



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Producción y marcado fluorescente de los factores de iniciación IF1 e IF3 de
Mycobacterium tuberculosis

TESIS

Para optar el título profesional de licenciado en Biología

AUTOR

Anchorena Olivari, Mario André

(ORCID: 0000-0002-1012-829X)

ASESORES

Dr. Gonzales Figueroa, Hugo Duglas Aquiles (ORCID: 0000-0003-0760-8812)

Dra. Sarabia Vega, Carla Vanessa (ORCID: 0000-0002-8950-8155)

Lima, Perú

2023

Metadatos Complementarios

Datos de autor(a):

Anchorena Olivari, Mario André

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 70689431

Datos de asesor

Gonzáles Figueroa, Hugo Douglas Aquiles

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 06610912

Datos de asesora

Sarabia Vega, Carla Vanessa

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 44043054

Datos del jurado

JURADO 1: Cruz Neyra, Lidia Luz

Número de documento de identidad: 08406252

Código ORCID: 0000-0003-3902-4280

JURADO 2: Pineda Chavarria, Roberto Christian

Número de documento de identidad: 10308965

Código ORCID: 0000-0001-9388-1342

JURADO 3: Hau Camoretti, Jorge Eduardo

Número de documento de identidad: 08758685

Código ORCID: 0000-0002-5420-7811

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.03

Código del Programa: 511206

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Mario André Anchorena Olivari, con código de estudiante N° 201711639, con (DNI o Carné de Extranjería¹) N° 70689431, con domicilio en Calle Alfa y Omega 130, dpto. 302, urb. La Calera de la Herrera distrito Surquillo, provincia y departamento de Lima y Lima.

En mi condición de bachiller en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

(El/la) presente (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación)

titulado: "Producción y marcado fluorescente de los factores de iniciación IF1 e IF3 de Mycobacterium tuberculosis"


es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Dr. Hugo Gonzales Figuerola y de la Dra. Carla Kinessa Sarabia Vaga, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; (el/la) cual ha sido sometido (a) al antiplagio Turnitin y tiene el 15 % de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación), el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro del(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 14 de DIC de 2023


Mario André Anchorena Olivari
(Nombre completo y Firma)

(N° DNI o Carné de Extranjería) 70689431


Ng. Mario Martín Pauta Galvez
Jefe Unidad Grados y Títulos
FCB

¹ Se debe colocar la opción que corresponda, realizar lo mismo en todo el texto del documento.

Producción y mercado fluorescente de los factores de iniciación IF1 e IF3 de Mycobacterium tuberculosis

INFORME DE ORIGINALIDAD

15 %

INDICE DE SIMILITUD

14 %

FUENTES DE INTERNET

3 %

PUBLICACIONES

3 %

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	5 %
2	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1 %
3	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1 %
4	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	1 %
5	patents.google.com Fuente de Internet	1 %
6	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
7	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
8	zagan.unizar.es Fuente de Internet	<1 %
9	gredos.usal.es Fuente de Internet	

<1%

10 repositorio.urp.edu.pe
Fuente de Internet

<1%

11 www.researchgate.net
Fuente de Internet

<1%

12 www.frontiersin.org
Fuente de Internet

<1%

13 cicy.repositorioinstitucional.mx
Fuente de Internet

<1%

14 bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443
Fuente de Internet

<1%

15 tesisred.net
Fuente de Internet

<1%

16 repositorio.unp.edu.pe
Fuente de Internet

<1%

17 sedici.unlp.edu.ar
Fuente de Internet

<1%

18 Niraj Kumar, Shivani Sharma, Prem S. Kaushal. "Protein synthesis in Mycobacterium tuberculosis as a potential target for therapeutic interventions", Molecular Aspects of Medicine, 2021
Publicación

<1%

repositorio.unal.edu.co

19	Fuente de Internet	<1%
20	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%
21	iris.paho.org Fuente de Internet	<1%
22	ruja.ujaen.es Fuente de Internet	<1%
23	Submitted to Pontificia Universidad Catolica de Chile Trabajo del estudiante	<1%
24	repositorio.uas.edu.mx Fuente de Internet	<1%
25	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1%
26	www.umh.es Fuente de Internet	<1%
27	research.uv.es Fuente de Internet	<1%
28	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1%
29	L. W. Rowe. "Digitalis standardization: A consideration of certain methods of biological assay", Journal of the American Pharmaceutical Association, 09/27/2006	<1%

