., 2016. A role for retromer in hepatitis C virus replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 869–881. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2027-7>

Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Georges-Courbot, M.-C., Ikeda, F., Omi, M., Muto-Terao, Y., Wild, T.F., Kai, C., 2010. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS ONE* 5, e12709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012709>

Yoo, Y.H., Yun, J., Yoon, C.N., Lee, J.-S., 2015. Chemical proteomic identification of T-plastin as novel host cell response factor in HCV infection 8. <https://doi.org/10.1038/srep09773>

Zhang, S., Cubas, R., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2009. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Mol. Immunol.* 46, 1988–2001. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.03.008>

Zhang, S.Y., Lu, Y.Y., Peng, Z.H., 2012. Recombinant Adenoviral-p53 agent (Gendicine®), in: recent advances in cancer research and therapy. Elsevier, pp. 215–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397833-2.00010-8>

Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.C., Yates, J.R., 2013. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem. Rev.* 113, 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>

Zhang, Y., Bilbao, A., Bruderer, T., Luban, J., Strambio-De-Castillia, C., Lisacek, F., Hopfgartner, G., Varesio, E., 2015. The Use of Variable Q1 Isolation Windows Improves Selectivity in LC-SWATH-MS Acquisition. *J Proteome Res*; 14(10):4359- <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00543>

Zhao, K.N., Frazer, I.H., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* is permissive for replication of Bovine Papillomavirus type 1. *J. Virol.* 76, 12265–12273. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12265-12273.2002>

Zhou, P., Zhai, S., Zhou, X., Lin, P., Jiang, T., Hu, X., Jiang, Y., Wu, B., Zhang, Q., Xu, X., Li, J., Liu, B., 2011. Molecular Characterization of Transcriptome-wide Interactions between Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Alveolar Macrophages in vivo. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 947–959. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.947>

Zhu, J.D., Meng, W., Wang, X.J., Wang, H.C.R., 2015. Broad-spectrum antiviral agents. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00517>

Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.M., 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2010/840518>

Zingaretti, C., De Francesco, R., Abrignani, S., 2014. Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine? *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 103–109. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12493>

# ANEXOS





## **ANEXO 1**

### **Medio SOB (1 L):**

20 gr de bacto peptona  
5 g de extracto de levadura  
0,584 gr de NaCl  
0,186 gr de KCl  
Hasta 1 L de agua MQ

### **Medio TB (1 L):**

#### *Solución I (900 ml)*

8 ml de glicerol  
12 gr de triptona  
24 gr de extracto de levadura  
Agua destilada hasta 900 ml

#### *Solución II (100 ml)*

12,54 gr de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,32 gr de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
agua destilada hasta 100 ml  
autoclavar las dos soluciones por separado y mezclar en frío.

### **Medio LB (1 L):**

5 gr de extracto de levadura  
10 gr de triptona  
10 gr de NaCl  
Hasta 1 L de agua destilada

### **Tampón WB (1 L):**

100 ml de glicerol  
900 ml de agua MQ

### **Tampón de carga (10 ml):**

0,6 ml de Tris-HCl 1M pH 6,8  
2,5 ml de glicerol  
2 ml de SDS 10%  
0,5 ml de 2-β-mercaptoetanol  
1 ml de azul de bromofenol 1%  
Hasta 10 ml de agua MQ

**TBS (1 L):**

8,76 gr de NaCl  
6,05 Tris-HCl  
pH 7.6

**Tampón A:**

Tris-buffered saline (TBS)  
pH 7,5  
0,5% SDS

**Tampón de electroforesis de proteínas (1 L):**

15,01 gr de glicina  
3,03 gr de tris base  
1 gr de SDS

**Colorante de electroforesis de proteínas (1L):**

1 gr de azul coomasie  
100 ml de ácido acético glacial al 10%  
450 ml de metanol al 45%

**Solución B para los geles de poliacrilamida (1L):**

181,7 gr Tris 1,5 M  
4 gr de SDS 0,4%  
Hasta 1 L de agua milliQ  
Ajustar el pH con HCl hasta 8,8

**Solución C para los geles de poliacrilamida (1L):**

60,55 gr de Tris 0,5M  
4 gr de SDS al 0,4%  
Hasta 1L de agua milliQ  
Ajustar el pH con HCl hasta 6,8

**Gel separador**

3,1 ml de acrilamida  
2 ml agua milliQ

1,15 ml de solución C para los geles de poliacrilamida (ANEXO)  
75 µl de persulfato de amonio 10%  
75 µl de TEMED

### **Gel concentrador**

0,4 ml de acrilamida  
0,75 ml de solución B para geles de poliacrilamida (ANEXO)  
1,85 ml de agua milliQ  
20 µl persulfato amónico al 10%  
2 µl de TEMED

### **Fijador Karnovsky**

3% glutaraldehyde  
2% formaldehyde  
0.1M phosphate buffer, pH 7.4.

## ANEXO 2

### Secuencia de la quimera TM en *E. coli*

atggcaacttcaactaaaaaattacataaagaacctgcgactttaattaagcgattgat  
M A T S T K K L H K E P A T L I K A I D  
ggtgatacggttaaattaatgtacaaaagggtcaaccaatgacattcagactattattgggt  
G D T V K L M Y K G Q P M T F R L L L V  
gatacacctgaaacaaagcatcctaaaaaagggtgtagagaaatattggctcctgaagcaagt  
D T P E T K H P K K G V E K Y G P E A S  
gcatttacgaaaaaaatggtagaaaaatgcaagaaaattgaagtcgagtttgacaaaggt  
A F T K K M V E N A K K I E V E F D K G  
caaagaactgataaatatggacgtggcttagcgtatatttatgctgatggaaaaatggta  
Q R T D K Y G R G L A Y I Y A D G K M V  
aacgaagcttttagttcgtcaaggcttggtctaaagttgcttatgtttacaacctaacaat  
N E A L V R Q G L A K V A Y V Y K P N N  
acacatgaacaacatttaagaaaaagtgaagcacaagcgaaaaagagaaattaatatt  
T H E Q H L R K S E A Q A K K E K L N I  
tggagcgaagacaacgctgattcgggccagaaagggtacaacttgcccatcatttctct  
W S E D N A D S G P E R V Q L A H H F S  
gaactcgagataaacctcattatTTTTGGGGTgatggctgggtgattattggaacgatcctc  
E L E I T L I I F G V M A G V I G T I L  
ttaatttcttacggtagcccgccgactgataaagaaaagcccatctgatgtaaacctctc  
L I S Y G T R R L I K K S P S D V K P L  
ccctcacctgacacagacgtgcctttaagttctggtgaaattgagaacccccgaaacttcg  
P S P D T D V P L S S V E I E N P E T S  
gaccagcaccatcatcatcaccactagg  
D Q H H H H H H -

### Secuencia de la quimera $\Delta$ TM en *E. coli*

atggcaacttcaactaaaaaattacataaagaacctgcgactttaattaagcgattgat  
M A T S T K K L H K E P A T L I K A I D  
ggtgatacggttaaattaatgtacaaaagggtcaaccaatgacattcagactattattgggt  
G D T V K L M Y K G Q P M T F R L L L V  
gatacacctgaaacaaagcatcctaaaaaagggtgtagagaaatattggctcctgaagcaagt  
D T P E T K H P K K G V E K Y G P E A S  
gcatttacgaaaaaaatggtagaaaaatgcaagaaaattgaagtcgagtttgacaaaggt  
A F T K K M V E N A K K I E V E F D K G  
caaagaactgataaatatggacgtggcttagcgtatatttatgctgatggaaaaatggta  
Q R T D K Y G R G L A Y I Y A D G K M V  
aacgaagcttttagttcgtcaaggcttggtctaaagttgcttatgtttacaacctaacaat  
N E A L V R Q G L A K V A Y V Y K P N N  
acacatgaacaacatttaagaaaaagtgaagcacaagcgaaaaagagaaattaatatt  
T H E Q H L R K S E A Q A K K E K L N I  
tggagcgaagacaacgctgattcgggccagaaagggtacaacttgcccatcatttctct  
W S E D N A D S G P E R V Q L A H H F S  
gaactcgagggtagcccgccgactgataaagaaaagcccatctgatgtaaacctctcccc  
E L E G T R R L I K K S P S D V K P L P  
tcacctgacacagacgtgcctttaagttctggtgaaattgagaacccccgaaacttcggac  
S P D T D V P L S S V E I E N P E T S D  
cagcaccatcatcatcaccactagg  
Q H H H H H H -

**ANEXO 3:** Descripción de las proteínas del interactoma asociado a las quimeras TM y  $\Delta TM$ . Se indica el nombre completo de cada proteína (Nombre proteína), el identificador en Uniprot (Identificador Uniprot), el nombre abreviado (Proteína) y el gen que codifica para cada proteína (Gen). Se muestran además los estadísticos p-valor y FDR de los test-t realizados, así como la tasa de cambio (log2FC), y la significatividad del análisis. Las proteínas que muestran un log2FC positivos se encuentran sobre-representadas en la quimera TM, mientras que los valores negativos indican que se encuentran sobre-representadas en la quimera  $\Delta TM$ .

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
1	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	P0ABP8	DEOD	<i>deoD</i>	5,95E-20	6,59E-17	-2,36	Sí
2	Uridine phosphorylase	P12758	UDP	<i>udp</i>	9,02E-19	5,00E-16	-2,84	Sí
3	Cell division protein FtsZ	P0A9A6	FTSZ	<i>ftsZ</i>	6,71E-18	2,48E-15	2,06	Sí
4	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	P0A6H5	HSLU	<i>hslU</i>	2,23E-17	6,17E-15	4,22	Sí
5	Signal recognition particle protein	P0AGD7	SRP54	<i>ffh</i>	3,73E-17	8,26E-15	3,10	Sí
6	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	P0AEK2	FABG	<i>fabG</i>	1,56E-16	2,89E-14	-2,21	Sí
7	Thioredoxin reductase	P0A9P4	TRXB	<i>traB</i>	4,89E-16	7,74E-14	-1,31	Sí
8	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	P08200	IDH	<i>icd</i>	3,12E-15	3,84E-13	-1,74	Sí
9	Rod shape-determining protein MreB	P0A9X4	MREB	<i>mreB</i>	3,10E-15	4,80E-13	2,80	Sí
10	Septum site-determining protein MinD	P0AEZ3	MIND	<i>minD</i>	9,52E-15	9,59E-13	1,81	Sí
11	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	P05459	PDXB	<i>pdxB</i>	8,72E-15	9,66E-13	-1,59	Sí
12	Methionine synthase	P13009	METH	<i>metH</i>	3,69E-14	3,41E-12	3,24	Sí
13	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	P0A991	ALF1	<i>fbaB</i>	4,75E-14	4,05E-12	-1,66	Sí
14	Chloramphenicol acetyltransferase	P62577	CAT	<i>cat</i>	7,38E-14	5,84E-12	-2,60	Sí
15	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	P45523	FKBA	<i>fkpA</i>	1,36E-13	9,99E-12	-2,31	Sí
16	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	P33195	GCSP	<i>gcvP</i>	1,28E-13	9,49E-12	-1,82	Sí
17	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	P0A993	F16PA	<i>fbp</i>	2,55E-13	1,66E-11	-1,41	Sí
18	Chaperone protein DnaJ	Q8XA65	DNAJ	<i>dnaJ</i>	3,36E-13	2,07E-11	2,81	Sí
19	Elongation factor Ts	P0A6P1	EFTS	<i>tsf</i>	3,58E-13	2,09E-11	-2,21	Sí
20	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC	P08506	DACC	<i>dacC</i>	4,39E-13	2,43E-11	1,84	Sí
21	Glutamate-tRNA ligase	P04805	SYE	<i>gltX</i>	4,71E-13	2,49E-11	-1,62	Sí
22	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	P0AE08	AHPC	<i>ahpC</i>	1,09E-12	5,50E-11	-2,21	Sí
23	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB	P0A9V1	LPTB	<i>lptB</i>	1,21E-12	5,84E-11	1,77	Sí
24	GTPase Obg	B7UJ76	OBG	<i>obg</i>	1,53E-12	7,08E-11	1,68	Sí
25	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 1	P0A953	FABB	<i>fabB</i>	1,96E-12	8,68E-11	-1,57	Sí
26	Superoxide dismutase [Fe]	P0AGD3	SODF	<i>sodF</i>	5,20E-12	2,06E-10	-1,96	Sí
27	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	P0AF12	MTNN	<i>mtnN</i>	5,57E-12	2,13E-10	-1,17	Sí
28	Bifunctional protein HldE	P76658	HLDE	<i>hldE</i>	5,19E-12	2,13E-10	1,35	Sí
29	Methionine aminopeptidase	P0AE18	MAP1	<i>map</i>	5,18E-12	2,21E-10	-1,34	Sí
30	Deoxyribose-phosphate aldolase	P0A6L0	DEOC	<i>deoC</i>	6,05E-12	2,23E-10	-1,91	Sí
31	Aminomethyltransferase	P27248	GCST	<i>gcvT</i>	6,79E-12	2,43E-10	-1,29	Sí
32	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	P13035	GLPD	<i>glpD</i>	9,80E-12	3,39E-10	2,82	Sí
33	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	P0A887	UBIE	<i>ubiE</i>	1,53E-11	5,15E-10	1,60	Sí
34	Phage shock protein A	P0AFM6	PSPA	<i>pspA</i>	1,78E-11	5,81E-10	2,07	Sí
35	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ	P0C8J8	GATZ	<i>gatZ</i>	1,88E-11	5,94E-10	-1,51	Sí
36	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	P0ABH9	CLPA	<i>clpA</i>	2,36E-11	7,26E-10	2,53	Sí
37	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	P0ACB2	HEM2	<i>hemB</i>	2,58E-11	7,73E-10	1,57	Sí
38	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	P77488	DXS	<i>dxs</i>	2,96E-11	8,21E-10	2,30	Sí
39	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	P35340	AHPF	<i>ahpF</i>	3,08E-11	8,31E-10	-1,79	Sí
40	Protein YhfA	P0ADX1	YHFA	<i>yhfA</i>	2,86E-11	8,33E-10	-2,02	Sí
41	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	P0A722	LPXA	<i>lpxA</i>	2,95E-11	8,38E-10	-2,07	Sí
42	Asparagine-tRNA ligase	P0A8M0	SYN	<i>asnS</i>	3,87E-11	1,02E-09	-1,73	Sí
43	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit	P07395	SYFB	<i>pheT</i>	4,28E-11	1,10E-09	-1,11	Sí
44	Aspartate ammonia-lyase	P0AC38	ASPA	<i>aspA</i>	5,72E-11	1,44E-09	-1,50	Sí
45	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI	P0AEK4	FABI	<i>fabI</i>	7,04E-11	1,73E-09	-1,81	Sí
46	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	P0A6L2	DAPA	<i>dapA</i>	8,24E-11	1,99E-09	-1,89	Sí
47	Ferritin-1	P0A998	FTNA	<i>ftnA</i>	1,12E-10	2,59E-09	-2,79	Sí
48	Cytosol non-specific dipeptidase	P15288	PEPD	<i>pepD</i>	1,15E-10	2,61E-09	-1,19	Sí
49	50S ribosomal protein L10	P0A7J3	RL10	<i>rplJ</i>	1,11E-10	2,62E-09	1,58	Sí
50	NADH dehydrogenase	P00393	DHNA	<i>ndh</i>	1,64E-10	3,64E-09	1,48	Sí
51	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	P0A9D8	DAPD	<i>dapD</i>	2,15E-10	4,58E-09	-1,69	Sí
52	Serine hydroxymethyltransferase	P0A825	GLYA	<i>glyA</i>	2,12E-10	4,61E-09	-2,41	Sí
53	Glucokinase	P0A6V8	GLK	<i>glk</i>	2,80E-10	5,85E-09	-1,61	Sí
54	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	P0ADG7	IMDH	<i>guaB</i>	3,40E-10	6,98E-09	-1,24	Sí
55	Uncharacterized protein YqjD	P64581	YQJD	<i>yqjD</i>	3,60E-10	7,26E-09	2,27	Sí
56	Biosynthetic arginine decarboxylase	P21170	SPEA	<i>speA</i>	4,51E-10	8,76E-09	-1,70	Sí
57	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	P0A9B2	G3P1	<i>gapA</i>	4,45E-10	8,80E-09	-1,71	Sí
58	Ribonucleotide monophosphatase NagD	P0AF24	NAGD	<i>nagD</i>	4,63E-10	8,85E-09	-1,48	Sí
59	Arginine-tRNA ligase	P11875	SYR	<i>argS</i>	5,78E-10	1,09E-08	-1,07	Sí
60	FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P0A9L3	FKBB	<i>fklB</i>	6,11E-10	1,11E-08	-2,07	Sí
61	Protein translocase subunit SecD	P0AG90	SECD	<i>secD</i>	6,02E-10	1,11E-08	1,45	Sí
62	Cell division protein FtsA	P0ABH0	FTSA	<i>ftsA</i>	6,49E-10	1,16E-08	1,53	Sí
63	Trigger factor	P0A850	TIG	<i>tig</i>	8,61E-10	1,51E-08	-1,23	Sí
64	Protein translocase subunit SecA	P10408	SECA	<i>secA</i>	1,36E-09	2,35E-08	1,90	Sí
65	Outer membrane protein A	P0A910	OMPA	<i>ompA</i>	1,39E-09	2,36E-08	2,01	Sí
66	Chaperone protein Skp	P0AEU7	SKP	<i>skp</i>	1,46E-09	2,45E-08	-1,10	Sí
67	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	P22259	PCKA	<i>pckA</i>	1,57E-09	2,60E-08	-1,33	Sí
68	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase	P39199	PRMB	<i>prnB</i>	3,25E-09	5,22E-08	-1,34	Sí
69	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	P0A744	MSRA	<i>msrA</i>	3,23E-09	5,26E-08	-2,22	Sí
70	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	P0A717	KPRS	<i>prs</i>	3,47E-09	5,41E-08	-1,32	Sí