30	Submitted to Universidad Privada San Juan Bautista Trabajo del estudiante	<1%
31	d-nb.info Fuente de Internet	<1%
32	dehesa.unex.es:8443 Fuente de Internet	<1%
33	Submitted to usmp Trabajo del estudiante	<1%
34	Submitted to Logan University Trabajo del estudiante	<1%
35	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
36	www.meridianbioscience.com Fuente de Internet	<1%
37	Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador Trabajo del estudiante	<1%
38	thesis.unipd.it Fuente de Internet	<1%
39	academica-e.unavarra.es Fuente de Internet	<1%
40	ediss.uni-goettingen.de Fuente de Internet	<1%

41	vigg.ru Fuente de Internet	< 1%
42	www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet	< 1%
43	Fabbretti, Attilio, Cheng-Guang He, Eleonora Gaspari, Sonia Maffioli, Letizia Brandi, Roberto Spurio, Margherita Sosio, Daniela Jabes, and Stefano Donadio. "A derivative of the thiopeptide GE2270A highly selective against Propionibacterium acnes", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015. Publicación	< 1%
44	plan-actions-chiropteres.fr Fuente de Internet	< 1%
45	produccioncientificaluz.org Fuente de Internet	< 1%
46	repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet	< 1%
47	www.jove.com Fuente de Internet	< 1%
48	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	< 1%
49	heb.legatechnics.com Fuente de Internet	< 1%

50	repositorio.ufrn.br Fuente de Internet	< 1%
51	www.mayoclinic.org Fuente de Internet	< 1%
52	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD Trabajo del estudiante	< 1%
53	bdigital.dgse.uaa.mx:8080 Fuente de Internet	< 1%
54	issuu.com Fuente de Internet	< 1%
55	jilupub.ub.uni-giessen.de Fuente de Internet	< 1%
56	nbn-resolving.de Fuente de Internet	< 1%
57	repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080 Fuente de Internet	< 1%
58	repositorio.uc.cl Fuente de Internet	< 1%
59	repository.unab.edu.co Fuente de Internet	< 1%
60	www.agenciaelmedio.com.ar Fuente de Internet	< 1%
61	www.eib.org Fuente de Internet	< 1%

<1%

62 www.fcs.es
Fuente de Internet

<1%

63 actbistas.org
Fuente de Internet

<1%

64 addi.ehu.es
Fuente de Internet

<1%

65 coek.info
Fuente de Internet

<1%

66 eprints.ucm.es
Fuente de Internet

<1%

67 es.scribd.com
Fuente de Internet

<1%

68 ofis.insp.mx
Fuente de Internet

<1%

69 pesquisa.bvsalud.org
Fuente de Internet

<1%

70 repositorio.unsa.edu.pe
Fuente de Internet

<1%

71 ri.unsam.edu.ar
Fuente de Internet

<1%

72 sundoc.bibliothek.uni-halle.de
Fuente de Internet

<1%

-
- 73 www.bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet <1%
-
- 74 www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet <1%
-
- 75 www.journals.uchicago.edu Fuente de Internet <1%
-
- 76 www.tratamentodeagua.com.br Fuente de Internet <1%
-
- 77 "Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function", Springer Science and Business Media LLC, 2019
Publicación <1%
-
- 78 "Producción de hidrógeno mediante reformado en fase acuosa de etanol utilizando carburos de molibdeno soportados en zirconia", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2023
Publicación <1%
-
- 79 Josep Manel Casanova Seuma, Sergio Moreno Palma, Elena Canal Garcia. "Diagnóstico diferencial y conducta a seguir ante un paciente con lesiones pigmentadas", FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria, 2023
Publicación <1%
-
- 80 academic.oup.com Fuente de Internet <1%

<1%

81

bibliotecadigital.univalle.edu.co

Fuente de Internet

<1%

82

buleria.unileon.es

Fuente de Internet

<1%

83

dokumen.pub

Fuente de Internet

<1%

84

genmolecular.com

Fuente de Internet

<1%

85

idus.us.es

Fuente de Internet

<1%

86

qdoc.tips

Fuente de Internet

<1%

87

tdx.cat

Fuente de Internet

<1%

88

wikihastags.com

Fuente de Internet

<1%

89

Anna Maria Giuliodori, Roberto Spurio, Pohl Milón, Attilio Fabbretti. "Antibiotics Targeting the 30S Ribosomal Subunit: A Lesson from Nature to Find and Develop New Drugs", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019

Publicación

<1%

90 Maria Angeles Fernández López. "Regulación de la señalización del ABA mediante mecanismos que controlan vida media y actividad de los receptores PYR/PYL", Universitat Politecnica de Valencia, 2021
Publicación <1%

91 www.dge.gob.pe
Fuente de Internet <1%

92 Ambuj Kumar Kushwaha, Shashi Bhushan. "Unique structural features of the Mycobacterium ribosome", Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2019
Publicación <1%

93 Jennifer Stiens, Yen Yi Tan, Rosanna Joyce, Kristine B. Arnvig, Sharon L. Kendall, Irene Nobeli. " Using a Whole Genome Co-expression Network to Inform the Functional Characterisation of Predicted Genomic Elements from Transcriptomic Data ", Cold Spring Harbor Laboratory, 2022
Publicación <1%

94 Translation in Mitochondria and Other Organelles, 2013.
Publicación <1%

95 idoc.pub
Fuente de Internet <1%

livrosdeamor.com.br

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

A mi familia, por siempre darme su amor sin pedir nada a cambio

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que me han otorgado y por todos los sacrificios que han realizado para poder desarrollarme como persona. Gracias por todo el amor que me han dado

A mis mentores, Vanessa Sarabia Vega, Pohl Milón Mayer y Hugo Gonzales Figueroa.

Vanessa, no hay palabras para expresar la gratitud que te tengo, por siempre estar ahí apoyándome tanto intelectual como moralmente, y por ser un pilar para el desarrollo de mi tesis. Pohl, tienes mi gratitud eterna por creer en mí y abrirme las puertas al laboratorio, gracias por enseñarme lo interesante que puede ser el mundo de los ribosomas y por mostrarme lo vasto que puede llegar a ser el conocimiento científico. Hugo, has sido un gran maestro, gracias por formarme en el profesional que soy ahora.

Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Biomoléculas de UPC. Quiero agradecer especialmente a Ana Elena Guadalupe Sánchez Castro y José Alberto Nakamoto Kuahara, ambos me guiaron con total desprendimiento en la realización de esta tesis y en mi crecimiento como científico, sin ustedes no hubiera podido terminar la tesis. También quiero mencionar al chicho Gabriel Mendoza, a Lesia Tello, Nicolle Pereira, Cesar Huallpa, Maya Townsend y Victoria Poma sin ustedes no me habría divertido tanto en el proceso; más que colegas, los considero mis amigos.

A mis compañeros de la Universidad Ricardo Palma, a todos ustedes los llevo en mi corazón y no olvidaré los buenos momentos que pasamos en nuestro desarrollo como biologuitos. Por último, quiero agradecer a todos los que me acompañaron en el proceso.

Gracias por estar ahí.

ABREVIATURAS

IF1	Factor de Iniciación 1
IF2	Factor de Iniciación 2
IF3	Factor de Iniciación 3
IF1 _{D5C}	Factor de Iniciación 1 que lleva una cisteína en la posición 5
IF3 _{D157C}	Factor de Iniciación 3 que lleva una cisteína en la posición 157
IF3 _{E166C}	Factor de Iniciación 3 que lleva una cisteína en la posición 166
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb</i> -IF1	Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb</i> -IF3	Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb</i> -IF1 _{D5C}	Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5
<i>Mtb</i> -IF3 _{D157C}	Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 157
<i>Mtb</i> -IF1 _D	Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5 y modificada con el donador de fluorescencia Alexa 488
<i>Mtb</i> -IF1 _Q	Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5 y modificada con el quencher Atto540Q
<i>Mtb</i> -IF3 _D	Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 157 y modificada con el donador de fluorescencia Alexa 488
<i>Mtb</i> -IF3 _Q	Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 157 y modificada con el quencher Atto540Q
<i>infA</i>	Gen del Factor de Iniciación 1
<i>infC</i>	Gen del Factor de Iniciación 3
<i>infA</i> _{D5C}	Gen del Factor de Iniciación 1 que lleva una cisteína en la posición 5
<i>infC</i> _{D157C}	Gen del Factor de Iniciación 3 que lleva una cisteína en la posición 157
<i>Mtb-infA</i>	Gen del Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb-infC</i>	Gen del Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb-infA</i> _{D5C}	Gen del Factor de Iniciación 1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que lleva una cisteína en la posición 5