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
71	2-dehydro-3-deoxyphosphoacetate aldolase	P0A715	KDSA	<i>kdsA</i>	3,45E-09	5,47E-08	-1,50	Sí
72	Ketol-acid reductoisomerase	P05793	ILVC	<i>iloC</i>	5,03E-09	7,74E-08	-1,12	Sí
73	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	P11446	ARGC	<i>argC</i>	6,13E-09	9,31E-08	-1,14	Sí
74	D-lactate dehydrogenase	P06149	DLD	<i>dld</i>	8,25E-09	1,23E-07	2,02	Sí
75	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	P33599	NUOCD	<i>nuoC</i>	9,19E-09	1,36E-07	1,27	Sí
76	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose-oxoglutarate aminotransferase	P77690	ARNB	<i>arnB</i>	9,67E-09	1,41E-07	-1,09	Sí
77	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	P0A6R0	FABH	<i>fabH</i>	9,92E-09	1,41E-07	-1,06	Sí
78	Uncharacterized protein YraP	P64596	YRAP	<i>yraP</i>	9,86E-09	1,42E-07	1,60	Sí
79	Curved DNA-binding protein	P36659	CBPA	<i>cbpA</i>	1,03E-08	1,44E-07	1,51	Sí
80	Protein RecA	P0A7G6	RECA	<i>recA</i>	1,09E-08	1,50E-07	1,52	Sí
81	Multidrug efflux pump subunit AcrA	P0AE06	ACRA	<i>acrA</i>	1,59E-08	2,18E-07	1,70	Sí
82	Multifunctional CCA protein	P06961	CCA	<i>cca</i>	1,63E-08	2,20E-07	-1,34	Sí
83	Phosphoglycerate kinase	P0A799	PGK	<i>pgk</i>	1,99E-08	2,66E-07	-1,13	Sí
84	Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	P38489	NFNB	<i>nfnB</i>	2,09E-08	2,75E-07	-1,46	Sí
85	Formate dehydrogenase-O major subunit	P32176	FDOG	<i>fdoG</i>	2,40E-08	3,13E-07	1,04	Sí
86	Cysteine synthase A	P0ABK5	CYSK	<i>cysK</i>	2,48E-08	3,20E-07	-1,72	Sí
87	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1	P0ABJ9	CYDA	<i>cydA</i>	2,64E-08	3,36E-07	1,87	Sí
88	Inner membrane protein YhcB	P0ADW3	YHCB	<i>yhcB</i>	2,92E-08	3,64E-07	1,87	Sí
89	Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	P69783	PTGA	<i>crr</i>	2,90E-08	3,65E-07	-1,30	Sí
90	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	P0A6V1	GLGC	<i>glgC</i>	3,54E-08	4,36E-07	-2,39	Sí
91	Small heat shock protein IbpA	P0C054	IBPA	<i>ibpA</i>	3,71E-08	4,47E-07	2,15	Sí
92	Methionine-tRNA ligase	BI1YW7	SYM	<i>metG</i>	3,69E-08	4,50E-07	-1,03	Sí
93	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23869	PPIB	<i>ppiB</i>	4,13E-08	4,92E-07	-0,99	No
94	Uncharacterized protein YcbL	P75849	YCBL	<i>ycbL</i>	4,60E-08	5,42E-07	-2,10	Sí
95	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase	P22188	MURE	<i>murE</i>	4,84E-08	5,64E-07	-1,99	Sí
96	Adenylosuccinate synthetase	P0A7D4	PURA	<i>purA</i>	5,13E-08	5,92E-07	-1,30	Sí
97	Uncharacterized protein YbjS	P75821	YBJS	<i>ybjS</i>	5,30E-08	6,06E-07	1,12	Sí
98	ATP-dependent RNA helicase RhlB	P0A8J8	RHLB	<i>rhlB</i>	5,49E-08	6,21E-07	1,51	Sí
99	DNA repair protein RadA	P24554	RADA	<i>radA</i>	6,65E-08	7,45E-07	1,82	Sí
100	33 kDa chaperonin	P0A6Y5	HSLO	<i>hslO</i>	6,86E-08	7,61E-07	1,32	Sí
101	Cell division topological specificity factor	P0A734	MINE	<i>minE</i>	7,05E-08	7,74E-07	1,97	Sí
102	N utilization substance protein B	P0A780	NUSB	<i>nusB</i>	8,03E-08	8,73E-07	1,09	Sí
103	Acetyltransferase YpeA	P76539	YPEA	<i>ypeA</i>	8,46E-08	9,10E-07	-1,16	Sí
104	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	P0AAI5	FABF	<i>fabF</i>	9,12E-08	9,62E-07	-1,22	Sí
105	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	P0A9S3	GATD	<i>gatD</i>	9,10E-08	9,69E-07	-1,36	Sí
106	Uncharacterized electron transport protein YkgF	P77536	YKGF	<i>ykgF</i>	1,01E-07	1,05E-06	1,39	Sí
107	NADP-specific glutamate dehydrogenase	P00370	DHE4	<i>gdhA</i>	1,01E-07	1,05E-06	-1,58	Sí
108	Isoaspartyl dipeptidase	P39377	IADA	<i>iadA</i>	1,04E-07	1,06E-06	-1,72	Sí
109	Bacterioferritin	P0ABD3	BFR	<i>bfr</i>	1,08E-07	1,09E-06	-1,87	Sí
110	CTP synthase	P0A7E5	PYRG	<i>pyrG</i>	1,17E-07	1,18E-06	-1,51	Sí
111	ATP synthase subunit beta	P0ABB4	ATPB	<i>atpD</i>	1,32E-07	1,32E-06	0,95	No
112	Cell division ATP-binding protein FtsE	P0A9R7	FTSE	<i>ftsE</i>	1,41E-07	1,39E-06	1,73	Sí
113	Aconitate hydratase 2	P36683	ACON2	<i>acnB</i>	1,49E-07	1,45E-06	-1,29	Sí
114	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme Nnr	P31806	NNR	<i>nnr</i>	1,48E-07	1,46E-06	-1,31	Sí
115	Fe/S biogenesis protein NfuA	P63020	NFUA	<i>nfuA</i>	1,56E-07	1,49E-06	-1,74	Sí
116	UPF0047 protein YjbQ	P0AF48	YJBQ	<i>yjbQ</i>	1,56E-07	1,51E-06	1,81	Sí
117	Methionyl-tRNA formyltransferase	P23882	FMT	<i>fnt</i>	1,65E-07	1,57E-06	-1,33	Sí
118	Threonine-tRNA ligase	P0A8M3	SYT	<i>thrS</i>	1,83E-07	1,72E-06	-1,11	Sí
119	10 kDa chaperonin	P0A6F9	CH10	<i>groS</i>	2,23E-07	2,08E-06	-1,73	Sí
120	Agmatinase	P60651	SPEB	<i>speB</i>	2,58E-07	2,38E-06	-1,39	Sí
121	Chromosomal replication initiator protein DnaA	P03004	DNAA	<i>dnaA</i>	2,74E-07	2,51E-06	0,93	No
122	Tryptophanase	P0A853	TNAA	<i>tnaA</i>	2,82E-07	2,56E-06	-1,83	Sí
123	DNA polymerase III subunit beta	P0A988	DPO3B	<i>dnaN</i>	3,43E-07	3,06E-06	-0,79	No
124	NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase YdfG	P39831	YDFG	<i>ydfG</i>	3,41E-07	3,07E-06	-1,34	Sí
125	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	P0A8G6	NQOR	<i>nrhA</i>	3,58E-07	3,18E-06	-1,47	Sí
126	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	P0ABD5	ACCA	<i>accA</i>	3,70E-07	3,26E-06	-0,68	No
127	Formyltetrahydrofolate deformylase	P0A440	PURU	<i>purU</i>	3,76E-07	3,28E-06	-1,23	Sí
128	Uncharacterized protein YkgE	P77252	YKGE	<i>ykgE</i>	3,85E-07	3,33E-06	1,12	Sí
129	Membrane protein insertase YidC	P25714	YIDC	<i>yidC</i>	4,46E-07	3,83E-06	1,82	Sí
130	Thymidine kinase	P23331	KITH	<i>tdk</i>	4,91E-07	4,19E-06	-1,68	Sí
131	Pyruvate kinase I	P0AD61	KPYK1	<i>pykF</i>	5,36E-07	4,53E-06	-1,33	Sí
132	Trehalose-6-phosphate hydrolase	P28904	TREC	<i>treC</i>	6,89E-07	5,78E-06	-1,46	Sí
133	Phosphoglucosamine mutase	P31120	GLMM	<i>glmM</i>	7,43E-07	6,19E-06	-1,07	Sí
134	Phosphate import ATP-binding protein PstB	P0AAH0	PSTB	<i>pstB</i>	7,80E-07	6,45E-06	1,84	Sí
135	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	P0AAI3	FTSH	<i>ftsH</i>	8,40E-07	6,90E-06	1,34	Sí
136	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1	P0AB18	CYOB	<i>cyoB</i>	8,57E-07	6,98E-06	1,54	Sí
137	Bifunctional protein PutA	P09546	PUTA	<i>putA</i>	8,65E-07	6,99E-06	1,64	Sí
138	Iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	P0ACC3	ERPA	<i>erpA</i>	8,94E-07	7,12E-06	-1,33	Sí
139	50S ribosomal protein L5	P62399	RL5	<i>rplE</i>	8,91E-07	7,15E-06	1,08	Sí
140	Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	P08312	SYFA	<i>pheS</i>	9,61E-07	7,60E-06	-0,67	No
141	Ribonuclease E	P21513	RNE	<i>rne</i>	9,88E-07	7,76E-06	1,75	Sí
142	Oligopeptidase A	P27298	OPDA	<i>priC</i>	1,06E-06	8,25E-06	-1,09	Sí
143	Uncharacterized protein YbgA	P24252	YBGA	<i>ybgA</i>	1,11E-06	8,64E-06	1,32	Sí
144	Phosphoheptose isomerase	P63224	GMHA	<i>gmhA</i>	1,25E-06	9,56E-06	-1,89	Sí
145	Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	P31658	HCHA	<i>hchA</i>	1,25E-06	9,63E-06	2,25	Sí
146	Fructose-bisphosphate aldolase class 2	P0AB71	ALF	<i>ftaA</i>	1,33E-06	1,01E-05	-1,48	Sí
147	Uncharacterized protease YegQ	P76403	YEGQ	<i>yegQ</i>	1,37E-06	1,03E-05	-1,97	Sí
148	Elongation factor 4	P60785	LEPA	<i>lepA</i>	1,37E-06	1,03E-05	0,76	No
149	30S ribosomal protein S20	P0A7U7	RS20	<i>rpsT</i>	1,51E-06	1,12E-05	0,74	No
150	Fumarate hydratase class I, aerobic	P0AC33	FUMA	<i>fumA</i>	1,62E-06	1,20E-05	-0,78	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
151	Protein YdgA	P77804	YDGA	<i>ydgA</i>	1,78E-06	1,31E-05	1,17	Sí
152	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	P08839	PT1	<i>ptsI</i>	1,84E-06	1,34E-05	-0,72	No
153	Oxidoreductase YdhF	P76187	YDHF	<i>ydhF</i>	1,95E-06	1,41E-05	-1,70	Sí
154	Hydroxyethylthiazole kinase	P76423	THIM	<i>thiM</i>	2,28E-06	1,64E-05	1,53	Sí
155	Pyruvate dehydrogenase complex repressor	P0ACL9	PDHR	<i>pdhR</i>	2,33E-06	1,67E-05	1,21	Sí
156	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	P04079	GUAA	<i>guaA</i>	2,36E-06	1,67E-05	-1,12	Sí
157	Transcriptional regulatory protein PhoP	P23836	PHOP	<i>phoP</i>	2,54E-06	1,79E-05	-0,87	No
158	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YadG	P36879	YADG	<i>yadG</i>	2,60E-06	1,81E-05	2,09	Sí
159	Uncharacterized protein YibN	P0AG27	YIBN	<i>yibN</i>	2,59E-06	1,82E-05	1,23	Sí
160	Universal stress protein C	P46888	USPC	<i>uspC</i>	2,81E-06	1,94E-05	2,18	Sí
161	D-lactate dehydrogenase	P52643	LDHD	<i>ldhA</i>	3,11E-06	2,14E-05	-1,71	Sí
162	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	P0AF93	RIDA	<i>ridA</i>	3,17E-06	2,17E-05	-2,43	Sí
163	UPF0145 protein YbjQ	P0A8C1	YBJQ	<i>ybjQ</i>	3,35E-06	2,28E-05	2,38	Sí
164	tRNA-modifying protein YgfZ	P0ADE8	YGFZ	<i>ygfZ</i>	3,64E-06	2,46E-05	-0,88	No
165	Biotin carboxylase	P24182	ACCC	<i>accC</i>	3,97E-06	2,67E-05	-1,00	No
166	ABC transporter arginine-binding protein 1	P30860	ARTJ	<i>artJ</i>	4,24E-06	2,83E-05	-1,38	Sí
167	HTH-type transcriptional repressor IscR	P0AGK8	ISCR	<i>iscR</i>	4,83E-06	3,20E-05	1,79	Sí
168	Hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase	P76422	THID	<i>thiD</i>	5,14E-06	3,39E-05	0,97	No
169	Protein YiiM	P32157	YIIM	<i>yiiM</i>	5,23E-06	3,43E-05	-1,40	Sí
170	Isocitrate lyase	P0A9G6	ACEA	<i>aceA</i>	5,37E-06	3,50E-05	-1,35	Sí
171	Carbonic anhydrase 2	P61517	CAN	<i>can</i>	5,92E-06	3,83E-05	-0,97	No
172	Probable ATP-dependent helicase YoaA	P76257	YOAA	<i>yoaA</i>	6,42E-06	4,11E-05	2,32	Sí
173	KHG/KDPG aldolase	P0A955	ALKH	<i>eda</i>	6,39E-06	4,12E-05	-1,20	Sí
174	Multidrug efflux pump subunit AcrB	P31224	ACRB	<i>acrB</i>	6,59E-06	4,20E-05	1,57	Sí
175	Uncharacterized tRNA/rRNA methyltransferase YfiF	P0AGJ5	YFIF	<i>yfiF</i>	6,72E-06	4,26E-05	1,15	Sí
176	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD	P75957	LOLD	<i>lolD</i>	7,03E-06	4,42E-05	1,25	Sí
177	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P0A6G7	CLPP	<i>clpP</i>	7,19E-06	4,50E-05	-1,11	Sí
178	S-ribosylhomocysteine lyase	P45578	LUXS	<i>luxS</i>	7,45E-06	4,64E-05	-1,35	Sí
179	Sensor protein CpxA	P0AE82	CPXA	<i>cpxA</i>	8,02E-06	4,97E-05	1,01	Sí
180	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase	B7M5C6	GPPA	<i>gppA</i>	8,21E-06	5,05E-05	-0,98	No
181	Elongation factor G	P0A6M8	EFG	<i>fusA</i>	8,27E-06	5,06E-05	-1,11	Sí
182	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	P60390	RSMH	<i>rsmH</i>	9,27E-06	5,64E-05	-0,92	No
183	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase	P11880	MURF	<i>murF</i>	9,93E-06	6,01E-05	-1,28	Sí
184	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	P0AFD6	NUOI	<i>nuoI</i>	1,07E-05	6,46E-05	1,39	Sí
185	Putative NAD(P)H nitroreductase YdjA	P0ACY1	YDJA	<i>ydjA</i>	1,16E-05	6,97E-05	-1,10	Sí
186	Glutathione reductase	P06715	GSHR	<i>gor</i>	1,35E-05	8,07E-05	-1,92	Sí
187	PTS system mannose-specific EIIB component	P69797	PTNAB	<i>manX</i>	1,40E-05	8,31E-05	1,55	Sí
188	Chaperone SurA	P0ABZ6	SURA	<i>surA</i>	1,44E-05	8,46E-05	-1,05	Sí
189	Tail-specific protease	P23865	PRC	<i>prc</i>	1,53E-05	8,96E-05	0,86	No
190	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit	P0AAJ5	FDOH	<i>fdoh</i>	1,54E-05	8,97E-05	1,69	Sí
191	Thiol peroxidase	P0A862	TPX	<i>tpx</i>	1,56E-05	9,05E-05	-0,99	No
192	Uncharacterized protein YiaF	P0ADK0	YIAF	<i>yiaF</i>	1,66E-05	9,57E-05	2,01	Sí
193	Chromosome initiation inhibitor	P0A8S1	ICIA	<i>icia</i>	1,70E-05	9,73E-05	1,14	Sí
194	UPF0294 protein YafD	P0A8U2	YAFD	<i>yafD</i>	1,70E-05	9,73E-05	1,15	Sí
195	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	P0ADY1	PPID	<i>ppiD</i>	1,77E-05	0,0001006261	1,07	Sí
196	Thiol-disulfide interchange protein DsbC	P0AEG6	DSBC	<i>dsbC</i>	1,92E-05	0,0001084461	-2,12	Sí
197	DNA polymerase III subunit alpha	Q8X8X5	DPO3A	<i>dnaE</i>	1,98E-05	0,0001113577	0,88	No
198	Probable pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	P52647	NIFJ	<i>ydbK</i>	2,20E-05	0,0001230122	-1,27	Sí
199	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	Q46920	QUEF	<i>queF</i>	2,26E-05	0,0001255762	-1,25	Sí
200	Aspartate aminotransferase	P00509	AAT	<i>aspC</i>	2,35E-05	0,0001302896	-1,06	Sí
201	Protein GrpE	Q8FEY9	GRPE	<i>grpE</i>	2,42E-05	0,0001328057	-1,68	Sí
202	Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN	P36979	RLMN	<i>rlmN</i>	2,42E-05	0,0001333909	1,03	Sí
203	Pyruvate kinase II	P21599	KPKYK2	<i>pykA</i>	2,48E-05	0,0001351992	-1,89	Sí
204	UPF0441 protein YgiB	P0ADT2	YGIB	<i>ygiB</i>	2,49E-05	0,0001353094	1,37	Sí
205	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2	P0ABJ1	CYOA	<i>cyoA</i>	2,53E-05	0,0001366897	1,99	Sí
206	Triosephosphate isomerase	P0A858	TPIS	<i>tpiA</i>	2,55E-05	0,0001370994	1,65	Sí
207	Xaa-Pro dipeptidase	P21165	PEPQ	<i>pepQ</i>	2,60E-05	0,0001390637	-1,08	Sí
208	Acetate kinase	P0A6A3	ACKA	<i>ackA</i>	2,66E-05	0,0001418275	-1,02	Sí
209	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	P0A6U5	RSMG	<i>rsmG</i>	2,80E-05	0,0001481752	-1,21	Sí
210	Oxygen-insensitive NADPH nitroreductase	P17117	NFSA	<i>nfsA</i>	2,82E-05	0,0001488513	-1,03	Sí
211	DNA gyrase subunit B	P0AES6	GYRB	<i>gyrB</i>	2,87E-05	0,0001506081	0,76	No
212	Transketolase I	P27302	TKT1	<i>tktA</i>	2,94E-05	0,0001536204	-0,79	No
213	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase	P0A8D6	YMDB	<i>ymdB</i>	3,22E-05	0,0001664876	-1,29	Sí
214	Type I restriction enzyme EcoKI M protein	P08957	T1MK	<i>hsdM</i>	3,21E-05	0,0001667967	1,05	Sí
215	High frequency lysogenization protein HflD	P25746	HFLD	<i>hflD</i>	3,32E-05	0,0001711691	1,19	Sí
216	Low specificity L-threonine aldolase	P75823	LTAE	<i>ltaE</i>	3,36E-05	0,0001725555	-1,15	Sí
217	Transaldolase	K0BE10	TAL	<i>tal</i>	3,41E-05	0,0001743167	-0,76	No
218	LPS-assembly lipoprotein LptE	P0ADC1	LPTE	<i>lptE</i>	3,46E-05	0,0001749179	1,60	Sí
219	DnaA initiator-associating protein DiaA	P66817	DIAA	<i>diaA</i>	3,45E-05	0,0001751874	1,30	Sí
220	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	P0AEB2	DACA	<i>dacA</i>	3,64E-05	0,0001831436	1,08	Sí
221	Galactitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component	P69828	PTKA	<i>gata</i>	3,72E-05	0,0001864475	1,53	Sí
222	DNA topoisomerase 4 subunit A	P0AF12	PARC	<i>parC</i>	4,01E-05	0,000200109	0,81	No
223	Modulator of FtsH protease HflK	P0ABC7	HFLK	<i>hflK</i>	4,12E-05	0,0002045843	1,37	Sí
224	PTS system mannitol-specific EIICBA component	P00550	PTM3C	<i>mtlA</i>	4,42E-05	0,0002187201	1,39	Sí
225	HTH-type transcriptional repressor FabR	P0ACU5	FABR	<i>fabR</i>	4,57E-05	0,000225162	1,36	Sí
226	UPF0304 protein YfbU	P0ASW8	YFBU	<i>yfbU</i>	4,71E-05	0,0002307392	-0,93	No
227	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	P0AB77	KBL	<i>kbl</i>	4,81E-05	0,0002346868	-1,00	Sí
228	Uncharacterized protease YdcP	P76104	YDCP	<i>ydcP</i>	4,84E-05	0,0002353919	1,08	Sí
229	Leucine-tRNA ligase	Q1RER9	SYL	<i>leuS</i>	4,87E-05	0,0002355321	-1,20	Sí
230	Aspartate-tRNA ligase	P21889	SYD	<i>aspS</i>	5,47E-05	0,0002634876	-0,57	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
231	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase C	P39406	RSMC	<i>rsmC</i>	5,59E-05	0,0002681874	0,76	No
232	Enolase	P0A6P9	ENO	<i>eno</i>	5,70E-05	0,0002720885	-0,65	No
233	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	P27306	STHA	<i>sthA</i>	5,74E-05	0,0002729438	-0,60	No
234	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	P0AGE9	SUCD	<i>sucD</i>	5,87E-05	0,000278015	-0,77	No
235	Uncharacterized protein YbiB	P30177	YBIB	<i>ybiB</i>	6,70E-05	0,0003156699	-1,20	Sí
236	UDP-N-acetylmuramate-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase	P37773	MPL	<i>mpl</i>	6,99E-05	0,0003280601	-0,79	No
237	Cytoskeleton protein RodZ	P27434	RODZ	<i>rodZ</i>	7,11E-05	0,0003323867	1,43	Sí
238	Queuine tRNA-ribosyltransferase	P0A847	TGT	<i>tgt</i>	7,16E-05	0,0003335352	-0,67	No
239	UPF0227 protein YcfP	B1HUF7	YCFP	<i>ycfP</i>	7,21E-05	0,0003342636	1,72	Sí
240	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	P0AF17	PDXH	<i>pdxH</i>	7,31E-05	0,0003375467	0,92	No
241	Protein YrdA	P0A9W9	YRDA	<i>yrdA</i>	7,43E-05	0,0003402588	-0,88	No
242	Protein DamX	Q8X826	DAMX	<i>damX</i>	7,41E-05	0,0003405518	1,37	Sí
243	D-methionine-binding lipoprotein MetQ	P28635	METQ	<i>metQ</i>	7,62E-05	0,0003476674	1,08	Sí
244	Peptidoglycan-associated lipoprotein	P0A912	PAL	<i>pal</i>	7,97E-05	0,0003618362	1,47	Sí
245	Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase	P32131	HEMN	<i>hemN</i>	8,34E-05	0,000372387	-0,75	No
246	Probable transcriptional regulatory protein YeeN	P0A8A2	YEEN	<i>yeeN</i>	8,38E-05	0,0003775697	1,60	Sí
247	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase	P77567	NHOA	<i>nhoA</i>	8,83E-05	0,0003958807	2,30	Sí
248	LexA repressor	P0A7C2	LEXA	<i>lexA</i>	8,99E-05	0,0004016352	1,41	Sí
249	Bifunctional (p)ppGpp synthase/hydrolase SpoT	P0AG24	SPOT	<i>spoT</i>	9,48E-05	0,000420555	0,97	No
250	Pyridoxine 5'-phosphate synthase	P0A794	PDXJ	<i>pdxJ</i>	9,56E-05	0,0004239035	-1,75	Sí
251	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	P62707	GPMA	<i>gpmA</i>	9,82E-05	0,0004337083	-0,95	No
252	Pyruvate formate-lyase 1-activating enzyme	P0A9N4	PFLA	<i>pflA</i>	0,000101486	0,0004462161	1,29	Sí
253	Probable phospholipid ABC transporter-binding protein MlaD	P64604	MLAD	<i>mldA</i>	0,0001051824	0,0004588273	1,45	Sí
254	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein HypB	P0AAN3	HYPB	<i>hypB</i>	0,0001047977	0,0004589561	1,19	Sí
255	Alpha-galactosidase	P06720	AGAL	<i>mclA</i>	0,0001083714	0,0004708843	-1,17	Sí
256	D-amino acid dehydrogenase small subunit	P0A6J5	DADA	<i>dadA</i>	0,000111658	0,0004832697	1,46	Sí
257	Outer membrane protein F	P02931	OMP	<i>ompF</i>	0,0001148883	0,0004933963	1,06	Sí
258	Probable quinol monooxygenase YgiN	P0ADU2	YGIN	<i>ygiN</i>	0,0001146099	0,0004941157	-1,28	Sí
259	Glutamate-cysteine ligase	P0A6W9	GSH1	<i>gshA</i>	0,0001158283	0,0004955124	-0,80	No
260	Succinylornithine transaminase	P77581	ASTC	<i>astC</i>	0,0001208588	0,0005150444	2,29	Sí
261	Probable phospholipid-binding protein MlaC	P0ADV7	MLAC	<i>mldC</i>	0,0001295711	0,0005479572	-1,29	Sí
262	Glutaredoxin-4	P0AC69	GLRX4	<i>grxL</i>	0,0001293956	0,0005493114	-1,05	Sí
263	Universal stress protein E	P0AAC0	USPE	<i>uspE</i>	0,0001357731	0,0005720021	-0,86	No
264	Serine-tRNA ligase	P0A8L1	SYS	<i>serS</i>	0,0001367027	0,000573737	-0,95	No
265	Tyrosine recombinase XerD	P0A8P8	XERD	<i>xerD</i>	0,0001392855	0,0005823709	1,68	Sí
266	Tyrosine-tRNA ligase	P0AGJ9	SY	<i>tyrS</i>	0,0001432022	0,0005920448	-0,92	No
267	Translation initiation factor IF-3	P0A707	IF3	<i>infC</i>	0,0001431388	0,0005939991	0,62	No
268	Glycerol dehydrogenase	P0A9S5	GLDA	<i>gldA</i>	0,0001430214	0,0005957432	2,07	Sí
269	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase B	P30863	DKGB	<i>dkgB</i>	0,0001496981	0,0006166005	-1,05	Sí
270	Sulfate adenyltransferase subunit 1	P23845	CYSN	<i>cysN</i>	0,0001558999	0,0006397671	0,97	No
271	Esterase FrsA	P04335	FRSA	<i>frsA</i>	0,0001598388	0,0006511082	-1,26	Sí
272	Citrate synthase	P0ABH7	CISY	<i>gltA</i>	0,0001595108	0,0006521698	-1,06	Sí
273	Protein HemY	P0ACB7	HEMY	<i>hemY</i>	0,0001619127	0,0006571403	1,40	Sí
274	60 kDa chaperonin	P0A6F5	CH60	<i>groL</i>	0,000167582	0,0006776674	0,92	No
275	Elongation factor Tu 2	P0CE48	EFTU2	<i>tufB</i>	0,0001726864	0,0006957694	-1,09	Sí
276	ATP-binding/permease protein CydD	P29018	CYDD	<i>cydD</i>	0,0001749234	0,0007022826	1,52	Sí
277	Aerobic respiration control protein ArcA	P0A9Q1	ARCA	<i>arcA</i>	0,000177776	0,0007111042	0,63	No
278	ATP-dependent RNA helicase DeaD	P0A9P6	DEAD	<i>deaD</i>	0,0001845207	0,0007354279	0,96	No
279	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, dihydroxyacetone-binding subunit DhaK	P76015	DHAK	<i>dhaK</i>	0,0001877215	0,0007455034	-0,79	No
280	Cell division protein ZapD	P36680	ZAPD	<i>zapD</i>	0,0001888898	0,0007474639	-0,89	No
281	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	P23830	PSS	<i>ppsA</i>	0,0001963827	0,000774349	0,62	No
282	Uncharacterized protein YbjD	P75828	YBJD	<i>ybjD</i>	0,00020917	0,0008160576	0,85	No
283	Acetylornithine/succinyl-diaminopimelate aminotransferase	P18335	ARGD	<i>argD</i>	0,0002078721	0,0008167459	-1,11	Sí
284	Protein CreA	P0AE91	CREA	<i>creA</i>	0,0002088666	0,0008177535	-1,20	Sí
285	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	P06959	ODP2	<i>aceF</i>	0,0002204192	0,0008569279	0,86	No
286	Catabolite repressor/activator	P0ACP1	CRA	<i>cra</i>	0,0002376996	0,000920878	1,02	Sí
287	Modulator of FtsH protease HfC	P0ABC3	HFLC	<i>hflC</i>	0,0002392202	0,00092354	0,96	No
288	Uncharacterized protein YcbX	P75863	YCBX	<i>ycbX</i>	0,0002514083	0,0009672236	-0,56	No
289	LOG family protein YgdH	P0ADR8	YGDH	<i>ygdH</i>	0,0002613156	0,0010018604	-0,92	No
290	Uncharacterized protein YhbW	P0ADV5	YHBW	<i>yhbW</i>	0,0002623047	0,0010021849	-1,07	Sí
291	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	P0A7J0	RIBB	<i>ribB</i>	0,0002695677	0,00102288	1,04	Sí
292	Transcriptional regulatory protein OmpR	P0AA16	OMPR	<i>ompR</i>	0,0002695078	0,0010261671	0,61	No
293	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	P38038	CYSJ	<i>cysJ</i>	0,0002978556	0,0011263618	1,35	Sí
294	30S ribosomal protein S3	P0A7V3	RS3	<i>rpsC</i>	0,0003140182	0,0011834428	0,73	No
295	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	P05055	PNP	<i>pnp</i>	0,0003335608	0,0012528318	0,63	No
296	Uncharacterized protein YgaM	P0ADQ7	YGAM	<i>ygaM</i>	0,0003571248	0,0013368048	1,62	Sí
297	UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	P17443	MURG	<i>murG</i>	0,0003746735	0,0013977718	1,30	Sí
298	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A	P75913	GHRA	<i>ghrA</i>	0,0003938565	0,001464406	-0,82	No
299	Probable L,D-transpeptidase YbiS	P0AAX8	YBIS	<i>ybiS</i>	0,0003976967	0,0014737389	-1,15	Sí
300	Adenosine deaminase	P22333	ADD	<i>add</i>	0,0004005851	0,0014794944	0,86	No
301	Formate acetyltransferase 1	P09373	PFLB	<i>pflB</i>	0,0004046661	0,0014846689	0,82	No
302	Phage shock protein C	P0AFN2	PSPC	<i>pspC</i>	0,0004034079	0,0014849699	1,61	Sí
303	Lactaldehyde dehydrogenase	P25553	ALDA	<i>aldA</i>	0,0004407332	0,001616682	1,24	Sí
304	ATP-dependent protease subunit HslV	P0A7B8	HSLV	<i>hslV</i>	0,0004475882	0,0016313413	-0,69	No
305	Valine-tRNA ligase	P07118	SYV	<i>valS</i>	0,0004748083	0,0017248772	-0,53	No
306	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	P0AFC7	NUOB	<i>nuoB</i>	0,0004906198	0,001764957	1,60	Sí
307	30S ribosomal protein S2	P0A7V0	RS2	<i>rpsB</i>	0,0004890918	0,0017651913	0,48	No
308	Glutaredoxin-3	P0AC62	GLRX3	<i>grxC</i>	0,0004885459	0,0017689831	-0,58	No
309	HTH-type transcriptional regulator TreR	P36673	TREB	<i>treR</i>	0,000511148	0,0018328542	0,95	No
310	50S ribosomal protein L7/L12	P0A7K2	RL7	<i>rplL</i>	0,0005249723	0,0018763527	0,67	No



Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
311	Transcriptional regulator NanR	P0A8W0	NANR	<i>nanR</i>	0,0005386158	0,001918927	1,77	Sí
312	Aerobic respiration control sensor protein ArcB	P0AEC3	ARCB	<i>arcB</i>	0,000567408	0,002008588	1,02	Sí
313	30S ribosomal protein S1	P0AC67	RS1	<i>rpsA</i>	0,0005664424	0,0020115969	-0,88	No
314	DNA mismatch repair protein MutS	P23909	MUTS	<i>mutS</i>	0,0005766613	0,002034843	0,58	No
315	Lysine-sensitive aspartokinase 3	P08660	AK3	<i>lysC</i>	0,000591789	0,0020815943	-0,63	No
316	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P0AC53	G6PD	<i>zuf</i>	0,0005997727	0,0021030004	-0,66	No
317	NAD(P)H-flavin reductase	P0AEN1	FRE	<i>fre</i>	0,0006476134	0,0022635823	-0,84	No
318	DNA mismatch repair protein MutL	P23367	MUTL	<i>mutL</i>	0,00065639572	0,0022890207	0,79	No
319	2-octaprenylphenol hydroxylase	P25535	UBII	<i>ubil</i>	0,0006793888	0,0023597581	1,34	Sí
320	Peptidyl-tRNA hydrolase	P0A7D1	PTH	<i>pth</i>	0,0007094233	0,002456378	-0,74	No
321	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	P0A9M2	HPRT	<i>hpt</i>	0,0007128746	0,0024606389	-0,77	No
322	Major outer membrane lipoprotein Lpp	P69776	LPP	<i>lpp</i>	0,0007242039	0,002491981	1,26	Sí
323	Uncharacterized protein YgaU	P0ADE6	YGAU	<i>ygaU</i>	0,0007478791	0,0025654802	1,25	Sí
324	Transcriptional regulatory protein TyrR	P07604	TYRR	<i>tyrR</i>	0,0007824509	0,0026675557	0,77	No
325	Uncharacterized protein YghW	P64574	YGHW	<i>yghW</i>	0,0007810534	0,0026710097	0,97	No
326	Regulator of ribonuclease activity B	P0AF90	RRAB	<i>rraB</i>	0,0008025864	0,0027278089	1,28	Sí
327	Selenide, water dikinase	P16456	SELD	<i>selD</i>	0,0008228949	0,00278828	0,53	No
328	Rare lipoprotein A	P10100	RLPA	<i>rlpA</i>	0,0008930655	0,0030168188	1,83	Sí
329	Chromosome partition protein MukF	P60293	MUKF	<i>mukF</i>	0,0009023995	0,003039084	0,92	No
330	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY	P0CSJ6	GATY	<i>gatY</i>	0,0009173313	0,0030800092	0,67	No
331	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC	P63883	AMIC	<i>amiC</i>	0,0009528446	0,0031895825	-0,71	No
332	Protein YgiW	P0ADU5	YGIW	<i>ygiW</i>	0,0009636056	0,0032062313	-1,21	Sí
333	7-carboxy-7-deazaguanine synthase	P64554	QUEE	<i>queE</i>	0,0009616794	0,0032094602	-0,56	No
334	Cell division protein FtsN	P29131	FTSN	<i>ftsN</i>	0,0009772793	0,0032419926	1,57	Sí
335	Poly(A) polymerase I	P0ABF1	PCNB	<i>pcnB</i>	0,0011064356	0,0036594946	0,73	No
336	Helicase IV	P15038	HELD	<i>helD</i>	0,0011204262	0,0036837751	0,91	No
337	Serine acetyltransferase	P0A9D4	CYSE	<i>cysE</i>	0,0011177475	0,0036859055	-1,69	Sí
338	Bifunctional protein Folds	P24186	FOLD	<i>folD</i>	0,0011532578	0,0037805019	-1,09	Sí
339	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	P30011	NADC	<i>nadC</i>	0,0011598974	0,0037910511	1,01	Sí
340	Glucose-6-phosphate isomerase	P0A6T1	G6PI	<i>pgi</i>	0,0011645731	0,0037951381	-0,58	No
341	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase C	P0AA39	RLUC	<i>riuC</i>	0,0012054298	0,003916763	0,57	No
342	Probable acetyl-CoA acetyltransferase	Q46939	YQEF	<i>yqeF</i>	0,0012346305	0,003999914	0,99	No
343	30S ribosomal protein S10	P0A7R5	RS10	<i>rpsJ</i>	0,0012662832	0,0040905009	-0,57	No
344	Uncharacterized protein YbaE	P46890	YBAE	<i>ybaE</i>	0,0012801746	0,0041233531	0,80	No
345	30S ribosomal protein S7	P02359	RS7	<i>rpsG</i>	0,0013213016	0,0042434846	0,54	No
346	Thioredoxin-1	P0AA25	THIO	<i>trxA</i>	0,0013807042	0,0044087038	-0,76	No
347	Exu regulon transcriptional regulator	P0ACL2	EXUR	<i>exuR</i>	0,0013770205	0,0044096494	-0,55	No
348	Translation initiation factor IF-2	P0A705	IF2	<i>infB</i>	0,0014290988	0,0045501191	0,53	No
349	Chaperone protein HtpG	P0A6Z3	HTPG	<i>htpG</i>	0,001471126	0,004670509	-0,65	No
350	30S ribosomal protein S19	P0A7U3	RS19	<i>rpsS</i>	0,0014992629	0,0047462381	0,87	No
351	D-erythro-7,8-dihydroneopterin triphosphate epimerase	P0AC19	FOLX	<i>folX</i>	0,0015058701	0,0047535728	-1,05	Sí
352	Histidine-tRNA ligase	P69096	SYH	<i>hisS</i>	0,0016687615	0,0052528061	-0,69	No
353	Pyruvate dehydrogenase E1 component	P0AFG8	ODP1	<i>aceE</i>	0,0016897245	0,0053037246	-0,71	No
354	Aminopeptidase N	P04825	AMPN	<i>pepN</i>	0,0017307791	0,0054172407	-0,63	No
355	Flavodoxin-1	P61949	FLAV	<i>fldA</i>	0,0017518935	0,0054678816	-0,84	No
356	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	P77737	OPPF	<i>oppF</i>	0,0017580676	0,0054717384	1,35	Sí
357	Cysteine desulfurase IscS	P0A6B7	ISCS	<i>iscS</i>	0,0019185792	0,005954582	-0,55	No
358	HTH-type transcriptional regulator GalR	P03024	GALR	<i>galR</i>	0,00193588	0,0059914945	-0,68	No
359	USG-1 protein	P08390	USG	<i>usg</i>	0,0019449364	0,0060027562	0,97	No
360	Riboflavin synthase	P0AFU8	RISA	<i>ribC</i>	0,0021099104	0,0064938353	-0,67	No
361	ADP-heptose-LPS heptosyltransferase 2	P37692	RFAF	<i>rfaF</i>	0,002213048	0,0067924023	0,66	No
362	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyl-adenosine synthase	P0AE11	MIAB	<i>miaB</i>	0,0022548319	0,0069015297	0,67	No
363	Outer membrane protein TolC	P02930	TOLC	<i>tolC</i>	0,0022773278	0,0069320858	0,94	No
364	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	P0AED7	DAPE	<i>dapE</i>	0,0022769682	0,0069500847	-0,78	No
365	Uncharacterized protein YjiU	P39407	YJIU	<i>yjiU</i>	0,0024160638	0,007334243	1,10	Sí
366	Hydrogenase-2 small chain	P69741	MBHT	<i>hybO</i>	0,0024410405	0,0073898166	1,04	Sí
367	Putative membrane protein IgaA homolog	P45800	IGAA	<i>yrfF</i>	0,0025795403	0,0077878218	1,06	Sí
368	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	P0A9H7	CFA	<i>cfa</i>	0,0026440793	0,007960978	0,70	No
369	Phosphodiesterase YfcE	P67095	YFCE	<i>yfcE</i>	0,0030213898	0,0090723574	-1,17	Sí
370	30S ribosomal protein S13	P0A7S9	RS13	<i>rpsM</i>	0,0031816395	0,0095277206	0,80	No
371	Excinuclease cho	P76213	CHO	<i>cho</i>	0,0032059471	0,0095746345	0,94	No
372	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	P28903	NRDD	<i>nrdD</i>	0,003225264	0,0095806769	-0,65	No
373	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit alpha	P00452	RIR1	<i>nrdA</i>	0,003236717	0,0095889906	-0,78	No
374	Peptidase T	P29745	PEPT	<i>pepT</i>	0,0032245439	0,0096042866	0,74	No
375	Uncharacterized chaperone protein YegD	P36928	YEGD	<i>yegD</i>	0,0032880161	0,0097149915	0,96	No
376	Phosphoglucomutase	P36938	PGM	<i>pgm</i>	0,0032976691	0,0097175995	1,73	Sí
377	Uncharacterized protein YobB	P76280	YOB B	<i>yobB</i>	0,0035114419	0,0103200998	1,05	Sí
378	DNA protection during starvation protein	P0ABT2	DPS	<i>dps</i>	0,0036890803	0,0108134947	-1,31	Sí
379	Outer membrane protein assembly factor BamB	P77774	BAMB	<i>bamB</i>	0,0039213426	0,0114639779	0,87	No
380	Phosphoserine aminotransferase	P23721	SERC	<i>serC</i>	0,0039431893	0,0114975099	-0,85	No
381	Uncharacterized protein YbgK	P75745	YBGK	<i>ybgK</i>	0,0039737814	0,0115260465	-0,84	No
382	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	P0A996	GLPC	<i>glpC</i>	0,0039679125	0,0115392311	0,76	No
383	Tryptophan-tRNA ligase	P00954	SYW	<i>trpS</i>	0,0039896934	0,011541985	-0,83	No
384	Probable 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase ArnD	P76472	ARND	<i>arnD</i>	0,0040295325	0,0116268803	1,25	Sí
385	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	P0A9H1	MUG	<i>mug</i>	0,0041044404	0,0118122598	-0,71	No
386	DNA-binding protein Fis	P0A6R3	FIS	<i>fis</i>	0,0041639593	0,0119216199	1,41	Sí
387	Ferric uptake regulation protein	P0A9A9	FUR	<i>fur</i>	0,0041552385	0,0119274721	1,25	Sí
388	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	P0AC41	SDHA	<i>sdhA</i>	0,0042448419	0,0121218681	0,59	No
389	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	P37666	GHRB	<i>ghrB</i>	0,0044507083	0,0126770818	-0,87	No
390	Putative GTP cyclohydrolase 1 type 2	P0A9FP	GTFC1	<i>ybgI</i>	0,0044916967	0,0127610254	-1,28	Sí