<i>Mtb-infC</i> _{D157C}	Gen del Factor de Iniciación 3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que lleva una cisteína en la posición 157
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ec-IF1</i>	Factor de Iniciación 1 de <i>Escherichia coli</i>
<i>Ec-IF3</i>	Factor de Iniciación 3 de <i>Escherichia coli</i>
<i>Ec-IF1</i> _{D5C}	Factor de Iniciación 1 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5
<i>Ec-IF3</i> _{E166C}	Factor de Iniciación 3 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 166
<i>Ec-IF1</i> _D	Factor de Iniciación 1 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5 y modificada con el donador de fluorescencia Alexa 488
<i>Ec-IF1</i> _Q	Factor de Iniciación 1 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 5 y modificada con el quencher Atto540Q
<i>Ec-IF3</i> _D	Factor de Iniciación 3 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 166 y modificada con el donador de fluorescencia Alexa 488
<i>Ec-IF3</i> _Q	Factor de Iniciación 3 de <i>Escherichia coli</i> mutante que lleva una cisteína en la posición 166 y modificada con el quencher Atto540Q

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.3 OBJETIVOS.....	12
1.3.1 Objetivo general	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
2 MARCO TEÓRICO	13
2.1 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS BACTERIANA.....	13
2.1.1 Fase de Iniciación de la traducción.....	14
2.1.1.1 Factores de Iniciación.....	15
2.2 ANTIBIÓTICOS CONTRA LA FASE DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	17
2.3 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	18
2.3.1 Maquinaria traduccional de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
2.3.1.1 Ribosomas	18
2.3.1.2 Factores de traducción	20
2.3.2 Regulación de la traducción en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.3.2.1 Leaderless ARNm.....	21
2.3.2.2 Elementos de respuesta al estrés.....	22
3 ANTECEDENTES	23
3.1 TUBERCULOSIS	23
3.2 ESTUDIOS QUE CARACTERIZAN LA FASE DE INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS DE FRET	25
3.2.1 El rol de IF3 en la formación del complejo de iniciación	25
3.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos en la formación del complejo de iniciación	27

3.3	ESTUDIOS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS FACTORES DE INICIACIÓN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	27
4	HIPÓTESIS	28
5	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	28
5.2	TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	28
5.3	VARIABLES.....	28
5.3.1	Variable independiente.....	28
5.3.2	Variable dependiente.....	28
5.4	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	29
5.5	PROCEDIMIENTO.....	32
5.5.1	Análisis <i>in silico</i> de las secuencias y estructuras de las proteínas IF1, IF3, IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>M. tuberculosis</i>	34
5.5.1.1	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y de <i>E. coli</i>	34
5.5.1.2	Alineamiento de las estructuras tridimensionales de IF1 e IF3 de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>E. coli</i>	34
5.5.1.3	Medición de la distancia entre los sitios de marcado fluorescente de IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>M. tuberculosis</i> en el complejo de pre-iniciación 30S.....	34
5.5.2	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> con los plásmidos correspondientes a las proteínas IF1, IF1 _{D5C} , IF3, IF3 _{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
5.5.3	Producción de las proteínas IF1, IF1 _{D5C} , IF3 e IF3 _{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
5.5.3.1	Expresión proteica.....	38
5.5.3.1.1	Inducción analítica.....	38
5.5.3.1.2	Inducción preparativa.....	38
5.5.3.2	Purificación de las proteínas.....	39
5.5.4	Marcado Fluorescente de las proteínas IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>M. tuberculosis</i>	42
5.5.5	Cuantificación.....	44
5.5.5.1	Cuantificación por Bradford.....	44
5.5.5.2	Cuantificación por densitometría en geles SDS-PAGE.....	45