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
391	Cell division protein FtsX	P0AC30	FTSX	<i>ftsX</i>	0,0045643389	0,0129342393	1,10	Sí
392	Dihydrolipoyl dehydrogenase	P0A9P0	DLDH	<i>lpdA</i>	0,0045970604	0,0129937319	0,48	No
393	Uncharacterized protein YbjX	P75829	YBJX	<i>ybjX</i>	0,0046967186	0,0132416392	1,26	Sí
394	Universal stress protein G	P39177	USPG	<i>uspG</i>	0,004716423	0,0132634433	0,41	No
395	UPF0042 nucleotide-binding protein YhbJ	P0A894	YHBJ	<i>yhbJ</i>	0,0047477488	0,0133177358	-0,68	No
396	Peptide chain release factor 2	P07012	RF2	<i>prfB</i>	0,0048001973	0,0134308551	-1,41	Sí
397	UPF0597 protein YhaM	P42626	YHAM	<i>yhaM</i>	0,0048956213	0,0136633462	0,66	No
398	Inosine-guanosine kinase	P0AEW6	INGK	<i>gsk</i>	0,0049500513	0,0137460073	-0,67	No
399	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	P33643	RLUD	<i>rtuD</i>	0,0049625377	0,0137462294	-1,01	Sí
400	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	P05523	FPG	<i>mutM</i>	0,00494139	0,0137564324	0,64	No
401	Hydrogenase-1 small chain	P69739	MBHS	<i>hyaA</i>	0,004997546	0,0137743308	1,08	Sí
402	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	P75728	UBIF	<i>ubiF</i>	0,0049974007	0,0138082794	1,75	Sí
403	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	P0A6U3	MNMG	<i>mnmG</i>	0,0050332212	0,013838236	-0,42	No
404	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	P06968	DUT	<i>dut</i>	0,0051836226	0,0142164699	-1,00	Sí
405	Na(+)/H(+) antiporter NhaB	P0AFA7	NHAB	<i>nhaB</i>	0,0053741713	0,014702671	1,30	Sí
406	NADH-quinone oxidoreductase subunit G	P33602	NUOG	<i>nuoG</i>	0,0054657692	0,0148433143	0,49	No
407	Phosphoethanolamine transferase EptA	P30845	EPTA	<i>eptA</i>	0,0054566716	0,0148550176	1,34	Sí
408	Glycine-tRNA ligase beta subunit	P00961	SYGB	<i>glyS</i>	0,005447349	0,0148661642	-0,58	No
409	Cyclic di-GMP-binding protein	P37652	BCSB	<i>bcsB</i>	0,0055038929	0,0149103015	0,91	No
410	Probable ATP-dependent helicase DinG	P27296	DING	<i>dinG</i>	0,005735269	0,0154615039	1,23	Sí
411	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	P0A9Q9	DHAS	<i>asd</i>	0,0057289036	0,0154820127	-1,14	Sí
412	Uncharacterized lipoprotein YdeL	P64451	YDCL	<i>ydeL</i>	0,0057839012	0,0155547634	1,62	Sí
413	Periplasmic serine endoprotease DegP	P0C0V0	DEGP	<i>degP</i>	0,0058826608	0,0157820537	0,63	No
414	Probable ATP-dependent transporter SufC	P77499	SUFC	<i>sufC</i>	0,0059175282	0,0158372494	0,82	No
415	Glycine-tRNA ligase alpha subunit	P00960	SYGA	<i>glyQ</i>	0,0060079722	0,0160405618	-0,99	No
416	Protein translocase subunit SecF	P0AG93	SECF	<i>secF</i>	0,0060873	0,0162132895	1,30	Sí
417	Protein YeeZ	P0AD12	YEEZ	<i>yeeZ</i>	0,0062127227	0,016507666	-0,98	No
418	ATP synthase subunit alpha	P0ABB0	ATPA	<i>atpA</i>	0,0062865712	0,0166639256	-0,47	No
419	Pyrrrole-5-carboxylate reductase	P0A9L8	P5CR	<i>proC</i>	0,0063236817	0,0167222897	-0,97	No
420	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	P0ACD4	ISCU	<i>iscU</i>	0,0063439164	0,0167358556	-0,98	No
421	GTP cyclohydrolase 1	P0A6T5	GCHI	<i>folE</i>	0,0064994377	0,0171054086	-0,61	No
422	Isoleucine-tRNA ligase	P00956	SYI	<i>ileS</i>	0,0067399882	0,0176964618	-1,25	Sí
423	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase 1	P37744	RMLA1	<i>rmlA1</i>	0,0069811748	0,0182863871	-1,31	Sí
424	Probable phosphatase YcdX	P75914	YCDX	<i>ycdX</i>	0,0071819756	0,0187679928	-0,92	No
425	Uncharacterized protein YhhK	P37613	YHHK	<i>yhhK</i>	0,0072396728	0,0188299472	-0,75	No
426	Methionine import ATP-binding protein MetN	P30750	METN	<i>metN</i>	0,0072277687	0,0188432181	1,04	Sí
427	Putative acid-amine ligase YgiC	P0ADT5	YGIC	<i>ygiC</i>	0,0073454526	0,0190603313	-0,83	No
428	Protein TolB	P0A855	TOLB	<i>tolB</i>	0,007368615	0,0190757602	0,41	No
429	Phosphoenolpyruvate carboxylase	P00864	CAPP	<i>ppc</i>	0,0074115881	0,0191422836	-0,36	No
430	Xanthine dehydrogenase FAD-binding subunit	Q46800	XDHB	<i>xdhB</i>	0,0074726165	0,019255201	0,66	No
431	Thymidine phosphorylase	Q8XB35	TYPH	<i>deoA</i>	0,0075383906	0,0193794358	-0,58	No
432	Gamma-glutamylcyclotransferase family protein YtfP	P0AE48	YTFP	<i>ytfP</i>	0,0075858229	0,0194562309	-1,13	Sí
433	tRNA modification GTPase MnmE	P25522	MNME	<i>mnmE</i>	0,0076719098	0,0196315844	1,14	Sí
434	Nitrogen regulation protein NR(II)	P0AFB5	NTRB	<i>glnL</i>	0,0077326409	0,0197413965	1,16	Sí
435	Probable diguanylate cyclase YeaP	P76245	YEAP	<i>yeaP</i>	0,0078680433	0,0200409011	0,80	No
436	Signal peptidase I	P00803	LEP	<i>lepB</i>	0,0079341705	0,0201629836	0,74	No
437	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, ADP-binding subunit DhaL	P76014	DHAL	<i>dhaL</i>	0,008040499	0,0203864368	0,58	No
438	Lipoate-protein ligase A	B1I533	LPAL	<i>lplA</i>	0,0084614805	0,0214048411	0,62	No
439	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	P08244	PYRF	<i>pyrF</i>	0,0087181478	0,0219538812	-0,84	No
440	Xanthine phosphoribosyltransferase	P0A9M5	XGPT	<i>gpt</i>	0,0087008369	0,0219601988	-1,09	Sí
441	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YheS	P63389	YHES	<i>yheS</i>	0,008803544	0,0221186548	0,53	No
442	Phosphoenolpyruvate synthase	P23538	PPSA	<i>ppsA</i>	0,0088340982	0,0221452054	0,71	No
443	UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase	P21645	LXPD	<i>lpxD</i>	0,0090530879	0,0226429376	0,41	No
444	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	P0A836	SUCC	<i>sucC</i>	0,0090951288	0,0226968259	-0,44	No
445	30S ribosomal protein S11	P0A7R9	RS11	<i>rpsK</i>	0,0094976059	0,0235949491	0,71	No
446	UPF0070 protein YfgM	P76576	YFGM	<i>yfgM</i>	0,0094960923	0,0236442027	1,04	Sí
447	GTP pyrophosphokinase	P0AG20	RELA	<i>relA</i>	0,0095397638	0,0236466269	0,38	No
448	Uracil phosphoribosyltransferase	P0A8F0	UPP	<i>upp</i>	0,0096631657	0,0238990794	-0,53	No
449	Chaperone protein DnaK	P0A6Y8	DNAK	<i>dnaK</i>	0,0098513034	0,0242560981	-0,60	No
450	tRNA dimethylallyltransferase	P16384	MIAA	<i>miaA</i>	0,0098316365	0,0242615886	-0,51	No
451	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	P67087	RSMI	<i>rsmI</i>	0,0100628519	0,0247220398	0,71	No
452	Putative peroxiredoxin bcp	P0AE52	BCP	<i>bcp</i>	0,0101198884	0,0247523981	-0,90	No
453	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase I	P75876	RLMI	<i>rtmI</i>	0,0101146149	0,0247942329	-0,50	No
454	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	P19624	PDXA	<i>pdxA</i>	0,0102853837	0,0251017734	1,07	Sí
455	Protein YhgF	P46837	YHGF	<i>yhgF</i>	0,0104559169	0,0254618812	0,38	No
456	Fumarate reductase flavoprotein subunit	P00363	FRDA	<i>frdA</i>	0,0106036795	0,0257650808	0,81	No
457	Outer membrane lipoprotein RcsF	P69411	RCSF	<i>rcsF</i>	0,0107150451	0,0258655119	-1,33	Sí
458	Uncharacterized protein YcjX	P76046	YCJX	<i>yjcX</i>	0,0106772301	0,0258870262	0,78	No
459	Signal recognition particle receptor FtsY	P10121	FTSY	<i>ftsY</i>	0,0107043166	0,0258960324	0,45	No
460	HTH-type transcriptional repressor PurR	P0ACP7	PURR	<i>purR</i>	0,0112443294	0,0270841673	-0,49	No
461	Protein mrp	P0AF08	MRP	<i>mrp</i>	0,0113930957	0,0273829719	-0,78	No
462	Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A	P0AA43	RSUA	<i>rsuA</i>	0,0114446218	0,0274472749	1,32	Sí
463	HTH-type transcriptional regulator RutR	P0ACU2	RUTR	<i>rutR</i>	0,0115391521	0,0276142128	-1,37	Sí
464	High-affinity gluconate transporter	P39835	GNIT	<i>gntT</i>	0,0115843658	0,0276626665	1,17	Sí
465	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase partner protein	P0AG03	UBIX	<i>ubiX</i>	0,0123787318	0,029495989	0,78	No
466	Trk system potassium uptake protein TrkA	P0AGI8	TRKA	<i>trkA</i>	0,0124950513	0,0297092636	0,73	No
467	ATP-dependent RNA helicase SrmB	P21507	SRMB	<i>srmB</i>	0,0128600559	0,030446457	0,37	No
468	DNA ligase	P15042	DNLJ	<i>ligA</i>	0,0128994313	0,0304745626	1,23	Sí
469	Exopolyphosphatase	P0AFL6	PPX	<i>ppx</i>	0,012845209	0,0304764274	-0,48	No
470	Bifunctional protein FolC	P08192	FOLC	<i>folC</i>	0,0130579925	0,0307835229	-0,51	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
471	Lon protease	P0A9M0	LON	<i>lon</i>	0,0130904472	0,0307945126	0,67	No
472	DNA polymerase III subunit tau	P06710	DPO3X	<i>dnaX</i>	0,0131668237	0,0309085608	0,69	No
473	Ornithine carbamoyltransferase chain I	P04391	OTC1	<i>argI</i>	0,013336277	0,0312401584	-0,85	No
474	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	P0AB80	ILVE	<i>iloE</i>	0,0134901671	0,0314675899	-0,63	No
475	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	P0A6S7	GPDA	<i>gpsA</i>	0,0134643042	0,0314735212	-0,43	No
476	Glycogen synthase	P0A6U8	GLGA	<i>glgA</i>	0,0140978243	0,032815944	0,44	No
477	UPF0092 membrane protein YajC	P0ADZ7	YAJC	<i>yajC</i>	0,0143553514	0,0332755844	1,92	Sí
478	Selenocysteine-specific elongation factor	P14081	SELB	<i>selB</i>	0,0143340713	0,033295914	0,44	No
479	Outer membrane lipoprotein SlyB	P0A905	SLYB	<i>slyB</i>	0,0146116187	0,0337989008	1,12	Sí
480	tRNA pseudouridine synthase D	Q57261	TRUD	<i>truD</i>	0,014732686	0,0340079503	-0,52	No
481	Acetolactate synthase isozyme 2 large subunit	P00892	ILVG	<i>iloG</i>	0,0149398572	0,0344144734	0,45	No
482	Glycine cleavage system transcriptional activator	P0A9F6	GCVA	<i>gcvA</i>	0,0150167201	0,0345197633	0,69	No
483	Nitrate/nitrite response regulator protein NarL	P0AF28	NARL	<i>narL</i>	0,0151683192	0,0347960614	0,50	No
484	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC	P0ABQ0	COABC	<i>coaBC</i>	0,0159003377	0,0363999467	-0,57	No
485	Glutamate-pyruvate aminotransferase AlaA	P0A959	ALAA	<i>alaA</i>	0,015961454	0,0364645176	0,47	No
486	Exoribonuclease 2	B1ITG7	RNB	<i>rnb</i>	0,0166159586	0,0378816505	0,39	No
487	Cold shock-like protein CspC	P0A9Y6	CSPC	<i>cspC</i>	0,0172492702	0,0392447463	-0,79	No
488	Phosphogluconate dehydratase	P0ADF6	EDD	<i>edd</i>	0,0173023843	0,0392849216	-0,54	No
489	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	P0COR7	RLME	<i>rlmE</i>	0,0173611241	0,0393376799	1,21	Sí
490	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	P30870	GLNE	<i>glnE</i>	0,0174298116	0,0394127168	-0,42	No
491	Methylated-DNA protein-cysteine methyltransferase	P0AFH0	OGT	<i>ogt</i>	0,0179401687	0,0404018433	0,83	No
492	Ribonuclease T	P30014	RNT	<i>rnt</i>	0,0179150206	0,0404273786	1,69	Sí
493	RNA-binding protein Hfq	P0A6X3	HFQ	<i>hfq</i>	0,0184744606	0,0415206944	0,46	No
494	UPF0234 protein YajQ	P0A8E7	YAJQ	<i>yajQ</i>	0,0191090069	0,0427732923	-0,56	No
495	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxyl-lyase	P0AAB4	UBID	<i>ubiD</i>	0,0190953689	0,0428292889	0,44	No
496	PTS system glucose-specific EIICB component	P69786	PTGCB	<i>ptsG</i>	0,0192289444	0,0429549807	1,43	Sí
497	Cell division protein ZipA	P71773	ZIPA	<i>zipA</i>	0,0193909361	0,0432296295	0,94	No
498	6-phosphofructokinase isozyme 1	P0A796	K6PF1	<i>pfkA</i>	0,0197649254	0,0439749745	-0,85	No
499	Protein translocase subunit SecY	P0AGA2	SECY	<i>secY</i>	0,0200355861	0,0443102384	1,00	Sí
500	Transcription termination factor Rho	P0AG30	RHO	<i>rho</i>	0,0200141761	0,0443514141	-0,51	No
501	Uncharacterized symporter YdjN	P77529	YDJN	<i>ydjN</i>	0,0199801964	0,0443648448	0,79	No
502	Cob(II)irinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	P0A9H5	BTUR	<i>btuR</i>	0,0202816349	0,0447650428	-0,77	No
503	Glutamine-tRNA ligase	P00962	SYQ	<i>glnS</i>	0,020483873	0,0451215333	-0,44	No
504	DNA-binding protein HU-beta	P0ACF4	DBHB	<i>hupB</i>	0,0208021916	0,0453717093	0,77	No
505	Penicillin-binding protein activator LpoB	P0AB38	LPOB	<i>lpoB</i>	0,0207768026	0,0454057145	0,72	No
506	Multiphosphoryl transfer protein	P69811	PTFAH	<i>fruB</i>	0,0207543443	0,0454462716	0,92	No
507	Chaperone protein HscA	P0A6Z1	HSCA	<i>hscA</i>	0,020695529	0,0454973138	-0,44	No
508	5-methylcytosine-specific restriction enzyme B	P15005	MCRB	<i>mcrB</i>	0,0207385349	0,0455015775	0,95	No
509	Chromosome partition protein MukE	P25224	MUKE	<i>mukE</i>	0,0212615558	0,0462825222	1,51	Sí
510	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A	P0A9C0	GLPA	<i>glpA</i>	0,0215909769	0,0469074558	0,38	No
511	Glutamate 5-kinase	P0A7B5	PROB	<i>proB</i>	0,021792825	0,0472533269	-0,52	No
512	Response regulator UvrY	P0AED5	UVRY	<i>uvrY</i>	0,0220899798	0,047804097	0,42	No
513	Uncharacterized Nudix hydrolase NudL	P43337	NUDL	<i>nudL</i>	0,0221570448	0,0478557614	1,32	Sí
514	FKBP-type 16 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P0AEM0	FKBX	<i>fkpB</i>	0,0224040393	0,0482950887	0,88	No
515	Acyl carrier protein	P0A6A8	ACP	<i>acpP</i>	0,0225255727	0,0484627855	-1,09	Sí
516	N-acetylglucosamine repressor	P0AF20	NAGC	<i>nagC</i>	0,0228344808	0,0489373399	-0,28	No
517	Uncharacterized protein YjiM	P39384	YJIM	<i>yjiM</i>	0,0227947209	0,0489468039	0,88	No
518	Inositol-1-monophosphatase	P0ADG4	SUHB	<i>suhB</i>	0,0230796487	0,0493672795	-0,40	No
519	Beta-lactamase TEM	P62593	BLAT	<i>bla</i>	0,0231408618	0,0494028419	-0,37	No
520	Uncharacterized protein YeaO	P76243	YEAO	<i>yeaO</i>	0,0233358291	0,0497232666	-1,33	Sí
521	23S rRNA (guanine(745)-N(1))-methyltransferase	P36999	RLMA	<i>rlmA</i>	0,0237152755	0,0504347893	-0,76	No
522	Replicative DNA helicase	P0ACB0	DNAB	<i>dnaB</i>	0,0238791795	0,0506860745	0,59	No
523	Sulfur acceptor protein CsdE	P0AGF2	CSDI	<i>csdE</i>	0,0251165363	0,0531090119	0,43	No
524	Protein YdgH	P76177	YDGH	<i>ydgH</i>	0,0250893297	0,0531529202	-0,53	No
525	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	P17169	GLMS	<i>glms</i>	0,0253681394	0,053388541	-0,70	No
526	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E	P0AGL7	RSME	<i>rsmE</i>	0,0256673476	0,05386254	-0,53	No
527	Glucitol/sorbitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component	P05706	PTHA	<i>srIB</i>	0,0256290777	0,0538842848	0,65	No
528	HTH-type transcriptional regulator AcrR	P0AC59	ACRR	<i>acrR</i>	0,0257670698	0,0539695904	1,25	No
529	Glutamate synthase [NADPH] large chain	P09831	GLTB	<i>gltB</i>	0,0256279982	0,0539844524	-0,74	No
530	UDP-Gal:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-galactosyltransferase	Q03084	WBBD	<i>wbbD</i>	0,0259630181	0,0541751866	1,26	No
531	N-methyl-L-tryptophan oxidase	P40874	MTOX	<i>solA</i>	0,0259520678	0,0542545116	-0,54	No
532	HTH-type transcriptional repressor AllR	P0ACN4	ALLR	<i>allR</i>	0,027240787	0,0567345714	-0,54	No
533	50S ribosomal protein L31	P0A7M9	RL31	<i>rpmE</i>	0,027391677	0,0569417975	0,50	No
534	Aminodeoxychorismate synthase component 2	P00903	PABA	<i>pabA</i>	0,0284398974	0,0590101242	0,49	No
535	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	P60664	HIS6	<i>hisF</i>	0,0285701624	0,0591696074	0,55	No
536	Protein YdcF	P34209	YDCF	<i>ydcF</i>	0,0286861059	0,0592988906	0,80	No
537	Molybdopterin-synthase adenylyltransferase	P12282	MOEB	<i>moeB</i>	0,0290894969	0,0600207868	-1,01	No
538	Diaminopimelate epimerase	P0A6K1	DAPF	<i>dapF</i>	0,0292336091	0,0602060201	1,05	No
539	Exodeoxyribonuclease I	P04995	EXI	<i>sbcB</i>	0,0295617636	0,0606563593	-1,04	No
540	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	P00968	CARB	<i>carB</i>	0,0295556699	0,0607563677	-0,34	No
541	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB	P0A812	RUVB	<i>ruvB</i>	0,0308160202	0,0631130321	0,63	No
542	Putative gluconeogenesis factor	P75767	GNGF	<i>gngK</i>	0,0309773596	0,0633264103	0,99	No
543	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD	P0A9K9	SLYD	<i>slyD</i>	0,0310669104	0,063392517	1,60	No
544	Lysine-tRNA ligase, heat inducible	P0A8N5	SYK2	<i>lysU</i>	0,0314747543	0,0641066686	-0,54	No
545	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	P08142	ILVB	<i>iloB</i>	0,0316835429	0,0644135147	-0,65	No
546	UvrABC system protein C	P0A8G0	UVRC	<i>uvrC</i>	0,0322959237	0,065538248	0,69	No
547	Glutathione S-transferase GstA	P0A9D2	GSTA	<i>gstA</i>	0,0326529241	0,066141572	-0,49	No
548	DNA polymerase III subunit delta	P28630	HOLA	<i>holA</i>	0,033282189	0,067293185	0,59	No
549	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH]	P42593	FADH	<i>fadH</i>	0,0336120195	0,0678362798	-0,60	No
550	Glucosamine-6-phosphate deaminase	P0A759	NAGB	<i>nagB</i>	0,0350829195	0,0706761361	-1,12	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
551	Peroxiredoxin OsmC	P0C0L2	OSMC	<i>osmC</i>	0.0358211206	0.0720323078	-0.44	No
552	Arginine transport ATP-binding protein ArtP	P0AAF6	ARTP	<i>artP</i>	0.0361768514	0.0724845412	1.04	No
553	Thioredoxin-2	P0AGG4	THIO2	<i>trxC</i>	0.0361680102	0.0725981075	-0.78	No
554	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	P0A7A7	PLSB	<i>plsB</i>	0.0369718384	0.0739436769	0.79	No
555	30S ribosomal protein S15	P0ADZ4	RS15	<i>rpsO</i>	0.038052474	0.0759678219	0.58	No
556	Putative Lon protease homolog	P75867	LONH	<i>ychZ</i>	0.0387406817	0.0772026534	1.26	No
557	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	P07762	GLGB	<i>glgB</i>	0.0388467121	0.0772749677	0.45	No
558	50S ribosomal protein L6	P0AG55	RL6	<i>rplF</i>	0.0397044741	0.0788397084	0.37	No
559	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase YbaK	P0AAR3	YBAK	<i>ybaK</i>	0.0404873635	0.0802504451	0.80	No
560	Arabinose 5-phosphate isomerase KdsD	P45395	KDSD	<i>kdsD</i>	0.0407073472	0.0805423941	-0.64	No
561	Single-stranded DNA-binding protein	P0AGE0	SSB	<i>ssb</i>	0.0408809479	0.080741694	0.44	No
562	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YbcM	P77634	YBCM	<i>ybcM</i>	0.0421324498	0.0830653992	0.45	No
563	HTH-type transcriptional regulator GalS	P25748	GALS	<i>galS</i>	0.0426612314	0.0839585159	-0.46	No
564	ATP synthase subunit delta	P0ABA4	ATPD	<i>atpH</i>	0.0429405251	0.0843583366	0.53	No
565	50S ribosomal protein L3	P60438	RL3	<i>rplC</i>	0.0432829843	0.084581211	0.57	No
566	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	P0AEP3	GALU	<i>galU</i>	0.0431325223	0.0845855481	-0.68	No
567	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	P0ACQ4	OXYR	<i>oxyR</i>	0.0432214419	0.0846101726	-0.37	No
568	Lipoyl synthase	P60716	LIPA	<i>lipA</i>	0.0454838734	0.0885696516	0.32	No
569	Asparagine synthetase B [glutamine-hydrolyzing]	P22106	ASNB	<i>asnB</i>	0.0454770219	0.0887122188	-0.64	No
570	30S ribosomal protein S5	P0A7W1	RS5	<i>rpsE</i>	0.045651631	0.0887403634	1.00	No
571	Farnesyl diphosphate synthase	P22939	ISPA	<i>ispA</i>	0.0459146856	0.089095397	1.44	No
572	Ribosomal protein S12 methyltransferase RimO	P0AEI4	RIMO	<i>rimO</i>	0.0466751299	0.0904126642	0.34	No
573	Blue copper oxidase CueO	P36649	CUEO	<i>cueO</i>	0.0471765768	0.0912245149	-0.88	No
574	Peptide deformylase	P0A6K3	DEF	<i>def</i>	0.0483395727	0.093310534	-0.66	No
575	Apolipoprotein N-acyltransferase	P23930	LNT	<i>lnt</i>	0.0486969164	0.0938368406	0.93	No
576	Inorganic pyrophosphatase	Q8FAG0	IPYR	<i>ppa</i>	0.0488380633	0.0939454412	-0.63	No
577	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YjjK	P0A9W3	YJJK	<i>yjjK</i>	0.0497188357	0.0954739515	0.30	No
578	Uncharacterized protein YceD	P0AB28	YCED	<i>yceD</i>	0.0505623244	0.0967582995	-1.23	No
579	Lipid-A-disaccharide synthase	P10441	LPXB	<i>lpxB</i>	0.0504878669	0.0967829698	0.73	No
580	Stationary phase-inducible protein CsiE	P54901	CSIE	<i>csiE</i>	0.050793865	0.0970337973	0.92	No
581	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	P0A6Q3	FABA	<i>fabA</i>	0.050911685	0.097091475	-0.58	No
582	Uncharacterized protein YhiI	P37626	YHI1	<i>yhiI</i>	0.052149846	0.0991115426	0.67	No
583	Nickel-responsive regulator	P0A6Z6	NIKR	<i>nikR</i>	0.0520877554	0.0991636306	0.79	No
584	DNA gyrase inhibitor	P33012	SBMC	<i>sbmC</i>	0.0524345572	0.0994820023	-0.76	No
585	Uncharacterized protein YbbN	P77395	YBBN	<i>ybbN</i>	0.0526919918	0.0997995331	0.47	No
586	Cytidine deaminase	P0ABF6	CDD	<i>cdd</i>	0.0544671539	0.1029856767	0.83	No
587	Thymidylate synthase	P0A884	TYSY	<i>thyA</i>	0.0547662198	0.1033747386	-0.53	No
588	Ribonuclease R	P21499	RNR	<i>rnr</i>	0.0549696153	0.1035822003	0.63	No
589	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2	P0ABU5	ELBU	<i>elbB</i>	0.0560022242	0.105348836	-0.61	No
590	Transcriptional repressor FrmR	P0AAP3	FRMR	<i>frmR</i>	0.0562379919	0.1056130425	0.57	No
591	NAD kinase	P0A7B3	NADK	<i>nadK</i>	0.0567767477	0.1064443934	-0.64	No
592	Uncharacterized protein YhiN	P37631	YHIN	<i>yhiN</i>	0.0572545687	0.1071588887	-0.51	No
593	Replication-associated recombination protein A	P0AAZ4	RARA	<i>rarA</i>	0.0581794924	0.1085233629	-0.36	No
594	L-fucose mutarotase	P0AENS	FUCM	<i>fucU</i>	0.0581350166	0.1086232688	-0.78	No
595	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	Q8FBM1	METE	<i>metE</i>	0.0597752704	0.1113126044	0.74	No
596	Glutamate synthase [NADPH] small chain	P09832	GLTD	<i>gltD</i>	0.060194181	0.1119046183	-1.12	No
597	Riboflavin biosynthesis protein RibD	P25539	RIBD	<i>ribD</i>	0.0604768947	0.112241875	-0.31	No
598	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase	P77247	YNIC	<i>yniC</i>	0.0612489547	0.1134846853	-0.85	No
599	6-phosphofructokinase isozyme 2	P06999	K6PF2	<i>pfkB</i>	0.0614449097	0.1136576961	-0.38	No
600	RNA-binding protein YhbY	P0AGK4	YHBY	<i>yhbY</i>	0.0615657765	0.1136914673	0.56	No
601	Outer membrane protein assembly factor BamA	P0A940	BAMA	<i>bamA</i>	0.0624475094	0.1151278544	0.58	No
602	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	P62620	ISPG	<i>ispG</i>	0.0627615043	0.1155145295	-0.35	No
603	Hydrogenase-2 large chain	P0ACE0	MBHM	<i>hybC</i>	0.0644797538	0.1184802109	-0.45	No
604	Nucleoid-associated protein YbaB	P0ASB5	YBAB	<i>ybaB</i>	0.0645885696	0.1184836673	1.01	No
605	Murein tetrapeptide carboxypeptidase	P76008	LDCA	<i>ldcA</i>	0.0650294883	0.1190953273	-0.55	No
606	Alanine-tRNA ligase	P00957	SYA	<i>alaS</i>	0.0654799215	0.1194236447	0.28	No
607	LPS-assembly protein LptD	P31554	LPTD	<i>lptD</i>	0.066404681	0.1212131574	0.97	No
608	Nitrogen regulation protein NR(I)	P0AFB8	NTRC	<i>glnG</i>	0.0667797013	0.1214973876	0.42	No
609	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	P0A7E1	PYRD	<i>pyrD</i>	0.0667640615	0.1216687174	-1.08	No
610	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YciT	P76034	YCIT	<i>yciT</i>	0.0673348348	0.1219068578	0.60	No
611	Hydrogenase-1 large chain	P0ACD8	MBHL	<i>hyaB</i>	0.0673255367	0.1220895166	0.90	No
612	Exodeoxyribonuclease III	P09030	EX3	<i>xthA</i>	0.0672768524	0.1222012335	-0.48	No
613	Uncharacterized protein YbeL	P0AAT9	YBEL	<i>ybeL</i>	0.0685776235	0.1239543342	0.63	No
614	Hydrogen phosphorylase	P0AC86	PHSG	<i>glgP</i>	0.0707080517	0.1275969403	-0.32	No
615	Dihydroxy-acid dehydratase	P05791	ILVD	<i>iloD</i>	0.0714449868	0.128717147	-0.70	No
616	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	P07014	SDHB	<i>sdhB</i>	0.0753171874	0.1354731229	0.30	No
617	ATP synthase subunit b	P0ABAO	ATPF	<i>atpF</i>	0.0761545909	0.1367573529	0.61	No
618	Uncharacterized oxidoreductase YhhX	P46853	YHHX	<i>yhhX</i>	0.0767017908	0.1372949664	0.45	No
619	Ribonuclease G	P0A9J0	RNG	<i>rng</i>	0.0766868336	0.1374903101	-0.34	No
620	Galactitol-specific phosphotransferase enzyme IIB component	P37188	PTKB	<i>gatB</i>	0.0778609302	0.1391450173	0.75	No
621	Inner membrane protein YjiY	P39396	YJIY	<i>yjiY</i>	0.0782442651	0.1396049046	0.67	No
622	50S ribosomal protein L29	P0A7M6	RL29	<i>rpmC</i>	0.0800690592	0.1426310572	0.84	No
623	Lactose operon repressor	P03023	LACI	<i>lacI</i>	0.0804294767	0.1428138785	-0.44	No
624	30S ribosomal protein S16	P0AT73	RS16	<i>rpsP</i>	0.08032239	0.1428526615	0.44	No
625	Metalloprotease PmbA	P0AFK0	PMBA	<i>pmbA</i>	0.0812164653	0.1439805496	0.21	No
626	6-phospho-beta-glucosidase BglA	Q46829	BGLA	<i>bglA</i>	0.0814692165	0.1441979104	-0.83	No
627	UPF0250 protein YbeD	P0A8J4	YBED	<i>ybeD</i>	0.0816010006	0.1442008112	0.49	No
628	Osmotically-inducible protein Y	P0AFH8	OSMY	<i>osmY</i>	0.0830439889	0.1465171015	-0.84	No
629	UvrABC system protein A	P0A698	UVRA	<i>uvrA</i>	0.084484836	0.148586029	-0.48	No
630	4-aminobutyrate aminotransferase GabT	P22256	GABT	<i>gabT</i>	0.08444236	0.1487474322	-0.52	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
631	Uncharacterized protein YecA	P0AD05	YECA	<i>yecA</i>	0,0847774783	0,1488644152	0,40	No
632	23S rRNA (uracil(747)-C(5))-methyltransferase RlmC	B11WR3	RLMC	<i>rlmC</i>	0,0849235248	0,1488849137	-0,79	No
633	Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein ProV	P14175	PROV	<i>proV</i>	0,0875746939	0,1528074974	0,59	No
634	UPF0438 protein YifE	P0ADN2	YIFE	<i>yifE</i>	0,0875680173	0,1530368505	-0,40	No
635	tRNA pseudouridine synthase A	P07649	TRUA	<i>truA</i>	0,0874423715	0,153058685	-0,42	No
636	Quinone oxidoreductase 1	P28304	QOR1	<i>qorA</i>	0,0900510809	0,1568814229	-0,77	No
637	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component	P09323	PTW3C	<i>nagE</i>	0,0921502759	0,1602865081	0,97	No
638	Aldehyde reductase YahK	P75691	YAHK	<i>yahK</i>	0,0925252628	0,1606865065	-0,32	No
639	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	B7NT37	NADE	<i>nadE</i>	0,0927805342	0,1608776713	-0,68	No
640	Voltage-gated potassium channel Kch	P31069	KCH	<i>kch</i>	0,0943169552	0,1632862287	1,01	No
641	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	P0AG18	PURE	<i>purE</i>	0,09453611	0,1634103119	0,52	No
642	Universal stress protein A	P0AED0	USPA	<i>uspA</i>	0,0949180473	0,1638149476	-0,55	No
643	Catalase HPII	P21179	CATE	<i>katE</i>	0,0972909205	0,1673887266	1,51	No
644	Peptidoglycan synthase FtsI	P0AD68	FTSI	<i>ftsI</i>	0,0972831319	0,1676356301	0,66	No
645	PhoH-like protein	P0A9K3	PHOL	<i>ybeZ</i>	0,0984482309	0,169117271	-0,41	No
646	Spermidine synthase	P09158	SPEE	<i>speE</i>	0,0991821792	0,1701143259	-0,73	No
647	Chain length determinant protein	P76372	WZZB	<i>wzzB</i>	0,0997263399	0,1707832837	0,80	No
648	Uncharacterized protein YheO	P64624	YHEO	<i>yheO</i>	0,1001806981	0,1712966258	0,44	No
649	Protein YihD	P0ADP9	YIHD	<i>yihD</i>	0,1004353802	0,1714674903	0,39	No
650	Inner membrane protein YqjE	P64585	YQJE	<i>yqjE</i>	0,1006126856	0,1715059317	0,73	No
651	23S rRNA (guanosine-2'-O)-methyltransferase RlmB	P63177	RLMB	<i>rlmB</i>	0,1015415473	0,1728234016	0,28	No
652	Lysine decarboxylase, inducible	P0A9H3	LDCI	<i>cadA</i>	0,1021825169	0,17364759	-0,59	No
653	RecBCD enzyme subunit RecC	P07648	RECC	<i>recC</i>	0,1033159319	0,1753048278	0,64	No
654	Ribosome-associated inhibitor A	P0AD49	RAIA	<i>raiA</i>	0,1036228533	0,1755567606	-0,47	No
655	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	P77757	ARNC	<i>arnC</i>	0,1037989073	0,1755865485	0,22	No
656	UPF0149 protein YgfB	P0A8C4	YGFB	<i>ygfB</i>	0,1041988406	0,1759943831	0,46	No
657	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	P0ASV2	RPOB	<i>rpoB</i>	0,104605615	0,1764125136	-0,37	No
658	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	P09394	GLPQ	<i>glpQ</i>	0,1051470014	0,1770560449	-0,40	No
659	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YeiE	P0ACR4	YEIE	<i>yeiE</i>	0,1057258575	0,1774912888	-0,50	No
660	Peptide chain release factor 1	P0A710	RF1	<i>prfA</i>	0,1056322908	0,1776033054	0,72	No
661	Formate hydrogenlyase transcriptional activator	P19323	FHLA	<i>fhfA</i>	0,1062474452	0,1780970791	0,77	No
662	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	P31979	NUOF	<i>nuoF</i>	0,1064199938	0,1781168476	0,30	No
663	Ribosome maturation factor RimM	P0ATX6	RIMM	<i>rimM</i>	0,107388441	0,1794666556	-0,41	No
664	Pyridoxine kinase	P40191	PDXK	<i>pdzK</i>	0,1091144532	0,1820765274	-0,80	No
665	Uncharacterized protein YhcM	P64612	YHCM	<i>yhcM</i>	0,109356565	0,1822061264	0,43	No
666	Arabinose operon regulatory protein	P0A9E0	ARAC	<i>araC</i>	0,109684955	0,1824788741	1,04	No
667	Uncharacterized protein YigI	P0ADP2	YIGI	<i>yigI</i>	0,1127933324	0,187368834	-0,40	No
668	50S ribosomal protein L25	P68919	RL25	<i>rplY</i>	0,1131416574	0,1876661025	-0,44	No
669	Probable anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain YnfG	P0AAJ1	YNFG	<i>ynfG</i>	0,1139649903	0,1887491917	0,89	No
670	Hydrogenase-2 operon protein HybA	P0AAJ8	HYBA	<i>hybA</i>	0,1145569628	0,18944644	0,71	No
671	RNA polymerase sigma-54 factor	P24255	RP54	<i>rpoN</i>	0,1152568754	0,1903198479	0,50	No
672	NAD-dependent dihydropyrimidine dehydrogenase subunit PreT	P76440	PRET	<i>preT</i>	0,1156541522	0,1906916676	-0,38	No
673	Phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein	P0A8A4	PSRP	<i>ppsR</i>	0,1164604694	0,19173581	0,50	No
674	Transcription elongation factor GreA	P0A6W5	GREA	<i>greA</i>	0,1168406017	0,1920762413	-0,61	No
675	Probable L,D-transpeptidase YnhG	P76193	YNHG	<i>ynhG</i>	0,118002768	0,1936993584	-0,61	No
676	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2	P00562	AK2H	<i>metL</i>	0,121237322	0,1987144273	-0,21	No
677	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	P0AS15	TRMB	<i>trmB</i>	0,12143083	0,1987376066	0,35	No
678	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase PtsP	P37177	PTIP	<i>ptsP</i>	0,1222772683	0,1998277481	0,26	No
679	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	P0A6F1	CARA	<i>carA</i>	0,1234902263	0,20062635	-0,33	No
680	50S ribosomal protein L15	Q1R630	RL15	<i>rplO</i>	0,1233327082	0,2006646706	0,58	No
681	HTH-type transcriptional regulator HexR	P46118	HEXR	<i>hexR</i>	0,1231247752	0,2009164225	0,72	No
682	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YdfH	P0ACM2	YDFH	<i>ydfH</i>	0,1233102054	0,2009230993	-0,60	No
683	Putative ribosome biogenesis GTPase RsgA	Q8XDP1	RSGA	<i>rsgA</i>	0,1258979483	0,2042385458	-0,40	No
684	Guanylate kinase	P60546	KGUA	<i>gmk</i>	0,1262999305	0,2045911155	1,03	No
685	Acetylmithine deacetylase	P23908	ARGE	<i>argE</i>	0,1267374248	0,2050000974	-0,30	No
686	Pantothenate kinase	P0A6L3	COAA	<i>coaA</i>	0,1272233082	0,2054860429	-0,75	No
687	Phosphate acetyltransferase	P0A9M8	PTA	<i>pta</i>	0,1295822804	0,208991509	-0,33	No
688	GTPase Era	P06616	ERA	<i>era</i>	0,1311009688	0,2105215557	0,33	No
689	Outer membrane lipoprotein Blc	P0A901	BLC	<i>blc</i>	0,1307490711	0,210566818	0,81	No
690	Protein tas	P0A9T4	TAS	<i>tas</i>	0,1309702267	0,2106168523	-0,56	No
691	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase F	P75782	RLMF	<i>rlmF</i>	0,137274771	0,2201164201	0,54	No
692	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	P0AF18	NAGA	<i>nagA</i>	0,138471785	0,2217149389	-0,33	No
693	Bifunctional protein GlmU	P0ACC7	GLMU	<i>glmU</i>	0,1412583485	0,2255248561	-0,38	No
694	Primosomal protein N'	P17888	PRIA	<i>priA</i>	0,1411529165	0,2256817193	0,43	No
695	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive	P0AB91	AROG	<i>aroG</i>	0,1418887527	0,2262053783	-0,31	No
696	Fructose-1-phosphate phosphatase YqaB	P77475	YQAB	<i>yqaB</i>	0,1471940577	0,2343261724	1,30	No
697	Chaperone protein ClpB	P63284	CLPB	<i>clpB</i>	0,148619659	0,2362562154	-0,28	No
698	Porphobilinogen deaminase	P06983	HEM3	<i>hemC</i>	0,1490537625	0,2366068321	0,50	No
699	HIT-like protein HinT	P0ACE7	HINT	<i>hinT</i>	0,1500264492	0,2374704368	0,53	No
700	30S ribosomal protein S17	P0AC63	RS17	<i>rpsQ</i>	0,1503438252	0,2376333214	-0,56	No
701	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	P0AFG3	ODO1	<i>sucA</i>	0,1499206668	0,2376424876	0,69	No
702	Soluble lytic murein transglycosylase	P0AGC3	SLT	<i>slt</i>	0,1506925381	0,2378452026	-0,28	No
703	Fumarate hydratase class II	P05042	FUMC	<i>fumC</i>	0,1561748841	0,2461476125	-0,70	No
704	Cell division protein ZapA	P0ADS2	ZAPA	<i>zapA</i>	0,1572022706	0,2474149372	0,84	No
705	Psp operon transcriptional activator	P37344	PSPF	<i>pspF</i>	0,1576228876	0,2477250489	0,45	No
706	tRNA sulfurtransferase	A7Zx76	THII	<i>thiI</i>	0,1592255399	0,249183472	0,18	No
707	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	P0AGD3	AROA	<i>aroA</i>	0,1591203619	0,2493710905	-0,44	No
708	tRNA/tmRNA (uracil-C(5))-methyltransferase	P23003	TRMA	<i>trmA</i>	0,1589203705	0,2494104399	-0,38	No
709	Dihydropteroate synthase	P0AC13	DHPS	<i>folP</i>	0,1597425262	0,2496399423	0,56	No
710	50S ribosomal protein L21	P0AG48	RL21	<i>rplU</i>	0,1608195146	0,2509690453	-0,47	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
711	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	P45748	TSAC	<i>tsaC</i>	0.1615342777	0.2517299292	-0.43	No
712	Probable Fe(2+)-trafficking protein	P0ASP3	FETP	<i>yygX</i>	0.1646999318	0.2555847682	-0.36	No
713	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J	P37634	RLMJ	<i>rtnJ</i>	0.1646531977	0.2558706074	0.34	No
714	tRNA (mo5U34)-methyltransferase	P76291	CMOB	<i>cmoB</i>	0.1645918949	0.2561345779	-0.52	No
715	Uncharacterized protein YdhQ	P77552	YDHQ	<i>ydhQ</i>	0.1657585583	0.2568678079	0.57	No
716	Ribonuclease PH	P66680	RNPH	<i>rph</i>	0.167807682	0.2596800443	0.39	No
717	50S ribosomal protein L23	P0ADZ0	RL23	<i>rplW</i>	0.1686808839	0.2606672515	0.59	No
718	Hydrolase YafV	Q47679	YAFV	<i>yafV</i>	0.1690684856	0.2609023427	-0.72	No
719	Argininosuccinate lyase	P11447	ARLY	<i>argH</i>	0.1702425034	0.26234867	-0.31	No
720	Glutamine-binding periplasmic protein	P0AEQ3	GLNH	<i>glnH</i>	0.1748643961	0.2690968762	-0.79	No
721	Histidine transport ATP-binding protein HisP	P07109	HISP	<i>hisP</i>	0.1808956824	0.2779922554	0.60	No
722	Outer membrane protein X	P0A917	OMPX	<i>ompX</i>	0.1814478318	0.2784545674	0.33	No
723	Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	P31677	OTSA	<i>otsA</i>	0.1821696323	0.2791755914	0.25	No
724	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	P0A8T7	RPOC	<i>rpoC</i>	0.1850793583	0.2832429958	-0.26	No
725	Nucleoside diphosphate kinase	P0A763	NDK	<i>ndk</i>	0.1862723366	0.2846755159	0.43	No
726	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	P0AFG6	ODO2	<i>sucB</i>	0.1871131319	0.285566598	0.51	No
727	Protein AegA	P37127	AEGA	<i>aegA</i>	0.1888198454	0.2877749501	0.47	No
728	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase RihA	P41409	RIHA	<i>rnhA</i>	0.1895643881	0.2885128324	0.67	No
729	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B	P0AEZ9	MOAB	<i>moaB</i>	0.1908453978	0.2900640615	-0.33	No
730	Right origin-binding protein	P0AC10	ROB	<i>rob</i>	0.1922815194	0.2918464705	-0.25	No
731	DNA gyrase subunit A	P0AES4	GYRA	<i>gyrA</i>	0.1935845176	0.293422237	-0.33	No
732	tRNA (cytidine(34)-2'-O)-methyltransferase	P0AGJ7	TRML	<i>trmL</i>	0.1939905828	0.2936360188	-0.68	No
733	Stringent starvation protein A	P0ACA3	SSPA	<i>sspA</i>	0.1961975174	0.2961673696	-0.46	No
734	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	Q46769	RMLD	<i>rfdD</i>	0.1960885908	0.2964067648	-0.38	No
735	ATP synthase gamma chain	P0ABA6	ATPG	<i>atpG</i>	0.196994963	0.2969733903	0.40	No
736	50S ribosomal protein L27	P0A7L8	RL27	<i>rplM</i>	0.197713313	0.2976444984	0.47	No
737	50S ribosomal protein L19	P0A7K6	RL19	<i>rplS</i>	0.2002848948	0.300698731	0.47	No
738	D-ribose-binding periplasmic protein	P02925	RBSB	<i>rbsB</i>	0.2000161313	0.3007026778	-0.47	No
739	tRNA (cytidine/uridine-2'-O)-methyltransferase TrmJ	P0AE01	TRMJ	<i>trmJ</i>	0.2019983692	0.3028608837	-0.36	No
740	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, phosphotransferase subunit DhaM	P37349	DHAM	<i>dhaM</i>	0.2027958212	0.3036456349	0.12	No
741	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	P0AA19	FABD	<i>fabD</i>	0.203545847	0.3043573529	-0.44	No
742	Maltose O-acetyltransferase	P77791	MAA	<i>maa</i>	0.2058802767	0.3074330817	0.52	No
743	DNA helicase II	P03018	UVRD	<i>uvrD</i>	0.2076831616	0.3097078641	0.39	No
744	HTH-type transcriptional regulator ZntR	P0ACS5	ZNTR	<i>zntR</i>	0.2122819991	0.3157160469	0.68	No
745	3-deoxy-manno-octulosonate cytidylyltransferase	P04951	KDSB	<i>kdsB</i>	0.2121425596	0.3159327367	-0.46	No
746	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA	P04968	ILVA	<i>ilvA</i>	0.2147268391	0.3189240452	-0.24	No
747	30S ribosomal protein S9	P0A7X3	RS9	<i>rpsI</i>	0.2155029136	0.3196482306	0.39	No
748	Sigma factor-binding protein Crl	P24251	CRL	<i>crl</i>	0.2180488577	0.322560927	0.36	No
749	Probable diguanylate cyclase YdaM	P77302	YDAM	<i>ydaM</i>	0.217948808	0.3228439562	0.53	No
750	1-phosphofructokinase	P0AEW9	K1PF	<i>fruK</i>	0.2209777922	0.3255896193	0.26	No
751	Mannose permease IID component	P69805	PTND	<i>manZ</i>	0.2207108821	0.3256293707	0.39	No
752	Cytosol aminopeptidase	P68767	AMPA	<i>pepA</i>	0.2205788431	0.3258684775	-0.76	No
753	Transcriptional repressor NrdR	P0ASD0	NRDR	<i>nrdR</i>	0.2232197087	0.3284560919	0.30	No
754	Transcriptional regulatory protein RstA	P52108	RSTA	<i>rstA</i>	0.2235896736	0.3285641358	-0.30	No
755	Protein YciN	P0AB61	YCiN	<i>yciN</i>	0.2252709517	0.3305963105	0.72	No
756	Uncharacterized protein YehS	P33355	YEHS	<i>yehS</i>	0.2260278799	0.3312683742	0.53	No
757	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B	P36929	RSMB	<i>rsmB</i>	0.2271764606	0.3325119133	-0.30	No
758	1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase AmpD	P13016	AMPD	<i>ampD</i>	0.2301548487	0.3364268765	-0.47	No
759	50S ribosomal protein L9	P0A7R1	RL9	<i>rplL</i>	0.2307029423	0.3367837419	0.21	No
760	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	P76535	MURQ	<i>murQ</i>	0.2316983966	0.337791873	-0.23	No
761	Glutamine synthetase	P0A9C5	GLNA	<i>glnA</i>	0.2328167552	0.3389763006	-0.20	No
762	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YqhC	Q46855	YQHC	<i>yqhC</i>	0.2346892442	0.3412541766	0.56	No
763	Alanine racemase, biosynthetic	P0A6B4	ALR1	<i>alr</i>	0.2351392177	0.341460358	0.50	No
764	Gamma-glutamyl phosphate reductase	P07004	PROA	<i>proA</i>	0.2354571588	0.3414745183	-0.82	No
765	NADP-dependent malic enzyme	P76558	MAO2	<i>maeB</i>	0.2410793543	0.3487153061	-0.16	No
766	Transaldolase A	P0A867	TALA	<i>talA</i>	0.2410088935	0.3490690903	-0.27	No
767	Glutamyl-tRNA reductase	P0A6X1	HEM1	<i>hemA</i>	0.2418266962	0.3493402599	0.40	No
768	Uncharacterized protein YjaG	P32680	YJAG	<i>yjaG</i>	0.2460905271	0.3550368542	-0.31	No
769	30S ribosomal protein S14	P0AG59	RS14	<i>rpsN</i>	0.2470735217	0.3555291715	-0.27	No
770	Beta-galactosidase	P00722	BGAL	<i>lacZ</i>	0.2467535286	0.3555304417	-0.23	No
771	D-cysteine desulfhydrase	P76316	DCYD	<i>dcyD</i>	0.2483850871	0.3564905137	-0.45	No
772	50S ribosomal protein L16	P0ADY7	RL16	<i>rplP</i>	0.248289544	0.3568155833	0.49	No
773	P-protein	P0A9J8	PHEA	<i>pheA</i>	0.2505147624	0.3590819622	-0.47	No
774	HTH-type transcriptional repressor NsrR	P0AF63	NSRR	<i>nsrR</i>	0.2511733843	0.3595608653	-0.34	No
775	Universal stress protein D	P0AAB8	USPD	<i>uspD</i>	0.251558163	0.364790509	-0.50	No
776	PTS system trehalose-specific EIIBC component	P36672	PTTBC	<i>treB</i>	0.2556549506	0.3650330996	0.30	No
777	Glycerol-3-phosphate regulon repressor	P0ACL0	GLPR	<i>glpR</i>	0.2574384277	0.3671065352	0.54	No
778	Acetylglutamate kinase	P0A6C8	ARGB	<i>argB</i>	0.2602154738	0.3691661268	0.38	No
779	Signal transduction protein PmrD	P37590	PMRD	<i>pmrD</i>	0.2592670094	0.3692388772	-0.40	No
780	Thermoresistant gluconokinase	P46859	GNTK	<i>gntK</i>	0.2596980302	0.3693779428	-0.35	No
781	Arabinose 5-phosphate isomerase GutQ	P17115	GUTQ	<i>gutQ</i>	0.2600954016	0.3694688525	-0.33	No
782	ATP phosphoribosyltransferase	P60757	HIS1	<i>hisG</i>	0.2617987359	0.3709373393	-0.18	No
783	Uncharacterized oxidoreductase YciK	P31808	YCiK	<i>yciK</i>	0.2621711477	0.3709905895	-0.50	No
784	HTH-type transcriptional regulator CysB	P0A9F3	CYSB	<i>cysB</i>	0.2656779034	0.3754733635	0.26	No
785	Non-specific ribonucleoside hydrolase RihC	P22564	RIHC	<i>rnhC</i>	0.2663709327	0.3754949026	-0.55	No
786	D-erythrose-4-phosphate dehydrogenase	P0A9B6	E4PD	<i>epd</i>	0.2661058755	0.3755991211	0.31	No
787	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	P0A725	LPXC	<i>lpxC</i>	0.2670243636	0.3759377317	-0.27	No
788	DNA-cytosine methyltransferase	P0AED9	DCM	<i>dcm</i>	0.2710050481	0.3810578595	0.33	No
789	Epimerase family protein YfcH	P77775	YFCH	<i>yfcH</i>	0.2717637837	0.3816403959	0.28	No
790	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	P0A948	RIMJ	<i>rimJ</i>	0.2733820344	0.3834269546	0.35	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
791	Glycerol-3-phosphate transporter	P08194	GLPT	<i>glpT</i>	0.2748025213	0.3844459515	0.41	No
792	S-adenosylmethionine synthase	P0A817	METK	<i>metK</i>	0.2747013857	0.3847903101	0.26	No
793	50S ribosomal protein L24	P60624	RL24	<i>rplX</i>	0.2773959434	0.3875847482	0.20	No
794	Ribulose-phosphate 3-epimerase	P0AG07	RPE	<i>rpe</i>	0.2791739127	0.389087667	-0.31	No
795	Polyphosphate kinase	P0A7B1	PPK	<i>ppk</i>	0.2789825326	0.3893106374	0.33	No
796	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1	P00561	AK1H	<i>thrA</i>	0.2806533597	0.3906581942	-0.15	No
797	Uncharacterized protein YieF	P0AGE6	YIEF	<i>yieF</i>	0.2822292508	0.392358858	-0.52	No
798	Uroporphyrinogen-III synthase	P09126	HEM4	<i>hemD</i>	0.2833374657	0.3929135319	-0.49	No
799	Histidinol-phosphate aminotransferase	P06986	HIS8	<i>hisC</i>	0.2832360362	0.3932650728	0.40	No
800	Lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase	P45565	AIS	<i>ais</i>	0.283963828	0.3932899018	-0.35	No
801	Sec-independent protein translocase protein TatA	P69428	TATA	<i>tatA</i>	0.2851630051	0.3944576899	0.57	No
802	Glucans biosynthesis protein G	P33136	OPGG	<i>mdoG</i>	0.2874547662	0.3971320212	-0.40	No
803	GTP-binding protein TypA/BipA	P32132	TYPA	<i>typA</i>	0.288536766	0.3981304318	-0.21	No
804	Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	P0A9K7	PHOU	<i>phoU</i>	0.2902716676	0.400026129	0.59	No
805	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B	A8A2A7	GLPB	<i>glpB</i>	0.2921144027	0.4020655382	-0.23	No
806	Leucine-responsive regulatory protein	P0ACJ0	LRP	<i>lrp</i>	0.2934154015	0.4033551673	-0.21	No
807	Uncharacterized sigma-54-dependent transcriptional regulator YgeV	Q46802	YGEV	<i>ygeV</i>	0.298797607	0.4097373126	0.43	No
808	Antitoxin MqsA	Q46864	MQSA	<i>mqsA</i>	0.2987054267	0.4101184792	0.45	No
809	Nuclease SbcCD subunit C	P13458	SBCC	<i>sbcC</i>	0.3011739668	0.4124854824	0.20	No
810	Fumarate reductase iron-sulfur subunit	P0AC47	FRDB	<i>frdB</i>	0.304632994	0.4161940288	0.60	No
811	UPF0325 protein YaeH	P62768	YAEH	<i>yaeH</i>	0.3045548252	0.4166009214	-0.22	No
812	DNA topoisomerase 4 subunit B	P20083	PARE	<i>parE</i>	0.3060726558	0.4176459391	0.37	No
813	Lipopolysaccharide core heptosyltransferase RfaQ	Q9R9D5	RFAQ	<i>rfaQ</i>	0.3069516818	0.4183302133	0.55	No
814	Uncharacterized protein YphG	P76585	YPHG	<i>yphG</i>	0.3095896915	0.4214070986	0.61	No
815	Deoxycytidine triphosphate deaminase	P28248	DCD	<i>dcd</i>	0.3105253904	0.4221621258	0.37	No
816	Small heat shock protein IbpB	P0C058	IBPB	<i>ibpB</i>	0.3158001674	0.428807079	0.66	No
817	Xaa-Pro aminopeptidase	P15034	AMPP	<i>pepP</i>	0.3185817866	0.4315264297	-0.45	No
818	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P0AFL3	PPIA	<i>ppiA</i>	0.3184978587	0.4319407924	-0.31	No
819	Transcriptional regulatory protein YpdB	P0AE39	YPDB	<i>ypdB</i>	0.3211139529	0.4344252257	0.42	No
820	Uncharacterized N-acetyltransferase YhbS	P63417	YHBS	<i>yhbS</i>	0.3221790424	0.4353346085	-0.20	No
821	dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	P27833	RFFA	<i>rffA</i>	0.3255003392	0.4392866941	0.23	No
822	Probable transcriptional regulatory protein YebC	P0A8A0	YEBC	<i>yebC</i>	0.3265710216	0.4396606622	-0.19	No
823	Transcriptional regulatory protein CreB	P08368	CREB	<i>creB</i>	0.3264867807	0.440081938	0.25	No
824	Transcription elongation factor GreB	P30128	GREB	<i>greB</i>	0.3283630502	0.4415367229	0.50	No
825	50S ribosomal protein L22	P61175	RL22	<i>rplV</i>	0.3316605248	0.4454301352	0.31	No
826	Uncharacterized protein YfiQ	P76594	YFIQ	<i>yfiQ</i>	0.3343951458	0.4480167129	0.31	No
827	Transcriptional regulatory protein CpxR	P0AE88	CPXR	<i>cpxR</i>	0.3342950318	0.4484248126	0.20	No
828	30S ribosomal protein S8	P0A7W7	RSS	<i>rpsH</i>	0.3373474849	0.4503385702	0.33	No
829	Fructose-6-phosphate aldolase 2	P32669	FSAB	<i>fsaB</i>	0.3371119468	0.4505669928	0.40	No
830	Very short patch repair protein	P09184	VSR	<i>usr</i>	0.336947406	0.4508909733	0.38	No
831	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA	P77398	ARNA	<i>arnA</i>	0.3390016217	0.4520021623	0.34	No
832	Alcohol dehydrogenase YqhD	Q46856	YQHD	<i>yqhD</i>	0.3409300229	0.4529382078	-0.40	No
833	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase	P39173	YEAD	<i>yead</i>	0.3403537106	0.4532595088	0.50	No
834	Iron-binding protein IscA	P0AAC8	ISCA	<i>iscA</i>	0.3407755375	0.4532764652	-0.26	No
835	Uncharacterized protein YkgG	P77433	YKGG	<i>ykgG</i>	0.3450820669	0.4579053056	0.22	No
836	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	P0A9L5	PPIC	<i>ppiC</i>	0.3468621007	0.4597167555	-0.29	No
837	4-alpha-L-fucosyltransferase	P56258	WECF	<i>wecF</i>	0.3483996445	0.4612028747	0.39	No
838	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	P0A7A5	PIMT	<i>pcm</i>	0.3490208117	0.4614738178	0.23	No
839	DNA polymerase II	P21189	DPO2	<i>polB</i>	0.3501894651	0.4624671362	0.40	No
840	RNA polymerase-associated protein RapA	P60240	RAPA	<i>rapA</i>	0.351499171	0.4636441447	-0.48	No
841	Nitrate/nitrite response regulator protein NarP	P31802	NARP	<i>narP</i>	0.3550851521	0.4678172991	-0.31	No
842	NADH-quinone oxidoreductase subunit E	P0AFD1	NUOE	<i>nuoE</i>	0.3614594773	0.4756497635	0.40	No
843	Uncharacterized protein YecJ	P0AD10	YECJ	<i>yecJ</i>	0.3665778129	0.4818128311	0.35	No
844	NAD-dependent malic enzyme	P26616	MAO1	<i>maeA</i>	0.3676252393	0.4826170203	0.22	No
845	Ribosome-recycling factor	P0A805	RRF	<i>frr</i>	0.3691716696	0.4835014302	-0.26	No
846	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	P0A6A6	LEUC	<i>leuC</i>	0.3687382906	0.4835053562	0.47	No
847	Universal stress protein F	P37903	USPF	<i>uspF</i>	0.3697329805	0.4836648671	0.24	No
848	Catalase-peroxidase	P13029	KATG	<i>katG</i>	0.3730930605	0.4863377777	-0.26	No
849	Peptide chain release factor 3	P0A7I4	RF3	<i>prfC</i>	0.3735873726	0.4864098812	0.45	No
850	Transcription termination/antitermination protein NusG	P0AFG0	NUSG	<i>nusG</i>	0.3730286164	0.48682651	0.20	No
851	Phage shock protein B	P0AFM9	PSPB	<i>pspB</i>	0.3726350668	0.4868863845	0.33	No
852	50S ribosomal protein L13	P0AA10	RL13	<i>rplM</i>	0.3811786071	0.4951300078	0.33	No
853	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	P27828	WECB	<i>wecB</i>	0.3809443992	0.4954065662	-0.28	No
854	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	BLI0H4	GLND	<i>glnD</i>	0.3823577892	0.4960801294	-0.17	No
855	Transcriptional repressor MprA	P0ACR9	MPRA	<i>mprA</i>	0.3836367202	0.4971572935	-0.33	No
856	GTPase HflX	P25519	HFLX	<i>hflX</i>	0.3849646578	0.4977139332	0.24	No
857	L-asparaginase 1	P0A962	ASPG1	<i>ansA</i>	0.3846815624	0.4979289383	-0.46	No
858	FeS cluster assembly protein SufB	P77522	SUFB	<i>sufB</i>	0.3888095188	0.5020990057	0.49	No
859	DNA-binding protein H-NS	P0ACF8	HNS	<i>hns</i>	0.3897730691	0.5027573464	-0.29	No
860	Biodegradative arginine decarboxylase	P28629	ADIA	<i>adiA</i>	0.3906274901	0.503273557	0.48	No
861	Uncharacterized protein YaiL	P51024	YAIL	<i>yaiL</i>	0.3940229315	0.5070558546	-0.47	No
862	NADPH-dependent curcumin reductase	P76113	CURA	<i>curA</i>	0.3974014153	0.5096305187	-0.34	No
863	UPF0381 protein YiiS	P32162	YIIS	<i>yiiS</i>	0.3967979462	0.5100372673	-0.54	No
864	Macrolide export protein MacA	P75830	MACA	<i>macA</i>	0.3973852437	0.5102002897	0.36	No
865	Zinc uptake regulation protein	P0AC51	ZUR	<i>zur</i>	0.39851387	0.5104663213	0.43	No
866	50S ribosomal protein L32	P0A7N4	RL32	<i>rplM</i>	0.3990925491	0.5106172568	0.37	No
867	Protein MtfA	BTLSZ1	MTEA	<i>mtfA</i>	0.4010685288	0.5125535524	-0.23	No
868	50S ribosomal protein L28	P0A7M2	RL28	<i>rplM</i>	0.4025138195	0.5138079632	-0.37	No
869	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisB	P06987	HIS7	<i>hisB</i>	0.4091954749	0.5217360025	-0.24	No
870	Maf-like protein YhdE	P25536	YHDE	<i>yhdE</i>	0.4109660189	0.5233912057	-0.31	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
871	Acetate operon repressor	P16528	ICLR	<i>iclR</i>	0.4154808332	0.5285335972	0.15	No
872	HTH-type transcriptional regulator MalT	P06993	MALT	<i>malT</i>	0.4199743954	0.5336371905	0.34	No
873	Stringent starvation protein B	P0AFZ3	SSPB	<i>sspB</i>	0.4212479638	0.5346423183	0.37	No
874	Probable L,D-transpeptidase YcbB	P22525	YCBB	<i>ycbB</i>	0.4235759854	0.5369819128	-0.21	No
875	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	P15639	PUR9	<i>purH</i>	0.4242242955	0.5371891651	-0.30	No
876	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	P17952	MURC	<i>murC</i>	0.4260908718	0.5389368561	0.17	No
877	Argininosuccinate synthase	P0A6E4	ASSY	<i>argG</i>	0.4274192518	0.5400006055	0.26	No
878	Acetolactate synthase isozyme 3 small subunit	P00894	ILVH	<i>iloH</i>	0.4298902443	0.5425038618	0.51	No
879	Cytidylate kinase	P0A610	KCY	<i>cmk</i>	0.4313139086	0.5436812409	0.47	No
880	5'/3'-nucleotidase SurE	P0A840	SURE	<i>surE</i>	0.4319403753	0.5438521998	-0.34	No
881	Uncharacterized lipoprotein YceB	P0AB26	YCEB	<i>yceB</i>	0.4356873606	0.5479473275	0.28	No
882	Glycophorin-A	P02724	GLPA	<i>GYP A</i>	0.4377805399	0.5499555989	0.21	No
883	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA	B1J0M7	RUVA	<i>ruvA</i>	0.4390790239	0.5509621273	0.25	No
884	Inhibitor of g-type lysozyme	P76002	PLIG	<i>pliG</i>	0.4410731638	0.5528383093	-0.15	No
885	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	P61714	RISB	<i>ribE</i>	0.4441152814	0.5560222958	-0.27	No
886	Metalloprotease TldD	P0AGG8	TLDD	<i>tldD</i>	0.4458338657	0.5562882018	0.50	No
887	Peptidase B	P37095	PEPB	<i>pepB</i>	0.4452684742	0.5568368729	-0.21	No
888	Flavohemoprotein	P24232	HMP	<i>hmp</i>	0.4457717115	0.5568377186	0.19	No
889	Protein ElaB	P0AEH5	ELAB	<i>elaB</i>	0.4473069786	0.5574984616	0.23	No
890	Ribosomal protein S6-L-glutamate ligase	P0C0U4	RIMK	<i>rimK</i>	0.4479545883	0.5576782964	-0.31	No
891	50S ribosomal protein L4	P60723	RL4	<i>rplD</i>	0.4488570258	0.5581746179	0.23	No
892	Bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase	P0AES0	GSP	<i>gss</i>	0.4494789542	0.55983213915	-0.39	No
893	50S ribosomal protein L33	P0A7N9	RL33	<i>rpmG</i>	0.4525352753	0.5614883371	0.23	No
894	Acyl-CoA thioester hydrolase YciA	P0A8Z0	YCIA	<i>yciA</i>	0.4536374695	0.5615981186	-0.27	No
895	Magnesium and cobalt efflux protein CorC	P0AE78	CORC	<i>corC</i>	0.4532533537	0.5617502415	0.31	No
896	Quercetin 2,3-dioxygenase	P46852	YHHW	<i>yhhW</i>	0.4549025045	0.5619085562	-0.36	No
897	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase CysQ	P22255	CYSQ	<i>cysQ</i>	0.4544101883	0.5619268846	-0.45	No
898	D-alanine-D-alanine ligase B	P07862	DDL B	<i>ddlB</i>	0.4594839946	0.5669357082	-0.25	No
899	Pyrimidine 5'-nucleotidase YjjG	P0A8Y1	YJJG	<i>yjjG</i>	0.4690348672	0.5780763435	0.26	No
900	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	P76562	TMCA	<i>tmcA</i>	0.4744075787	0.5840484414	0.39	No
901	Nitrogen regulatory protein P-II 1	P0A9Z1	GLNB	<i>glnB</i>	0.4759918299	0.5853484434	0.21	No
902	Ribosome-binding factor A	P0A7G2	RBFA	<i>rbfA</i>	0.4775731119	0.5859922656	0.15	No
903	Septum site-determining protein MinC	P18196	MINC	<i>minC</i>	0.4774197218	0.5864534942	-0.21	No
904	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	P0A7Z4	RPOA	<i>rpoA</i>	0.4809214789	0.5894480073	0.10	No
905	Uncharacterized GTP-binding protein YjiA	P24203	YJIA	<i>yjiA</i>	0.4854433356	0.5943328352	0.17	No
906	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	P37689	GPMI	<i>gpmI</i>	0.4880672137	0.5968857315	0.19	No
907	Ribonuclease I	P21338	RNI	<i>rna</i>	0.4916231176	0.6005715704	0.34	No
908	Threonine synthase	P00934	THRC	<i>thrC</i>	0.4961842051	0.6054758802	0.24	No
909	3-isopropylmalate dehydrogenase	P30125	LEU3	<i>leuB</i>	0.497763258	0.6067345323	0.39	No
910	Amino-acid acetyltransferase	P0A6C5	ARGA	<i>argA</i>	0.4997717739	0.6085133248	-0.18	No
911	DNA polymerase I	P00582	DPO1	<i>polA</i>	0.5020388641	0.6099331814	-0.16	No
912	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	P37765	RLUB	<i>riuB</i>	0.5025944884	0.6099394229	0.14	No
913	Spermidine N(1)-acetyltransferase	P0A9Y1	ATDA	<i>speG</i>	0.5015030979	0.6099510785	0.33	No
914	Positive transcription regulator EvgA	P0ACZ4	EVGA	<i>evgA</i>	0.5053659868	0.6126318527	0.23	No
915	Glucose-1-phosphatase	P19926	AGP	<i>agp</i>	0.5121581269	0.6188344652	0.41	No
916	Probable GTP-binding protein EngB	P0A6P7	ENGB	<i>engB</i>	0.5113345333	0.6191897955	-0.12	No
917	Osmotically-inducible lipoprotein E	P0ADB1	OSME	<i>osmE</i>	0.5120271	0.6193515576	-0.38	No
918	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase M	P0ADR6	RLMM	<i>rimM</i>	0.5152078468	0.6198157376	-0.25	No
919	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta	P69924	RIR2	<i>nrdB</i>	0.514300295	0.6200704319	0.27	No
920	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	P0A749	MURA	<i>murA</i>	0.5149225832	0.6201458937	0.12	No
921	Transcription termination/antitermination protein NusA	P0AFF6	NUSA	<i>nusA</i>	0.5142106171	0.6206376512	0.10	No
922	dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose transaminase	Q9XCW4	VIOA	<i>vioA</i>	0.5189893476	0.6230121312	-0.17	No
923	Transcriptional regulatory protein QseB	P52076	QSEB	<i>qseB</i>	0.5184767782	0.6230718766	-0.25	No
924	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	P04036	DAPB	<i>dapB</i>	0.5223421148	0.6256811495	0.29	No
925	ATPase RavA	P31473	RAVA	<i>ravA</i>	0.5219602176	0.6259003475	0.28	No
926	UPF0271 protein YbgL	P75746	YBGL	<i>ybgL</i>	0.5253219766	0.6285710044	0.50	No
927	Regulatory protein SdiA	P07026	SDIA	<i>sdiA</i>	0.5267724461	0.629626613	-0.24	No
928	L-threonine 3-dehydrogenase	P07913	TDH	<i>tdh</i>	0.5292836506	0.6319464277	0.14	No
929	Peptidyl-dipeptidase dcp	P24171	DCP	<i>dcp</i>	0.5334205351	0.6362001646	-0.24	No
930	Chromosome partition protein MukB	B1I1W07	MUKB	<i>mukB</i>	0.5379383831	0.6402102347	0.22	No
931	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase	P14900	MURD	<i>murD</i>	0.5377044956	0.6406199797	-0.24	No
932	D-ribose pyranase	P04982	RBSD	<i>rbsD</i>	0.5460693099	0.6491896946	-0.17	No
933	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase F	P32684	RLUF	<i>riuF</i>	0.5479609516	0.650740337	-0.22	No
934	Endonuclease 8	P50465	ENDS	<i>nei</i>	0.5486837506	0.650901066	0.18	No
935	Type I restriction enzyme EcoKI R protein	P08956	TIRK	<i>hsdR</i>	0.5495788874	0.6512656762	0.14	No
936	Uncharacterized oxidoreductase YbiC	P30178	YBIC	<i>ybiC</i>	0.55625479	0.657769805	0.22	No
937	3-dehydroquinate synthase	P07639	AROB	<i>aroB</i>	0.5556645624	0.6577738623	-0.21	No
938	Sec-independent protein translocase protein TatB	P69425	TATB	<i>tatB</i>	0.5570840319	0.6580480889	0.32	No
939	Inorganic triphosphatase	P30871	3PASE	<i>ygiP</i>	0.5590345348	0.659648844	0.13	No
940	Ribonuclease 3	P0A7Y0	RNC	<i>rnc</i>	0.5605597473	0.6600427206	-0.14	No
941	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	P05852	TSAD	<i>tsaD</i>	0.5612236161	0.6601228945	0.25	No
942	GMP reductase	P60560	GUAC	<i>guaC</i>	0.5604157236	0.6605751296	0.17	No
943	7-cyano-7-deazaguanine synthase	B7M3T7	QUEC	<i>queC</i>	0.5634859082	0.6620810034	-0.28	No
944	Cysteine desulfurase CsdA	Q46925	CSDA	<i>csdA</i>	0.5648535136	0.6629848443	0.26	No
945	Aconitate hydratase 1	P25516	ACON1	<i>acnA</i>	0.5655579979	0.6631092716	-0.12	No
946	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	P25745	MNMA	<i>mnmA</i>	0.5668092079	0.6638737868	0.28	No
947	Elongation factor P	P0A6N4	EFP	<i>efp</i>	0.5686216135	0.6652932923	-0.15	No
948	AMP nucleosidase	P0AE12	AMN	<i>amn</i>	0.5696453953	0.6657880781	0.17	No
949	Uncharacterized protein YdiH	P64476	YDIH	<i>ydiH</i>	0.5744333918	0.6706767103	0.19	No
950	3-ketoacyl-CoA thiolase	P21151	FADA	<i>fadA</i>	0.5779969199	0.6741269339	-0.26	No



Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
951	Ribose-5-phosphate isomerase B	P37351	RPIB	<i>rpiB</i>	0.5792636085	0.6748938783	-0.24	No
952	DNA topoisomerase I	P06612	TOP1	<i>topA</i>	0.5847473221	0.6805672615	0.12	No
953	UPF0307 protein YjgA	P0A8X0	YJGA	<i>yjgA</i>	0.59209627	0.6883973423	-0.15	No
954	Chaperone protein YcdY	P75915	YCDY	<i>ycdY</i>	0.5957719036	0.6919447266	0.19	No
955	Fatty acid metabolism regulator protein	P0A8V6	FADR	<i>fadR</i>	0.5977559898	0.6935221327	0.11	No
956	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsaE	P0AF67	TSAE	<i>tsaE</i>	0.598554768	0.6937224717	-0.21	No
957	Hydroxyacylglutathione hydrolase	P0AC84	GLO2	<i>gloB</i>	0.6017270092	0.6966703513	0.22	No
958	Sodium/glutamate symport carrier protein	P0AER8	GLTS	<i>gltS</i>	0.6036692375	0.698189473	0.40	No
959	Ribosome-binding ATPase YchF	P0ABU2	YCHF	<i>ychF</i>	0.6051078386	0.698395297	-0.07	No
960	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	P17993	UBIG	<i>ubiG</i>	0.6061208042	0.6988364735	0.17	No
961	Valine-pyruvate aminotransferase	P09053	AVTA	<i>avtA</i>	0.6050734334	0.6990838	-0.22	No
962	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiA	P36548	AMIA	<i>amiA</i>	0.6085620951	0.7009218309	0.14	No
963	T7 RNA polymerase	P00573	RPOL	<i>r</i>	0.6115499747	0.7036317466	0.10	No
964	Thiamine-monophosphate kinase	P0AGG0	THIL	<i>thiL</i>	0.6126783038	0.7041987143	0.13	No
965	L-serine dehydratase I	P16095	SDHL	<i>sdaA</i>	0.6167397978	0.7081323274	-0.22	No
966	Protein YhbO	P45470	YHBO	<i>yhbO</i>	0.6202927461	0.7114744955	-0.18	No
967	dITP/XTP pyrophosphatase	P52061	RDGB	<i>rdgB</i>	0.6212582912	0.711845074	0.19	No
968	Lysine-tRNA ligase	P0A8N3	SYK1	<i>lysS</i>	0.626749876	0.7173955192	0.14	No
969	Uridine kinase	P0A8F4	URK	<i>udk</i>	0.6341559078	0.7251235767	0.13	No
970	Aspartate-ammonia ligase	P00963	ASNA	<i>asnA</i>	0.6372192122	0.7278751413	0.22	No
971	Probable acrylyl-CoA reductase AcuI	P26646	ACUI	<i>acuI</i>	0.6379482943	0.7279574769	0.20	No
972	GTPase Der	P0AGP5	DER	<i>der</i>	0.6426300942	0.7317925431	-0.09	No
973	HTH-type transcriptional regulator YjdC	P0ACU7	YJDC	<i>yjdC</i>	0.6420226649	0.7318529966	-0.34	No
974	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	P0AAB6	GALF	<i>galP</i>	0.6435715325	0.7321121746	0.15	No
975	Uncharacterized protein YiiD	P0ADQ2	YIID	<i>yiiD</i>	0.6459204079	0.7340305763	-0.15	No
976	L-Ala-D/L-Glu epimerase	P51981	AEEP	<i>ycjG</i>	0.6467460624	0.7342158167	0.19	No
977	50S ribosomal protein L18	POC018	RL18	<i>rplR</i>	0.64820055	0.7351138274	-0.13	No
978	30S ribosomal protein S21	P68679	RS21	<i>rpsU</i>	0.6493461737	0.7356600823	-0.18	No
979	Ecotin	P23827	ECOT	<i>eco</i>	0.65107532	0.7368656328	-0.20	No
980	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Trp-sensitive	P00887	AROH	<i>aroH</i>	0.6583837267	0.7443767033	0.12	No
981	ATP-dependent RNA helicase RhlE	P25888	RHLE	<i>rhlE</i>	0.6614774871	0.7471121872	-0.10	No
982	Protein QmcA	P0AA53	QMCA	<i>qmcA</i>	0.6639197475	0.7491070064	-0.19	No
983	DNA-binding protein HU-alpha	P0ACF0	DBHA	<i>hupA</i>	0.6661418581	0.7508496223	0.06	No
984	30S ribosomal protein S12	P0A7S3	RS12	<i>rpsL</i>	0.6762245331	0.7614398198	-0.17	No
985	Adenylate kinase	P69441	KAD	<i>adk</i>	0.6830847359	0.7676043482	-0.13	No
986	Acyl-CoA thioester hydrolase YbgC	P0A8Z3	YBGC	<i>ybgC</i>	0.6826136072	0.767853682	-0.22	No
987	Lead, cadmium, zinc and mercury-transporting ATPase	P37617	ATZN	<i>zntA</i>	0.6862093998	0.7703343617	0.14	No
988	Glycogen debranching enzyme	P15067	GLGX	<i>glgX</i>	0.6883681362	0.7719756021	0.22	No
989	Uncharacterized protein YggE	P0AD56	YGGE	<i>yggE</i>	0.6894056025	0.7723573383	0.17	No
990	Glutaredoxin-2	P0AC59	GLRX2	<i>grxB</i>	0.6921103591	0.7746043211	0.13	No
991	Probable phospholipid-binding lipoprotein MlaA	P76506	MLAA	<i>mlaA</i>	0.6961836707	0.7783768992	0.13	No
992	Transketolase 2	P33570	TKT2	<i>tktB</i>	0.6972754531	0.7788116956	-0.12	No
993	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsaB	P76256	TSAB	<i>tsaB</i>	0.6982968306	0.7791670577	0.15	No
994	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	P0A9Q5	ACCD	<i>accD</i>	0.7069949184	0.786496355	-0.11	No
995	Nitrogen regulatory protein	P69829	PTSN	<i>ptsN</i>	0.7058251708	0.7867749389	0.16	No
996	DNA topoisomerase 3	P14294	TOP3	<i>topB</i>	0.706872951	0.7871509847	0.06	No
997	Flavin mononucleotide phosphatase YigB	P0ADP0	YIGB	<i>yigB</i>	0.7189768832	0.7990234569	0.12	No
998	HTH-type transcriptional regulator YiaJ	P37671	YIAJ	<i>yiaJ</i>	0.7211661438	0.8006533941	0.12	No
999	HTH-type transcriptional regulator CueR	P0A9G4	CUER	<i>cueR</i>	0.7220416592	0.8008229814	-0.08	No
1000	Transcription-repair-coupling factor	P30958	MFD	<i>mfd</i>	0.7240145352	0.802208105	0.11	No
1001	UPF0381 protein YfcZ	P0AD33	YFCZ	<i>yfcZ</i>	0.7258999978	0.8034937038	-0.11	No
1002	Adenylate cyclase	P00936	CYAA	<i>cyaA</i>	0.7310922527	0.8084333493	0.15	No
1003	Uncharacterized protein YaeR	P52096	YAEER	<i>yaeR</i>	0.7336516144	0.8096473992	-0.14	No
1004	NADH pyrophosphatase	P32664	NUDC	<i>nudC</i>	0.7331039862	0.8098496677	-0.13	No
1005	ATP-dependent RNA helicase HrpA	P43329	HRPA	<i>hrpA</i>	0.7370509449	0.8125894994	0.11	No
1006	Trifunctional NAD biosynthesis/regulator protein NadR	P27278	NADR	<i>nadR</i>	0.7393149413	0.8126596775	0.08	No
1007	HTH-type transcriptional repressor BdcR	P39334	BDCR	<i>bdcR</i>	0.7388436974	0.8129481795	-0.18	No
1008	50S ribosomal protein L16 arginine hydroxylase	P27431	YCFD	<i>yfcD</i>	0.7383265159	0.8131866596	-0.20	No
1009	Protein ApaG	P62672	APAG	<i>apaG</i>	0.7437248129	0.8166968213	0.15	No
1010	Protein FdhE	P13024	FDHE	<i>fdhE</i>	0.7472719583	0.8197795345	0.10	No
1011	Proline-tRNA ligase	B7M1Z9	SYF	<i>proS</i>	0.7496973377	0.8216267559	-0.08	No
1012	50S ribosomal protein L20	P0A7L3	RL20	<i>rplT</i>	0.7529700492	0.8227720065	0.09	No
1013	Primosomal replication protein N <sup>o</sup>	P23862	PRIC	<i>priC</i>	0.7525704465	0.8231471418	-0.07	No
1014	Endonuclease V	P68739	NFI	<i>nfi</i>	0.7521009229	0.823446465	-0.07	No
1015	Thermonuclease	P00644	NUC	<i>nuc</i>	0.7568657284	0.8254008141	0.14	No
1016	Mannose-6-phosphate isomerase	P00946	MANA	<i>manA</i>	0.756200354	0.8254876771	-0.12	No
1017	Ribonuclease P protein component	P0A7Y8	RNPA	<i>rnpA</i>	0.7578071875	0.8256149102	-0.10	No
1018	Uncharacterized oxidoreductase YjhC	P39353	YJHC	<i>yjhC</i>	0.759071023	0.8261794632	-0.14	No
1019	30S ribosomal protein S6	P02358	RS6	<i>rpsF</i>	0.7625064735	0.8282913457	0.06	No
1020	Transcriptional regulator KdgR	P76268	KDGR	<i>kdgR</i>	0.7620873595	0.8286484734	-0.11	No
1021	Shikimate dehydrogenase	P15770	AROE	<i>aroE</i>	0.7648660118	0.8300406866	0.13	No
1022	SsrA-binding protein	P0A832	SSRP	<i>ssrB</i>	0.7659921412	0.8304494055	-0.12	No
1023	Uncharacterized oxidoreductase YdgJ	P77376	YDGJ	<i>ydgJ</i>	0.7672024041	0.8309484495	0.09	No
1024	UPF0313 protein YgiQ	Q46861	YGIQ	<i>ygiQ</i>	0.7680992432	0.8311073843	-0.10	No
1025	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	B7M195	GSA	<i>hemL</i>	0.7723933368	0.8349383582	-0.10	No
1026	ProP effector	Q8XCM4	PROQ	<i>proQ</i>	0.7755662466	0.8375510733	0.09	No
1027	UPF0001 protein YggS	P67080	YGGSS	<i>yggS</i>	0.7803078019	0.8402148148	0.14	No
1028	Cysteine-tRNA ligase	P21888	SYC	<i>cysS</i>	0.7792820212	0.8407443812	0.07	No
1029	HTH-type transcriptional repressor CytR	P0ACN7	CYTR	<i>cytR</i>	0.7800590082	0.8407639894	0.07	No
1030	Cysteine desulfurase	P77444	SUFS	<i>sufS</i>	0.7900033148	0.8498288086	-0.11	No