5.5.5.3	Cuantificación por fluorometría	46
5.5.5.4	Eficiencia del Marcado.....	46
5.5.6	Asociación de IF3 e IF1 de <i>M. tuberculosis</i> a la subunidad 30S usando un sistema heterólogo intermolecular FRET	46
5.6	RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	48
5.7	ÉTICA	48
6	RESULTADOS	49
6.1	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LAS SECUENCIAS Y ESTRUCTURAS DE LAS IF1, IF3, IF1 _{D5C} E IF3 _{D157C} DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	49
6.1.1	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y de <i>E. coli</i>	49
6.1.2	Alineamiento de las estructuras tridimensionales de IF1 e IF3 de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>E.coli</i>	50
6.1.3	Medición de la distancia entre los sitios de marcado fluorescente de IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>M. tuberculosis</i> en el complejo de pre-iniciación 30S.....	52
6.2	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> CON LOS PLÁSMIDOS CORRESPONDIENTES A LAS PROTEÍNAS IF1, IF1 _{D5C} , IF3 E IF3 _{D157C} DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> . 54	
6.3	PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS IF1, IF1 _{D5C} , IF3 E IF3 _{D157C} DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	56
6.3.1	Expresión proteica	56
6.3.1.1	Expresión analítica	56
6.3.1.2	Expresión preparativa	59
6.3.2	Purificación de las proteínas.....	60
6.4	MARCADO FLUORESCENTE DE LAS PROTEÍNAS <i>MTB</i> -IF1 _{D5C} E <i>MTB</i> -IF3 _{D157C} DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	66
6.4.1	Marcado fluorescente con Atto540Q maleimido.....	67
6.4.2	Marcado fluorescente con Alexa488 C5-maleimido.....	68
6.4.3	Eficiencia del marcado fluorescente.....	70
6.5	ASOCIACIÓN DE IF3 E IF1 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> A LA SUBUNIDAD 30S USANDO UN SISTEMA HETERÓLOGO INTERMOLECULAR FRET	71
6.5.1	Asociación de <i>Mtb</i> -IF1 _D al complejo de pre-iniciación 30S – <i>Ec</i> -IF3 _Q	73
6.5.2	Asociación de <i>Mtb</i> -IF3 _D al complejo de pre-iniciación 30S – <i>Ec</i> -IF1 _Q	73

6.5.3	Asociación de <i>Mtb</i> -IF1 _Q al complejo de pre-iniciación 30S – <i>Mtb</i> -IF3 _D	74
6.5.4	Asociación de <i>Mtb</i> -IF3 _D al complejo de pre-iniciación 30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q	75
6.5.5	Disociación de <i>Mtb</i> -IF1 _Q del complejo de pre-iniciación 30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q – <i>Mtb</i> -IF3 _D por la adición <i>Ec</i> -IF1	76
6.5.6	Disociación de <i>Mtb</i> -IF3 _D del complejo de pre-iniciación 30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q – <i>Mtb</i> -IF3 _D por la adición de <i>Ec</i> -IF3	77
6.5.7	Ajuste de la disociación de <i>Mtb</i> -IF3 _D e <i>Mtb</i> -IF1 _Q del complejo de pre- iniciación 30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q – <i>Mtb</i> -IF3 _D por la adición de <i>Ec</i> -IF1 e <i>Ec</i> -IF3	78
7	DISCUSIÓN	80
8	CONCLUSIONES	84
9	REFERENCIAS.....	85
10	CRONOGRAMA	97
11	PRESUPUESTO	98
12	ANEXOS.....	98

RESUMEN

Si bien la fase de iniciación de la síntesis de proteínas ha sido extensivamente caracterizada usando unos pocos organismos modelo, pocos estudios han estudiado directamente este proceso en el patógeno *M. tuberculosis*, sus ribosomas o factores de iniciación. Por ello, en este trabajo se produjeron y marcaron con fluorescencia los factores de iniciación IF1 e IF3 nativos y mutantes de *M. tuberculosis*, para posteriormente poder estudiar su papel en la iniciación de la traducción de *M. tuberculosis*. Células competentes de *E. coli* BL21 fueron transformadas con los plásmidos correspondientes a las proteínas *Mtb*-IF1, *Mtb*-IF1_{D5C}, *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C}. Después, se produjeron las proteínas obteniendo eficiencias de purificación de 0.78 mg/L para *Mtb*-IF1 con una pureza del 87 %, de 0.375 mg/L para *Mtb*-IF1_{D5C} con una pureza del 99 %, de 1.6 mg/L para *Mtb*-IF3 con una pureza del 80 % y de 0.57 mg/L para *Mtb*-IF3_{D157C} con una pureza del 94 %. Las proteínas *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} se marcaron con el fluoróforo Atto540Q obteniendo eficiencias de marcado del 62 % y del 74% respectivamente; estas proteínas también se marcaron con el fluoróforo Alexa488 obteniendo eficiencias de marcado del 50 % y 59 % respectivamente. Finalmente, se evaluó la asociación de los factores de iniciación marcados *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} a la subunidad 30S de *E. coli* usando un sistema heterólogo. Se determinó que ambos factores logran asociarse a la subunidad 30S de *E. coli*, con mayor afinidad y en el mismo sitio de unión al 30S que sus homólogos de *E. coli*.