Número	Nombre proteína	Identificador Uniprot	Proteína	Gen	p-valor	FDR	log2FC	Significatividad
1031	Uncharacterized protein YbgJ	P0AAV4	YBGJ	<i>ybgJ</i>	0,7953135804	0,8522315735	0,10	No
1032	Uncharacterized deoxyribonuclease YefH	P0AFQ7	YCFH	<i>yefH</i>	0,7945790096	0,8522686763	-0,10	No
1033	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD	P55135	RLMD	<i>rlmD</i>	0,7945643792	0,8530788102	-0,11	No
1034	UDP-glucose 6-dehydrogenase	P76373	UDG	<i>ugd</i>	0,7941008427	0,8534080831	-0,03	No
1035	Transcriptional regulatory protein YehT	P0AFT5	YEHT	<i>yehT</i>	0,7988459859	0,8551897124	0,07	No
1036	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	P0A6H1	CLPX	<i>clpX</i>	0,8038147411	0,8596783138	0,04	No
1037	Uncharacterized protein YeiR	P33030	YEIR	<i>yeiR</i>	0,8122262599	0,8670006705	-0,05	No
1038	UPF0253 protein YaeP	P0A8K5	YAEP	<i>yaeP</i>	0,8116020411	0,8671697797	-0,07	No
1039	Nucleoside permease NupC	P0AFF2	NUPC	<i>nupC</i>	0,8158178652	0,8699963375	0,17	No
1040	DNA translocase FtsK	P46889	FTSK	<i>ftsK</i>	0,8192297722	0,8719563762	0,10	No
1041	Phosphoserine phosphatase	P0AGB0	SERB	<i>serB</i>	0,8190383713	0,8725908802	-0,06	No
1042	Galactose/methyl galactoside import ATP-binding protein MglA	P0AAG8	MGLA	<i>mglA</i>	0,8210605716	0,8730663276	0,11	No
1043	50S ribosomal protein L17	P0AG44	RL17	<i>rplQ</i>	0,822549056	0,8738105024	-0,14	No
1044	Oxidoreductase UcpA	P37440	UCPA	<i>ucpA</i>	0,8263241863	0,8769800751	0,05	No
1045	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	P0A944	RIMI	<i>rimI</i>	0,8302361994	0,8786071719	-0,11	No
1046	Phosphatase NudJ	P0AEI6	NUDJ	<i>nudJ</i>	0,8297329859	0,8789140998	-0,06	No
1047	Anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	P77570	ANMK	<i>anmK</i>	0,8292767743	0,8792714507	0,07	No
1048	Ribosomal protein S12 methylthiotransferase accessory factor YcaO	P75838	YCAO	<i>ycaO</i>	0,8343331215	0,8795823964	0,05	No
1049	Molybdopterin molybdenumtransferase	P12281	MOEA	<i>moeA</i>	0,8343016856	0,8803869216	-0,07	No
1050	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	P0A6Q6	FABZ	<i>fabZ</i>	0,8341977995	0,8811164555	-0,07	No
1051	ATP-dependent DNA helicase RecG	P24230	RECG	<i>recG</i>	0,8338616954	0,8816018688	-0,06	No
1052	30S ribosomal protein S4	P0A7V8	RS4	<i>rpsD</i>	0,8377597429	0,8823553186	0,06	No
1053	NMN amidohydrolase-like protein YfaY	P77808	CINAL	<i>yfaY</i>	0,8461805928	0,8895332987	0,04	No
1054	Lysine decarboxylase, constitutive	P52095	DCLZ	<i>ldcC</i>	0,8484421038	0,8902214499	-0,07	No
1055	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB	P24228	DACB	<i>dacB</i>	0,8461179592	0,8903121546	0,11	No
1056	tRNA (guanine-N(1))-methyltransferase	P0A873	TRMD	<i>trmD</i>	0,8480272297	0,8906295455	0,09	No
1057	Adenylosuccinate lyase	P0A889	PURS	<i>purB</i>	0,852310978	0,8934347811	-0,05	No
1058	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	P06992	RSMA	<i>rsmA</i>	0,8554721643	0,8950549179	0,03	No
1059	Outer membrane protein assembly factor BamC	P0A903	BAMC	<i>bamC</i>	0,8546992586	0,8950914731	0,08	No
1060	Ribose-5-phosphate isomerase A	P0A7Z0	RPIA	<i>rpiA</i>	0,8572549517	0,8960740438	-0,07	No
1061	RNA polymerase sigma factor RpoD	P00579	RPOD	<i>rpoD</i>	0,864675504	0,9029787544	-0,05	No
1062	GMP/IMP nucleotidase YrfG	P64636	YRFG	<i>yrfG</i>	0,8666342638	0,9041720944	-0,04	No
1063	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	P0AET8	HDHA	<i>hdhA</i>	0,8683674786	0,9051280962	-0,09	No
1064	Penicillin-binding protein 1A	P02918	PBPA	<i>mrcA</i>	0,8738842869	0,910022359	0,06	No
1065	Phosphoethanolamine transferase EptC	P0CB39	EPTC	<i>eptC</i>	0,8779309886	0,9133779675	0,05	No
1066	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	P0A746	MSRB	<i>msrB</i>	0,8809581636	0,9156675846	0,05	No
1067	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP	P0ACJ8	CRP	<i>crp</i>	0,8837470562	0,9177054176	0,03	No
1068	DNA polymerase III subunit delta'	P28631	HOLB	<i>holB</i>	0,8862062689	0,9193975149	0,05	No
1069	30S ribosomal protein S18	P0A7T7	RS18	<i>rpsR</i>	0,891287128	0,9229403157	-0,04	No
1070	HTH-type transcriptional repressor ComR	P75952	COMR	<i>comR</i>	0,8906616062	0,9231553411	0,06	No
1071	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	P62623	ISPH	<i>ispH</i>	0,896272694	0,9272363632	0,04	No
1072	Protoporphyrin diacylglyceryl transferase	P60955	LGT	<i>lgt</i>	0,9021114024	0,9324061883	-0,07	No
1073	Transcriptional regulatory protein BasR	P30843	BASR	<i>basR</i>	0,9039180605	0,9334028062	0,03	No
1074	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L	P75864	RLMKL	<i>rlmL</i>	0,9058013028	0,9344765768	0,02	No
1075	tRNA-dihydrouridine synthase A	P32695	DUSA	<i>dusA</i>	0,9069267975	0,934767341	-0,03	No
1076	Putative ABC transporter arginine-binding protein 2	P30859	ARTI	<i>artI</i>	0,9087672704	0,9357938063	0,03	No
1077	HTH-type transcriptional regulator GntR	P0ACP5	GNTR	<i>gntR</i>	0,9106666589	0,9368789768	-0,03	No
1078	Sugar phosphatase YfbT	P77625	YFBT	<i>yfbT</i>	0,9126547672	0,9380533228	-0,05	No
1079	Negative modulator of initiation of replication	P0AFY8	SEQA	<i>seqA</i>	0,9151823605	0,9389093106	-0,05	No
1080	Uncharacterized protein YciO	P0AFR4	YCIO	<i>yciO</i>	0,9143356451	0,9389100044	0,02	No
1081	UvrABC system protein B	P0ASF8	UVRB	<i>uvrB</i>	0,9201989809	0,9431826742	-0,02	No
1082	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	Q46851	GPR	<i>gpr</i>	0,9236920711	0,9458879989	0,02	No
1083	HTH-type transcriptional regulator FrlR	P45544	FRLR	<i>frlR</i>	0,9275459914	0,948957487	0,04	No
1084	Methylglyoxal synthase	P0A731	MGSA	<i>mgsA</i>	0,9296949636	0,9502786159	0,03	No
1085	Proline/betaine transporter	P0C0L7	PROP	<i>proP</i>	0,933157523	0,9529387423	0,04	No
1086	DNA-binding protein StpA	P0ACG1	STPA	<i>stpA</i>	0,9363909239	0,9536039924	0,03	No
1087	PTS system fructose-specific EIIBC component	P20966	PTFBC	<i>fruA</i>	0,9358607342	0,9539408404	0,03	No
1088	50S ribosomal protein L2	P60422	RL2	<i>rplB</i>	0,9355829055	0,954535782	0,03	No
1089	NTE family protein RssA	P0AFR0	RSSA	<i>rssA</i>	0,9462615021	0,9610061818	0,03	No
1090	Endoribonuclease YbeY	P0A898	YBEY	<i>ybeY</i>	0,9446687516	0,9611505755	0,02	No
1091	Glutamate-pyruvate aminotransferase AlaC	P77434	ALAC	<i>alaC</i>	0,9456890404	0,9613059236	-0,01	No
1092	UPF0339 protein YegP	P76402	YEGP	<i>yegP</i>	0,9493795027	0,9632898251	-0,03	No
1093	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase 2	P61887	RMLA2	<i>rmlA2</i>	0,9512519645	0,9643066576	-0,02	No
1094	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	P67910	HLDD	<i>hldD</i>	0,9557684433	0,9679994837	0,01	No
1095	Chorismate pyruvate-lyase	P26602	UBIC	<i>ubiC</i>	0,9589371301	0,9703217719	-0,01	No
1096	50S ribosomal protein L30	P0AG51	RL30	<i>rplM</i>	0,9652421749	0,9758105199	0,01	No
1097	UPF0225 protein YehJ	P37052	YCHJ	<i>yehJ</i>	0,9667869135	0,9764812217	-0,02	No
1098	Transcriptional regulatory protein BaeR	P69228	BAER	<i>baeR</i>	0,9676949173	0,9765081679	-0,01	No
1099	Integration host factor subunit beta	P0A6Y1	IHFβ	<i>ihfB</i>	0,9782679143	0,9862792075	-0,01	No
1100	Leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase	P0A8P1	LFTR	<i>aat</i>	0,9818276109	0,9871733147	0,01	No
1101	Pyruvate dehydrogenase [ubiquinone]	P07003	POXB	<i>poxB</i>	0,9810433538	0,9872806866	0,00	No
1102	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P0A9Q7	ADHE	<i>adhE</i>	0,9804419095	0,9875723961	-0,01	No
1103	HTH-type transcriptional repressor NemR	P67430	NEMR	<i>nemR</i>	0,9849065674	0,989371239	-0,01	No
1104	Glutamate racemase	P22634	MURI	<i>murI</i>	0,995353851	0,995353851	0,00	No
1105	Protein-export protein SecB	P0AC86	SECB	<i>secB</i>	0,9940383887	0,9958359264	0,00	No
1106	Protein Bola	P0ABE2	BOLA	<i>bolA</i>	0,9951987558	0,996097761	0,00	No
1107	Uncharacterized protein YniA	P77739	YNIA	<i>yniA</i>	0,9935960702	0,9962936161	0,00	No
1108	Phosphopentomutase	P0A6K6	DEOB	<i>deoB</i>	0,9927411396	0,9963380278	0,00	No