ABSTRACT

While the initiation phase of protein synthesis has been extensively characterized using a few model organisms, few studies have directly studied this process in the pathogen *M. tuberculosis*, its ribosomes or initiation factors. Therefore, in this work, the native and mutant initiation factors IF1 and IF3 of *M. tuberculosis* were produced and fluorescently labeled, to later study their role in the initiation of the translation of *M. tuberculosis*. Competent *E. coli* BL21 cells were transformed with plasmids corresponding to proteins *Mtb*-IF1, *Mtb*-IF1_{D5C}, *Mtb*-IF3 and *Mtb*-IF3_{D157C}. Later, proteins were produced achieving purification efficiencies of 0.78 mg/L for *Mtb*-IF1 with a purity of 87 %, of 0.375 mg/L for *Mtb*-IF1_{D5C} with purity 99 %, of 1.6 mg/L for *Mtb*-IF3 with a purity of 80 % and of 0.57 mg/L for *Mtb*-IF3_{D157C} with a purity of 94 %. The *Mtb*-IF1_{D5C} and *Mtb*-IF3_{D157C} proteins were labeled with the Atto540Q fluorophore giving labeling efficiencies of 62 % and 74 % respectively; these proteins were also labeled with Alexa488 fluorophore giving labeling efficiencies of 50 % and 59 %, respectively. Finally, the association of the *Mtb*-IF1_{D5C} and *Mtb*-IF3_{D157C} labeled initiation factors to the 30S subunit of *E. coli* was tested, using a heterologous system. It was determined that both factors manage to associate to the 30S subunit of *E. coli*, with greater affinity and at the same 30S binding site as their *E. coli* counterparts.

1 INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es la bacteria causante de la tuberculosis (TB) (Willey et al., 2010). La OMS reporta que 1.5 millones de personas han muerto de TB en el año 2020, colocándola como una de las 13 principales causas de muerte en el mundo (OMS, 2021). Las formas de la TB resistentes a la rifampicina (RR) y multidrogoresistentes (MDR), son responsables por aproximadamente un quinto de las muertes anuales por resistencia antimicrobiana (OMS, 2017). Se estima que para el 2050, la resistencia antimicrobiana ocasionará millones de muertes y pérdidas económicas billonarias (OMS, 2017). Debido a esto, es necesario buscar soluciones para el desarrollo de nuevos antibióticos y técnicas de diagnóstico para patógenos resistentes (Pai et al., 2016).

Uno de los principales blancos de los antibióticos actuales es la inhibición de la síntesis proteica (Walsh & Wencewicz, 2014); siendo la fase de iniciación una etapa con mecanismos conservados entre bacterias, pero que difieren a los de arqueas y eucariotas (Kyrpides & Woese, 1998; Londei, 2005). Actualmente pocos antibióticos inhiben selectivamente esta fase (Brandi, Fabbretti, et al., 2006; Fabbretti et al., 2011). Esto la convierte en un buen blanco para generar antibióticos de amplio espectro que sean específicos para bacterias reduciendo posibles efectos secundarios para los pacientes y que tengan menores probabilidades de presentar de resistencia-cruzada (Fabbretti et al., 2011; Giuliodori et al., 2018; Gould & Bal, 2013).