**ANEXO 4:** Nivel de expresión de las proteínas celulares asociadas a las VLPs del NiV en diferentes células y tejidos. Identificador único y estable en la base de datos UniProtKB (Entry) e identificador mnemotécnico o nombre de la proteína para una entrada de UniProtKB sin el organismo al que pertenece “\_HUMAN” (Proteína).

Leyenda: “A” = Alto, “M” = Medio, “B” = Bajo y “-” = Sin datos.

Entry	O00560	P53985	P61026	P14174	P61006	Q01650	O43657	P21926	Q13501	P61106	Q9H444	P08754	P61586	P51148	Q9Y696	P30626	Q969P0	
Proteína	SDCB1	MOT1	RAB10	MIF	RAB8A	LAT1	TSN6	CD9	SQSTM	RAB14	CHM4B	GNAI3	RHOA	RAB5C	CLIC4	SORCN	IGSF8	
Tejido	Tipo celular																	
Amígdala	Células germinales centrales	A	B	M	M	-	M	-	B	A	-	B	B	B	M	B	-	-
	Células germinales no centrales	-	-	M	B	-	M	-	M	-	B	-	M	M	-	-	-	-
Bazo	Células escamosas epiteliales	-	B	B	-	-	M	A	-	A	B	B	-	B	M	-	-	-
	Células en la pulpa roja	M	-	B	B	-	M	-	M	M	-	M	-	B	M	-	-	B
Bronquio	Células en la pulpa blanca	B	B	B	B	-	M	-	B	M	-	M	-	B	B	-	-	-
	Células respiratorias epiteliales	B	B	B	M	-	A	A	M	M	M	B	-	B	M	-	-	-
Cerebelo	Células granulosas	-	-	B	B	-	M	-	-	-	M	B	M	B	M	-	B	-
	Células en capa molecular	-	-	-	-	-	B	-	-	-	B	-	M	M	B	-	B	-
Cérvix, útero	Células de Purkinje	M	-	B	B	-	M	-	-	-	B	M	M	B	M	-	-	-
	Células glandulares	B	-	-	M	-	A	A	M	B	M	B	-	B	M	-	B	-
Colon	Células escamosas epiteliales	-	-	M	-	-	B	A	A	A	-	B	-	-	-	-	-	-
	Células endoteliales	M	-	M	B	-	M	-	M	B	M	B	-	B	-	M	-	-
Corazón músculo	Células glandulares	M	A	M	M	-	A	M	A	M	A	M	B	B	M	-	A	-
	Nervios/ganglios periféricos	A	-	B	-	-	A	-	A	M	M	M	M	-	B	-	-	-
Córtez cerebral	Miocytes	M	M	B	-	-	A	-	-	-	M	M	M	B	M	-	-	B
	Células endoteliales	-	A	B	M	-	M	-	M	-	-	-	-	M	B	M	-	-
Duodeno	Células gliales	-	-	B	B	-	-	-	B	-	B	-	B	B	B	-	A	-
	Células neuronales	M	-	-	M	-	M	M	-	-	M	M	M	M	B	-	A	-
Endometrio 1	Neuropilo	B	-	M	B	-	M	-	M	-	M	M	M	B	B	-	-	A
	Células glandulares	B	A	A	M	-	A	B	B	M	A	A	M	M	M	-	B	-
Endometrio 2	Células estromales del endometrio	B	M	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	M	B	B	-	-
	Células glandulares	B	A	M	M	-	B	A	M	M	A	M	-	B	M	-	M	-
Epidídimo	Células estromales del endometrio	B	B	B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	B	-	B	-	-
	Células glandulares	M	A	B	A	-	M	A	B	M	A	M	-	B	B	-	M	-
Esófago	Células glandulares	B	A	B	M	-	M	M	M	M	A	B	B	B	M	M	B	-
	Células escamosas epiteliales	-	M	A	-	-	A	A	M	A	A	M	-	-	-	-	-	-
Estómago 1	Células glandulares	M	A	M	M	-	A	M	M	A	M	M	M	M	M	-	-	-
	Células glandulares	M	A	M	M	-	A	M	B	A	M	A	-	M	M	-	B	-
Estómago 2	Glándula paratiroides	-	B	M	M	-	A	M	A	M	M	B	-	B	M	-	-	-
	Glándula salival	M	-	M	B	-	A	M	A	M	A	-	-	B	M	M	-	-
Hígado	Glándula tiroidea	-	-	M	M	-	M	M	M	M	A	M	-	M	M	-	B	-
	Células del conducto biliar	-	-	B	M	-	-	M	-	-	B	-	-	-	M	-	-	-
Hipocampo	Hepatocitos	B	M	M	B	-	M	-	-	B	B	B	-	-	M	-	-	B
	Células gliales	-	-	B	-	-	-	-	B	-	-	-	-	B	M	-	-	A
Intestino delgado	Células neuronales	M	-	B	M	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	A	-
	Células glandulares	B	M	A	B	-	A	M	A	M	A	A	B	B	M	-	M	-
Mucosa oral	Células escamosas epiteliales	-	B	M	B	-	M	M	A	A	-	B	-	-	M	-	-	-
	Células glandulares	M	A	M	M	-	A	M	M	A	M	M	M	M	M	-	-	-
Músculo liso	Células glandulares	M	A	M	M	-	A	M	B	A	M	A	-	M	M	-	B	-
	Células del músculo liso	B	M	B	-	-	A	-	M	M	B	B	-	B	-	B	-	-
Músculo esquelético	Miocytes	-	B	M	-	-	M	-	-	A	B	B	-	B	B	-	-	B
	Células respiratorias epiteliales	B	-	B	M	-	M	A	A	M	A	M	-	M	-	-	M	-
Nasofaringe	Células glandulares	M	M	B	B	-	B	-	-	M	B	M	-	B	M	-	-	-
	Células germinales centrales	M	M	B	B	-	B	-	-	M	B	M	-	B	M	-	-	-
Nodo linfode	Células germinales no centrales	B	-	B	-	-	B	-	-	M	B	M	-	M	M	-	-	-
	Células gliales	B	-	-	-	-	-	-	M	-	B	-	-	M	B	-	A	-
Núcleo caudado	Células neuronales	M	-	B	B	-	B	-	-	-	M	M	M	-	M	-	A	-
	Células estromales del ovario	-	-	B	M	-	-	-	B	-	-	-	-	B	B	-	B	-
Ovario	Células foliculares	-	-	-	-	-	M	-	M	M	B	B	-	-	B	-	-	-
	Células glandulares exocrinas	B	-	M	M	-	M	M	M	A	M	M	-	B	-	-	-	-
Páncreas	Islotes de Langerhans	B	-	A	M	-	M	B	M	B	M	M	M	M	M	-	-	-
	Fibroblastos	-	-	M	-	-	B	-	A	B	-	-	-	-	-	-	-	-
Piel 1	Queratinocitos	-	-	M	B	-	M	A	A	M	B	B	-	-	-	-	-	-
	Langerhans	-	-	M	-	-	M	-	A	-	M	-	-	-	-	-	-	-
Piel 2	Melanocitos	A	-	M	B	-	B	-	A	M	B	-	-	M	-	-	-	-
	Células epidérmicas	M	M	M	B	-	M	M	M	M	M	M	-	-	M	-	-	-
Placenta	Células deciduales	-	M	M	-	-	-	B	-	M	M	B	-	B	M	B	M	-
	Células trofoblásticas	B	M	B	M	-	M	A	-	A	A	M	-	M	M	-	-	-
Próstata	Células glandulares	B	A	M	A	-	M	M	A	M	M	M	-	B	M	-	-	-
	Macrófagos	M	B	M	M	-	M	-	A	B	M	B	M	M	M	-	-	M
Pulmón	Neumocitos	-	-	B	-	-	-	B	A	B	B	-	-	B	M	-	-	-
	Células glandulares	B	M	M	B	-	A	M	A	M	A	M	B	M	M	-	A	-
Recto	Células glomerulares	B	-	B	M	-	-	-	M	B	-	B	-	B	B	-	-	-
	Células tubulares	B	M	M	A	-	A	M	A	M	M	M	-	B	M	A	-	-
Tejido blando 1	Adipocitos	-	-	-	-	-	-	-	-	B	M	-	-	M	-	-	-	-
	Fibroblastos	-	-	M	-	-	B	-	A	B	A	-	-	-	B	-	-	-
Tejido blando 2	Nervios periféricos	M	-	-	-	-	-	-	A	-	M	-	-	-	B	-	-	-
	Condrocitos	-	-	M	-	-	B	-	M	-	-	B	-	-	-	-	-	A
Testículo	Nervios periféricos	-	-	M	-	-	-	-	A	-	M	-	-	B	B	M	-	-
	Adipocitos	-	-	-	M	-	-	-	-	B	M	-	-	M	-	-	-	-
Trompas de Falopio	Fibroblastos	-	-	M	B	-	-	-	M	B	B	-	-	-	M	-	-	-
	Condrocitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-
Vagina	Células de los túbulos seminíferos	B	A	M	M	-	M	B	M	M	M	M	-	M	M	-	-	-
	Células de Leydig	B	B	M	M	-	A	B	M	A	B	M	M	B	M	B	M	-
Vesícula biliar	Células glandulares	-	M	M	M	-	A	A	A	M	M	M	B	B	M	-	A	-
	Células escamosas epiteliales	-	B	B	B	-	B	-	A	A	A	M	B	-	-	M	-	-
Vesícula seminal	Células uroteliales	B	B	M	M	-	A	A	A	A	M	B	-	M	M	-	M	-
	Células glandulares	M	M	M	M	-	A	M	-	A	A	M	M	B	M	-	-	-
Vesícula seminal	Células glandulares	B	-	B	-	-	M	A	A	M	M	B	B	B	M	B	-	B

Entry		P02786	P07741	O75131	Q92783	Q9P2B2	P08133	P16152	P00492	Q15043	Q15181	Q53EZ4	P13797	P54577	Q9H0H5	Q12846	Q92597	Q5JWF2	
Proteína		TFR1	APT	CPNE3	STAM1	FPRP	ANXA6	CBR1	HPRT	S39AE	IPYR	CEP55	PLST	SYYC	RGAP1	STX4	NDRG1	GNAS1	
Tejido	Tipo celular																		
Amígdala	Células germinales centrales	M	B	-	M	-	M	-	M	B	M	-	A	A	M	A	-	-	
	Células germinales no centrales	B	M	-	-	-	A	-	M	M	A	-	M	A	-	A	B	-	
	Células escamosas epiteliales	M	-	-	M	B	-	A	A	M	M	B	A	M	M	A	A	M	
Bazo	Células en la pulpa roja	-	B	M	-	-	B	-	B	M	B	-	M	M	-	M	B	B	
	Células en la pulpa blanca	-	M	-	-	-	M	-	-	-	M	-	M	M	-	M	-	-	
Bronquio	Células respiratorias epiteliales	B	-	M	M	A	B	A	A	-	A	-	M	A	-	M	M	B	
	Células granulosa	B	-	-	M	-	M	A	M	B	M	-	M	B	-	M	M	-	
Cerebelo	Células en capa molecular	-	-	-	B	-	-	M	A	M	A	-	-	M	-	B	B	-	
	Células de Purkinje	M	B	-	B	-	A	B	A	M	A	B	M	A	-	-	M	B	
	Células glandulares	-	B	B	M	A	B	M	A	-	A	-	M	M	-	M	B	B	
Cérvix, útero	Células escamosas epiteliales	B	-	-	B	-	-	M	A	B	A	-	M	M	M	-	A	B	
	Células endoteliales	-	-	M	B	M	B	B	-	M	M	M	M	B	-	B	M	-	
	Células glandulares	M	-	A	M	M	-	A	A	A	A	M	B	A	M	A	A	A	
Corazón músculo	Nervios/ganglios periféricos	-	-	M	A	-	M	B	A	A	M	B	B	M	-	-	M	-	
	Miocytes	B	-	M	B	M	M	-	-	B	B	-	B	B	-	-	M	B	
	Células endoteliales	M	B	M	B	-	-	M	-	M	M	-	M	B	-	-	B	-	
Córtex cerebral	Células gliales	-	-	B	M	-	-	A	A	M	M	-	-	M	-	-	A	M	
	Células neuronales	B	-	M	M	B	M	B	A	M	M	B	B	A	-	-	A	M	
Duodeno	Neuropilo	-	B	B	M	M	B	A	M	M	B	-	B	-	-	M	M	A	
	Células glandulares	M	-	A	M	B	-	A	M	A	M	M	M	A	M	A	A	A	
Endometrio 1	Células estromales del endometrio	-	-	B	-	-	M	-	-	M	-	-	M	M	-	M	B	-	
	Células glandulares	B	M	M	M	A	B	M	A	M	A	-	M	M	B	M	M	-	
Endometrio 2	Células estromales del endometrio	-	-	M	-	-	M	-	-	B	-	-	B	M	-	M	B	-	
	Células glandulares	B	B	A	M	M	B	M	M	A	M	A	-	M	M	B	M	M	
	Células glandulares	B	M	M	M	M	M	A	A	M	A	B	A	M	B	M	M	B	
Epidídimo	Células escamosas epiteliales	M	B	B	M	M	-	A	A	M	M	B	M	M	M	A	A	M	
Esófago	Células glandulares	B	-	M	M	M	-	A	B	A	M	B	A	A	M	A	A	M	
	Células glandulares	B	-	A	M	M	-	A	M	M	M	-	A	A	M	A	A	M	
Glándula paratiroides	Glándula paratiroides	B	B	M	M	M	M	B	M	-	A	B	-	M	-	B	A	-	
	Glándula salival	-	M	M	M	M	-	M	M	M	M	-	M	M	-	M	M	-	
Glándula tiroides	Células glandulares	-	M	A	M	B	M	A	M	M	M	B	M	M	-	M	M	B	
	Células del conducto biliar	-	-	M	B	M	-	B	M	M	M	-	M	B	-	M	A	B	
Hígado	Hepatocitos	B	M	A	M	B	M	A	M	M	M	-	M	B	-	B	B	B	
	Células gliales	-	-	-	-	-	-	A	-	B	B	-	-	M	-	-	A	-	
	Células neuronales	M	B	B	M	M	M	B	A	M	M	-	B	M	-	-	M	-	
Intestino delgado	Células glandulares	B	-	A	M	B	-	A	A	A	M	M	M	M	M	A	A	A	
	Células escamosas epiteliales	M	-	A	M	B	-	A	-	M	M	-	M	M	M	M	M	B	
Mucosa oral	Células del músculo liso	B	-	M	B	B	A	B	M	B	B	B	B	B	-	B	B	-	
Músculo esquelético	Miocytes	-	-	M	-	-	B	-	-	-	B	B	B	B	-	B	-	-	
Nasofaringe	Células respiratorias epiteliales	B	-	-	M	A	B	M	A	M	M	-	M	A	B	-	A	B	
	Células germinales centrales	M	B	-	B	-	M	-	M	B	M	-	A	A	M	A	-	-	
Nodo linfoide	Células germinales no centrales	-	M	-	-	-	A	B	M	M	A	B	M	A	B	A	B	-	
	Células gliales	-	-	B	B	-	-	A	A	B	M	-	-	M	-	-	A	-	
Ovario	Células neuronales	B	-	M	B	B	M	B	A	M	M	B	-	A	-	-	M	B	
	Células estromales del ovario	B	-	M	-	-	M	M	-	B	M	-	B	M	-	M	A	-	
	Células foliculares	B	M	M	B	-	-	B	-	M	A	-	-	M	-	B	-	-	
Páncreas	Células glandulares exocrinas	B	-	M	M	M	B	B	M	M	A	-	A	A	-	M	B	M	
	Islotes de Langerhans	B	-	A	M	-	A	B	M	M	B	-	B	B	-	M	A	B	
Piel 1	Fibroblastos	-	-	-	B	M	M	-	-	M	B	-	M	M	-	M	M	-	
	Queratinocitos	B	B	M	M	M	B	A	A	M	B	B	M	M	M	M	M	-	
	Langerhans	M	B	B	M	-	B	A	A	M	-	-	M	M	-	M	M	M	
Piel 2	Melanocitos	B	B	B	M	-	M	A	A	M	-	B	M	M	-	B	M	-	
	Células epidérmicas	M	B	B	M	M	-	A	A	M	M	B	A	M	M	M	A	M	
Placenta	Células deciduales	M	B	M	M	-	B	-	-	M	A	B	A	M	-	B	M	B	
	Células trofoblásticas	A	B	M	M	A	A	M	M	B	M	-	-	A	M	M	M	M	
Próstata	Células glandulares	B	M	M	B	M	B	A	M	A	M	-	B	M	-	M	A	B	
	Macrófagos	M	-	M	M	B	M	B	M	M	B	M	A	-	M	M	B	B	
Pulmón	Neumocitos	-	-	B	-	-	M	B	-	B	A	-	M	M	-	M	M	-	
	Células glandulares	M	-	M	M	M	-	M	A	A	A	M	M	A	M	A	A	M	
Riñón	Células glomerulares	-	-	B	B	-	M	-	B	M	-	-	M	B	M	B	M	B	
	Células tubulares	M	M	M	M	B	M	A	A	A	A	B	A	M	M	A	A	M	
	Adipocitos	-	-	B	B	-	B	-	-	M	B	-	M	B	-	-	M	-	
Tejido blando 1	Fibroblastos	-	-	B	-	M	-	B	-	M	-	-	M	B	-	-	B	-	
	Nervios periféricos	-	B	M	-	-	B	B	-	B	M	-	-	B	-	-	M	-	
	Condrocitos	-	-	B	-	B	M	-	B	-	-	-	-	A	M	-	-	-	
Tejido blando 2	Nervios periféricos	B	B	M	-	-	-	B	M	-	-	-	-	M	B	-	-	-	
	Adipocitos	-	-	B	B	-	M	-	-	M	-	-	-	B	-	-	M	-	
	Fibroblastos	-	B	M	-	-	B	-	-	M	-	-	-	B	-	B	M	-	
Testículo	Condrocitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Células de los túbulos seminíferos	M	B	M	M	-	A	B	A	A	A	M	M	A	A	M	A	M	
	Células de Leydig	B	M	A	M	M	M	A	M	A	A	M	A	M	-	-	B	B	
Trompas de Falopio	Células glandulares	M	M	M	M	B	B	M	A	A	-	M	M	B	M	A	A	B	
	Células escamosas epiteliales	M	-	B	B	M	-	M	A	M	M	-	M	M	-	M	A	M	
Vagina	Células uroteliales	M	M	M	M	M	-	M	B	M	A	B	M	A	M	A	A	B	
Vesícula biliar	Células glandulares	B	M	M	M	M	-	A	M	M	A	B	M	M	B	A	A	A	
Vesícula seminal	Células glandulares	-	M	M	M	M	M	M	M	A	M	B	A	M	-	M	A	B	

Entry		Q5ZPR3 O60637 P31939 P06744 P49006 P08243 P61158 P28072 O14964 Q81V08 Q92542 P49588 Q99961 Q99615 P52209 Q9Y6G9 O00186																
Proteína		CD276	TSN3	PUR9	G6P1	MRP	ASNS	ARP3	P5B6	HGS	PLD3	NICA	SYAC	SH3G1	DNJC7	6PGD	DC1L1	STXB3
Tejido	Tipo celular																	
Amígdala	Células germinales centrales	M	-	A	B	-	A	A	M	-	M	-	M	M	M	B	M	B
	Células germinales no centrales	B	-	A	B	A	B	A	M	-	M	-	B	M	B	B	M	-
	Células escamosas epiteliales	M	-	A	M	B	-	M	M	B	M	M	A	M	A	M	M	B
Bazo	Células en la pulpa roja	B	-	M	M	M	-	M	M	-	A	B	M	-	B	A	B	-
	Células en la pulpa blanca	-	M	A	B	A	-	M	M	-	M	-	B	-	B	B	M	-
Bronquio	Células respiratorias epiteliales	M	M	A	M	B	-	M	M	B	B	M	M	M	M	M	M	M
	Células granulosas	B	B	-	B	M	-	M	M	B	B	-	-	-	B	B	M	M
Cerebelo	Células en capa molecular	-	A	-	M	B	B	-	A	B	M	-	-	-	B	-	A	B
	Células de Purkinje	-	A	M	M	M	A	M	A	M	B	M	M	B	B	-	A	-
Cérvix, útero	Células glandulares	M	-	M	B	M	M	B	M	B	M	M	-	M	M	B	-	-
	Células escamosas epiteliales	M	-	M	B	-	-	M	M	B	B	M	B	A	M	M	M	-
Colon	Células endoteliales	M	-	B	M	-	B	M	B	-	B	B	B	M	B	-	M	A
	Células glandulares	M	M	A	M	A	B	M	M	M	-	B	M	A	M	M	M	A
Corazón músculo	Nervios/ganglios periféricos	M	M	B	B	M	-	-	M	B	A	M	-	M	M	B	M	B
	Miocytes	-	M	M	M	-	B	M	M	M	M	-	B	M	M	-	-	-
Córtex cerebral	Células endoteliales	-	B	B	B	-	-	M	B	-	B	-	B	M	-	B	B	B
	Células gliales	B	M	B	-	M	-	B	M	B	B	B	B	B	B	-	B	B
Duodeno	Células glandulares	M	B	A	M	A	B	M	A	M	B	M	M	M	M	M	M	B
	Células estromales del endometrio	M	-	-	B	M	-	B	B	-	-	-	-	M	-	-	-	-
Endometrio 1	Células glandulares	M	-	A	M	A	-	M	M	B	B	M	M	M	B	M	M	B
	Células estromales del endometrio	B	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	B	-	-	-	-
Endometrio 2	Células glandulares	M	-	A	M	A	-	M	M	M	B	B	M	B	M	M	A	M
	Células glandulares	M	M	A	M	M	M	M	M	B	A	M	B	M	B	M	M	M
Epidídimo	Células glandulares	M	M	A	M	M	M	M	M	B	A	M	B	M	B	M	M	M
Esófago	Células escamosas epiteliales	M	-	M	M	B	B	B	M	B	B	M	M	A	M	A	M	M
Estómago 1	Células glandulares	M	M	A	M	M	A	A	M	M	B	M	M	M	M	M	M	M
	Células glandulares	M	B	A	M	A	M	A	M	M	B	M	M	B	M	M	B	B
Estómago 2	Células glandulares	M	B	A	M	A	M	A	M	M	B	M	M	B	M	M	M	B
	Células glandulares	M	-	A	M	-	-	M	M	M	B	B	B	B	M	B	M	B
Glándula paratiroidea	Células glandulares	B	B	M	M	M	M	M	M	B	B	B	M	A	B	M	M	B
Glándula salival	Células glandulares	B	A	M	M	A	-	M	A	M	M	B	M	M	M	M	M	B
	Células glandulares	B	-	B	-	A	-	B	M	-	-	M	M	-	B	B	B	-
Hígado	Células del conducto biliar	M	-	-	M	-	-	A	-	B	M	-	-	M	M	-	B	B
	Hepatocitos	M	-	-	M	-	-	A	-	B	M	M	M	M	B	B	-	-
Hipocampo	Células gliales	B	M	-	B	B	-	B	B	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células neuronales	-	A	B	M	-	B	M	M	B	M	M	M	-	B	-	-	B
Intestino delgado	Células glandulares	M	M	A	M	A	-	M	M	M	B	M	M	A	M	M	M	M
Mucosa oral	Células escamosas epiteliales	M	-	A	B	B	-	B	A	B	B	-	M	A	M	M	M	B
Músculo liso	Células del músculo liso	-	-	M	-	-	-	B	M	B	B	-	B	B	B	-	B	M
Músculo esquelético	Miocytes	-	-	M	B	-	-	B	M	M	M	-	B	M	B	-	M	M
Nasofaringe	Células respiratorias epiteliales	M	B	M	B	M	-	M	M	B	B	M	M	M	M	B	M	B
Nodo linfoide	Células germinales centrales	M	-	A	B	A	M	A	-	-	M	-	M	-	M	-	M	-
	Células germinales no centrales	B	-	A	B	A	B	A	B	-	M	-	M	-	B	M	M	-
Núcleo caudado	Células gliales	B	M	B	B	B	-	M	B	B	-	-	-	B	-	-	-	-
	Células neuronales	B	A	B	M	-	M	-	A	B	M	B	M	-	B	-	M	M
Ovario	Células estromales del ovario	M	-	A	B	A	-	-	M	-	B	B	-	M	-	-	B	-
	Células foliculares	-	-	A	B	-	-	B	-	B	M	M	M	-	-	A	M	-
Páncreas	Células glandulares exocrinas	M	-	A	B	M	A	M	M	A	M	A	M	B	M	M	M	A
	Islotes de Langerhans	B	A	M	M	-	B	B	M	M	M	B	B	B	B	M	B	-
Piel 1	Fibroblastos	M	-	-	B	-	-	M	-	-	B	-	M	B	B	-	M	-
	Queratinocitos	M	-	B	B	A	-	-	M	-	B	-	B	A	M	-	M	B
Piel 2	Langerhans	-	-	-	B	A	-	-	B	-	B	-	B	A	-	-	M	B
	Melanocitos	M	-	M	B	A	-	M	-	-	B	M	M	A	M	-	M	B
Placenta	Células epidérmicas	M	-	A	B	B	B	M	M	B	B	-	M	A	M	B	M	M
	Células deciduales	M	-	A	-	B	-	A	A	B	B	B	-	A	-	A	M	B
Próstata	Células trofoblásticas	M	-	A	B	-	A	M	A	M	M	B	B	A	M	-	M	-
	Células glandulares	A	-	M	M	A	-	B	M	B	M	M	B	B	B	M	M	B
Pulmón	Macrófagos	M	M	M	M	-	-	-	A	B	A	A	M	M	M	M	M	M
	Neumocitos	B	-	-	B	B	-	M	B	-	B	B	B	B	-	-	B	-
Recto	Células glandulares	M	B	A	M	A	M	M	M	M	B	M	M	M	M	M	M	A
	Células glomerulares	-	-	A	-	M	-	M	M	B	-	B	B	B	M	M	M	-
Riñón	Células tubulares	B	B	M	M	B	-	A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	B
	Adipocitos	M	-	-	M	-	B	-	-	-	-	-	B	-	-	M	B	-
Tejido blando 1	Fibroblastos	M	-	-	B	-	-	M	-	-	-	B	-	M	M	-	B	-
	Nervios periféricos	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	B	M	B	B	B	-
Tejido blando 2	Condrocitos	M	-	M	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nervios periféricos	B	-	-	-	M	-	-	B	-	-	-	B	-	B	B	B	B
Testículo	Adipocitos	B	-	-	M	-	-	M	-	-	-	-	-	M	-	-	M	-
	Fibroblastos	B	-	-	M	-	-	M	-	-	-	-	-	M	M	-	B	-
Trompas de Falopio	Condrocitos	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	M	-
	Células de los túbulos seminíferos	B	M	A	B	A	M	M	A	M	B	A	M	M	M	A	A	B
Vagina	Células de Leydig	M	M	A	M	-	B	M	A	B	M	M	M	M	B	B	B	B
	Células glandulares	B	M	A	M	A	-	M	M	B	M	M	M	B	M	B	M	B
Vejiga urinaria	Células escamosas epiteliales	M	-	M	B	B	-	B	M	B	B	B	M	M	M	M	M	B
	Células uroteliales	M	B	A	M	A	-	A	A	B	M	B	B	A	M	M	M	B
Vesícula biliar	Células glandulares	M	M	A	M	A	M	M	A	M	M	M	M	M	M	A	M	A
	Células glandulares	M	M	-	M	A	B	M	A	B	M	M	M	M	B	M	B	-

Entry	Q02241 Q9H223 P17812 P61221 P50570 P11171 Q14254 P45974 P41250 Q9NTK5 Q96QK1 P26639 Q06210 Q99829 O00410 Q9Y678																
	Proteína	KIF23	EHD4	PYRG1	ABCE1	DYN2	41	FLOT2	UBP5	GARS	OLA1	VPS35	SYTC	GFPT1	CPNE1	IPO5	COPG1
Tejido	Tipo celular																
Amígdala	Células germinales centrales	M	M	A	A	M	-	A	M	A	A	B	M	-	M	M	M
	Células germinales no centrales	A	B	M	A	A	-	A	M	A	M	B	M	-	A	M	A
	Células escamosas epiteliales	A	-	A	A	A	-	B	B	M	A	M	M	-	B	M	M
Bazo	Células en la pulpa roja	M	-	M	M	M	-	M	-	M	M	-	M	-	M	B	M
	Células en la pulpa blanca	M	B	M	M	A	-	A	B	M	M	-	M	-	A	M	M
Bronquio	Células respiratorias epiteliales	A	-	A	M	M	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	A
	Células granulosas	M	-	A	M	B	-	B	-	M	M	M	M	-	-	B	M
Cerebelo	Células en capa molecular	M	-	A	M	-	-	A	M	A	M	M	-	-	-	B	M
	Células de Purkinje	M	-	A	A	-	-	B	A	M	A	M	A	-	-	M	M
Cérvix, útero	Células glandulares	M	-	A	M	M	-	M	B	M	M	M	M	-	-	B	A
	Células escamosas epiteliales	M	-	-	M	M	-	B	M	B	M	-	M	-	-	-	M
Colon	Células endoteliales	A	A	A	M	M	-	M	B	M	M	M	M	-	-	B	M
	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	M	B	M	A	A	M	-	M	B	A
Corazón músculo	Nervios/ganglios periféricos	A	-	A	B	-	-	A	-	M	B	-	M	-	-	M	A
	Miocitos	M	B	A	M	M	-	B	M	M	B	M	B	-	M	-	M
Córtex cerebral	Células endoteliales	-	M	M	B	M	-	M	-	M	M	M	A	-	-	B	M
	Células gliales	M	-	M	M	B	-	M	B	M	M	M	M	-	-	-	M
Duodeno	Células neuronales	M	-	M	A	B	-	A	M	M	A	M	M	-	-	B	A
	Neuropilo	B	-	M	M	B	-	M	-	M	M	M	M	-	-	M	B
Endometrio 1	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	M	B	M	A	A	M	-	M	B	A
	Células estromales del endometrio	A	-	M	M	M	-	B	-	M	-	B	M	-	-	-	M
Endometrio 2	Células glandulares	M	-	A	M	A	-	A	M	M	A	A	M	-	B	M	A
	Células estromales del endometrio	A	-	M	M	B	-	B	-	B	M	-	B	-	-	-	B
Epidídimo	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	B	M	M	M	M	M	-	B	B	M
	Células escamosas epiteliales	A	-	M	M	M	-	M	M	M	A	M	-	-	B	M	A
Esófago	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	B	-	M	A	M	M	-	-	-	M
	Células escamosas epiteliales	A	-	A	A	A	-	A	B	A	A	A	M	-	M	B	A
Estómago 1	Células glandulares	A	-	M	A	A	-	M	B	M	A	A	M	-	M	B	A
	Células escamosas epiteliales	A	-	A	A	A	-	A	B	A	A	A	M	-	M	B	A
Estómago 2	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	A	B	A	A	A	M	-	M	B	A
	Glándula paratiroides	A	-	A	M	-	-	M	M	M	M	A	B	-	B	M	M
Glándula salival	Células glandulares	A	-	A	A	M	-	M	-	B	M	B	M	-	M	B	A
	Células glandulares	A	B	A	A	-	-	M	M	M	M	M	M	-	M	-	A
Hígado	Células del conducto biliar	M	-	M	M	-	-	A	-	M	M	-	M	-	-	-	B
	Hepatocitos	A	-	M	M	B	-	M	B	B	M	B	M	-	-	-	A
Hipocampo	Células gliales	M	-	M	M	B	-	M	M	M	M	-	B	-	-	-	B
	Células neuronales	A	-	M	M	-	-	A	M	A	A	M	M	-	-	B	A
Intestino delgado	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	M	B	M	A	M	M	-	M	B	A
	Células escamosas epiteliales	A	B	M	A	M	-	M	B	M	M	M	M	-	-	M	A
Músculo liso	Células del músculo liso	A	M	A	B	B	-	B	-	M	M	-	M	-	M	-	B
	Miocitos	M	-	M	-	B	-	B	M	M	M	-	B	-	M	-	M
Nasofaringe	Células respiratorias epiteliales	A	-	A	M	A	-	B	B	M	M	A	M	-	M	M	A
	Células germinales centrales	M	M	M	M	M	-	A	M	M	A	-	M	-	M	M	M
Núcleo caudado	Células germinales no centrales	A	B	M	A	A	-	M	M	M	A	M	M	-	M	M	M
	Células gliales	M	-	M	M	M	-	A	B	M	A	B	B	-	-	-	M
Ovario	Células neuronales	A	-	M	M	-	-	A	M	A	A	M	M	-	-	B	A
	Células estromales del ovario	A	M	M	M	-	-	M	B	B	B	B	-	-	B	B	M
Páncreas	Células foliculares	A	-	-	A	-	-	M	M	M	A	-	M	-	M	-	-
	Células glandulares exocrinas	A	-	M	A	M	-	M	B	A	A	A	A	-	M	M	A
Piel 1	Islotes de Langerhans	A	-	B	M	B	-	M	B	M	M	M	A	-	M	B	M
	Fibroblastos	A	-	A	A	-	-	B	M	M	M	M	A	-	-	-	A
Piel 2	Queratinocitos	A	-	M	M	M	-	M	M	M	M	M	M	-	-	B	M
	Langerhans	A	-	M	M	B	-	B	-	M	M	M	M	-	-	B	M
Placenta	Melanocitos	A	-	M	M	B	-	M	M	M	M	M	M	-	-	-	M
	Células epidérmicas	A	B	M	A	M	-	M	B	M	M	M	M	-	-	-	M
Próstata	Células deciduales	A	-	A	A	-	-	M	M	M	A	M	M	-	-	-	B
	Células trofoblásticas	A	M	A	A	M	-	B	M	M	M	A	A	-	-	M	A
Pulmón	Células glandulares	M	-	M	M	M	-	A	B	M	A	M	M	-	M	B	A
	Macrófagos	M	-	A	A	B	-	M	M	M	M	A	M	-	M	B	A
Recto	Neumocitos	A	M	A	M	-	-	M	-	B	-	B	A	-	B	B	M
	Células glandulares	A	-	A	A	A	-	M	B	M	A	A	A	-	M	M	A
Riñón	Células glomerulares	A	M	B	B	B	-	M	-	B	B	M	M	-	M	-	A
	Células tubulares	A	B	A	M	A	-	M	B	M	A	M	A	-	M	M	M
Tejido blando 1	Adipocitos	A	-	M	B	-	-	B	-	B	B	M	-	-	-	-	M
	Fibroblastos	A	-	A	M	B	-	B	-	-	B	M	M	-	-	M	-
Tejido blando 2	Nervios periféricos	A	-	M	B	-	-	-	-	M	B	B	-	-	-	B	B
	Condrocitos	-	-	-	-	-	-	-	-	M	A	M	-	-	-	M	-
Testículo	Nervios periféricos	-	-	M	B	-	-	M	-	M	B	-	B	-	-	B	-
	Adipocitos	B	M	M	-	-	-	B	B	B	B	B	-	-	-	M	M
Trompas de Falopio	Fibroblastos	A	-	M	A	B	-	B	-	-	M	M	M	-	-	B	B
	Condrocitos	-	-	-	-	-	-	B	-	-	A	-	M	-	-	-	M
Vagina	Células de los túbulos seminíferos	A	B	A	A	M	-	B	A	A	A	A	M	-	B	A	M
	Células de Leydig	A	-	A	M	M	-	M	M	M	M	A	M	-	B	B	M
Vesícula biliar	Células glandulares	A	B	A	A	M	-	B	B	B	A	M	M	-	-	-	M
	Células uroteliales	A	-	M	A	A	-	A	M	M	A	A	M	-	B	B	A
Vesícula seminal	Células glandulares	A	-	M	A	A	-	M	M	A	A	A	A	-	M	M	A
	Células glandulares	M	-	A	M	M	-	M	B	M	A	M	A	-	-	B	A

## ANEXO 5

Fármacos inhibidores de las funciones celulares utilizadas por NiV que han sido analizadas en esta tesis. Análisis realizado con la base de datos DrugBank.

Proteína diana	DrugBank ID	Nombre	Estado del fármaco
Monocarboxylate transporter	DB00119	Pyruvic acid	Approved, investigational, nutraceutical
	DB00451	Levothyroxine	Approved
	DB00135	L-tyrosine	Approved, nutraceutical
	DB00150	L-tryptophan	Approved, nutraceutical, withdrawn
	DB00149	L-leucine	Approved, nutraceutical
	DB01583	Liotrix	Approved
	DB01120	L-phenylalanine	Approved, nutraceutical
	DB00279	Liothyronine	Approved, vet_approved
	DB06262	Droxidopa	Approved, investigational
	DB04398	Lactic acid	Approved, vet_approved
GTPase KRas	DB03225	D-tryptophan	Experimental
	DB07771	[(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyloxycarbonyl)-methyl]-phosphonic acid	Experimental
	DB07780	Farnesyl diphosphate	Experimental
	DB02210	Hexane-1,6-diol	Experimental
	DB03226	Trifluoroethanol	Experimental
	DB04137	Guanosine-5'-triphosphate	Experimental
	DB04315	Guanosine-5'-diphosphate	Experimental
DB08751	N,n'-dimethyl-n-(acetyl)-n'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)ethylenediamine	Experimental	

<b>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</b>	DB04315	Guanosine-5'-diphosphate	Experimental
	DB00993	Azathioprine	Approved
	DB00514	Dextromethorphan	Approved
<b>ADP-ribosylation factor-like protein 5A</b>	DB04315	Guanosine-5'-diphosphate	Experimental
<b>Large neutral amino acids transporter small subunit 2</b>	DB00120	L-phenylalanine	Approved, nutraceutical
	DB00160	L-alanine	Approved, nutraceutical
	DB00130	L-glutamine	Approved, investigational, nutraceutical
	DB02750	S-(methylmercury)-l-cysteine	Experimental
	DB01235	Levodopa	Approved
<b>Cationic amino acid transporter 3</b>	DB00125	L-arginine	Approved, nutraceutical
	DB00123	L-lysine	Approved, nutraceutical
	DB00129	Ornithine	Approved, nutraceutical
<b>Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha</b>	DB06843	2',5'-dideoxy-adenosine 3'-monophosphate	Experimental
	DB02587	Colforsin	Experimental
<b>Glutamate carboxypeptidase 2</b>	DB00089	Capromab pendetide	Approved
	DB00142	Glutamic acid	Approved, nutraceutical
	DB06928	(2s)-2-{[hydroxy(4-iodobenzyl)phosphoryl]methyl}pentanedioic acid	Experimental
	DB07754	N-({(1r)-1-carboxy-2-[(4-fluorobenzyl)sulfanyl]ethyl}carbamoyl)-l-glutamic acid	Experimental
	DB08835	Spaglamic acid	Approved
<b>Protein kinase C beta type</b>	DB01738	Phosphorylcolamine	Experimental
	DB00163	Vitamin e	Approved, nutraceutical, vet_approved
	DB08846	Ellagic acid	Investigational
	DB00675	Tamoxifen	Approved



<b>Growth factor receptor-bound protein 2</b>	DB03276	4-[(10s,14s,18s)-18-(2-amino-2-oxoethyl)-14-(1-naphthylmethyl)-8,17,20-trioxo-7,16,19-triazaspiro[5.14]icos-11-en-10-yl]benzylphosphonic acid	Experimental
	DB00061	Pegademase bovine	Approved
<b>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9</b>	DB08703	12-(2-hydroxyethyl)-2-(1-methylethoxy)-13,14-dihydronaphtho[2,1-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-5(12h)-one	Experimental
<b>Annexin A2</b>	DB00031	Tenecteplase	Approved
<b>Carbonyl reductase [NADPH] 1</b>	DB03556	2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-ethoxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy)-ethanol, polyethyleneglycol peg400	Experimental
	DB04463	3-(4-amino-1-tert-butyl-1h-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-yl)phenol	Experimental
	DB01046	Lubiprostone	Approved, investigational
	DB00414	Acetohexamide	Withdrawn
	DB03556	2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-ethoxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy)-ethanol, polyethyleneglycol peg400	Experimental
	DB04463	3-(4-amino-1-tert-butyl-1h-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-yl)phenol	Experimental
	DB00502	Haloperidol	Approved
	DB05197	Sofalcone	Investigational
	DB04844	Tetrabenazine	Approved
	DB00997	Doxorubicin	Approved, investigational
<b>Retinol dehydrogenase 8, 11, 13</b>	DB00162	Vitamin a	Approved, nutraceutical, vet_approved
<b>Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase</b>	DB00173	Adenine	Approved, nutraceutical
<b>D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase</b>	DB00157	Nadh	Nutraceutical
<b>17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6</b>	DB00139	Succinic acid	Approved, nutraceutical

<b>Dehydrogenase/reductase SDR family member 4</b>	DB04200	Matairesinol	Experimental
<b>Methionine--tRNA ligase</b>	DB02151	Methionine phosphonate	Experimental
	DB02229	5'-o-[(1-methionyl)-sulphamoyl]adenosine	Experimental
	DB03799	Trifluoromethionine	Experimental
	DB03816	Difluoromethionine	Experimental
	DB04015	Methionine phosphinate	Experimental
<b>Programmed cell death 1 ligand 1</b>	DB11595	Atezolizumab	Approved
	DB11945	Avelumab	Approved
	DB11714	Durvalumab	Approved
<b>T-lymphocyte activation antigen CD80</b>	DB01281	Abatacept	Approved
	DB04901	Galiximab	Investigational
	DB06681	Belatacept	Approved
	DB11714	Durvalumab	Approved
<b>Vascular cell adhesion protein 1</b>	DB01136	Carvedilol	Approved, investigational
	DB05399	Succinobucol	Investigational
	DB00898	Ethanol	Approved
<b>Poliovirus receptor</b>	DB08231	Myristic acid	Experimental
	DB03203	Sphingosine	Experimental
<b>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</b>	DB01700	Aica ribonucleotide	Experimental
	DB01972	Guanosine-5'-monophosphate	Experimental
	DB02309	5--monophosphate-9-beta-d-ribofuranosyl xanthine	Experimental
	DB03442	2-[5-hydroxy-3-methyl-1-(2-methyl-4-sulfo-phenyl)-1h-pyrazol-4-ylazo]-4-sulfo-benzoic acid	Experimental
	DB04057	Beta-dadf, msa, multisubstrate adduct inhibitor	Experimental
	DB00116	Tetrahydrofolic acid	Approved, nutraceutical
	DB00642	Pemetrexed	Approved, investigational
DB00563	Methotrexate	Approved	

<b>Glucose-6-phosphate isomerase</b>	DB02007	Alpha-d-glucose 6-phosphate	Experimental
	DB02076	6-phospho-d-gluconic acid	Experimental
	DB02093	5-phospho-d-arabinohydroxamic acid	Experimental
	DB02548	D-glucitol 6-phosphate	Experimental
	DB03042	5-phosphoarabinonic acid	Experimental
	DB03581	Glucose-6-phosphate	Experimental
	DB03937	Erythrose-4-phosphate	Experimental
	DB04493	Fructose-6-phosphate	Experimental
	DB09130	Copper	Approved
<b>Actin-related protein 2</b>	DB08235	N-[2-(2-methyl-1h-indol-3-yl)ethyl]thiophene-2-carboxamide	Experimental
	DB08236	(2s)-2-(3-bromophenyl)-3-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-1,3-thiazolidin-4-one	Experimental
<b>Proteasome subunit beta type-7</b>	DB08515	(3ar,6r,6as)-6-((s)-((s)-cyclohex-2-enyl)(hydroxy)methyl)-6a-methyl-4-oxo-hexahydro-2h-furo[3,2-c]pyrrole-6-carbaldehyde	Experimental
<b>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</b>	DB00160	L-alanine	Approved, nutraceutical
<b>6-phosphogluconate dehydrogenase</b>	DB02076	6-phospho-d-gluconic acid	Experimental
	DB03962	Nicotinamide 8-bromo-adenine dinucleotide phosphate	Experimental
	DB00851	Dacarbazine	Approved, investigational
	DB00789	Gadopentetate dimeglumine	Approved
	DB00920	Ketotifen	Approved
	DB00867	Ritodrine	Approved
	DB00814	Meloxicam	Approved, vet_approved
	DB00695	Furosemide	Approved, vet_approved
DB00563	Methotrexate	Approved	
<b>Centromere-associated protein E</b>	DB06097	Gsk-923295	Investigational
<b>Kinesin-like protein KIF1A</b>	DB03909	Adenosine-5'-[beta, gamma-methylene]triphosphate	Experimental

	DB04395	Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester	Experimental
<b>CTP synthase 1</b>	DB00130	L-glutamine	Approved, investigational, nutraceutical
<b>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</b>	DB00887	Bumetanide	Approved
	DB01016	Glyburide	Approved
	DB04941	Crofelemer	Approved
	DB04395	Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester	Experimental
	DB04522	Dexfosfoserine	Experimental
	DB08820	Ivacaftor	Approved
	DB01050	Ibuprofen	Approved
	DB09280	Lumacaftor	Approved
	DB09213	Dexibuprofen	Approved
DB02587	Colforsin	Experimental	
<b>ATP-binding cassette</b>	DB00864	Tacrolimus	Approved, investigational
	DB00171	Atp	Approved, investigational, nutraceutical
	DB00619	Imatinib	Approved
	DB00997	Doxorubicin	Approved, investigational
<b>Phosphatidylcholine translocator ABCB4</b>	DB01394	Colchicine	Approved
	DB06207	Silodosin	Approved
	DB06414	Etravirine	Approved
<b>Threonine--tRNA ligase</b>	DB00156	L-threonine	Approved, nutraceutical