La iniciación de la síntesis de proteínas requiere la coordinación de diversos ligandos y las subunidades ribosomales, los cuales permiten la correcta identificación del codón de iniciación en el ARNm (Milón & Rodnina, 2012). En bacterias, durante la iniciación, el fMet-ARNt^{fMet} iniciador y el ARN mensajero (ARNm) se unen a la subunidad 30S formando el complejo de pre-iniciación 30S (30S-PIC) (Gualerzi & Pon, 2015; Laursen et al., 2005). Esta reacción es catalizada por los tres factores de iniciación: IF1, IF2 e IF3 (Gualerzi & Pon, 2015). La unión del ARNm al ribosoma está guiada por la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) que es complementaria a la región anti-Shine-Dalgarno (aSD) del ARN ribosomal (ARNr) 16S (Shine & Dalgarno, 1974); sin embargo, la SD no es esencial para la correcta decodificación del codón de iniciación (Canonaco et al., 1987). Después de que el 30S PIC establece la correcta interacción codón-anticodón entre el ARNt y el ARNm, se convierte en un complejo de iniciación 30S funcional (30S IC), capaz de reclutar a la subunidad grande 50S (Gualerzi & Pon, 2015). Una vez reclutada la subunidad grande, se forma el complejo

de iniciación 70S (70S IC) (Laursen et al., 2005). Finalmente, los factores de iniciación dejan el ribosoma para formar un 70S IC maduro, capaz de formar la cadena polipeptídica en la fase de elongación (Milón & Rodnina, 2012).

Durante la fase de iniciación, IF3 funciona como un factor promotor de la fidelidad de la iniciación; previniendo la unión prematura de la subunidad 50S, y catalizando la interacción codón-anticodón del fMet-ARNt^{fmet} y del ARNm con un codón de iniciación canónico (AUG, GUG, UUG) (Gualerzi et al., 2001; Milon et al., 2008; Singh et al., 2022; Sussman et al., 1996). Así mismo incrementa la disociación de complejos de iniciación que contengan ARNt no iniciadores, ARNm no canónicos o ARNm “leaderless” (Gualerzi et al., 2001; Nakamoto et al., 2021; Risuleo et al., 1976; Tedin et al., 1999). Por otro lado, IF1 funciona como un estabilizador de los factores IF2 e IF3 a la subunidad ribosomal 30S y, en conjunto con IF3, rotan la cabeza de la subunidad ribosomal 30S permitiendo que esta discrimine contra regiones iniciadoras de traducción (TIR) no óptimas (que no tienen un codón de iniciación canónico y/o una región no traducida 5’) (Julián et al., 2011; Milón et al., 2012). Por lo tanto, IF1 como IF3, son esenciales para la formación adecuada del complejo de iniciación 30S (30S IC).

Estudios previos ya han caracterizado la formación del complejo de iniciación de la traducción en *E. coli* (Barrenechea et al., 2021; Chulluncuy et al., 2016; Milon et al., 2008; Nakamoto, 2019). Sin embargo, se sabe que procesos biológicos fundamentales como estos pueden divergir entre distintos microorganismos. Actualmente se conoce que los ribosomas de *M. tuberculosis* tienen características específicas de su especie como la presencia de dos proteínas nuevas, la bS22 y bL37, o nuevo ARNr como la hélice H54a (Yang et al., 2017). Además, se sabe que los factores de iniciación de *E. coli* tienen menor tamaño que los de *M. tuberculosis* (Sawyer et al., 2018). También se ha observado que en *E. coli* el transcriptoma cuenta con un 1 o 2% de l1mRNA, en cambio, en *M. tuberculosis*, hasta un cuarto del transcriptoma está compuesto por este l1mRNA (Leiva & Katz, 2022; Sawyer et al., 2018). Todo ello indica que la traducción en *M. tuberculosis* tiene ciertas características que la diferencian del organismo modelo *E. coli*, lo que nos lleva a la pregunta: ¿Qué tanto de lo que se sabe del modelo traduccional de *E. coli*, específicamente de la formación del complejo de iniciación de la traducción, se puede aplicar a *M. tuberculosis*? Se ha investigado la formación de este complejo en *E. coli*; sin embargo, los conocimientos sobre este proceso en *M. tuberculosis* quedan limitados por los antecedentes obtenidos de estos estudios.

Investigar los factores de iniciación IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* podría esclarecer si hay diferencias en la formación del complejo de iniciación entre esta bacteria y *E. coli*, y podría brindar información relevante para combatir al Mycobacterium.

En este trabajo se propone producir los factores nativos y mutantes IF3 e IF1 de *M. tuberculosis* usando la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y posteriormente el marcado fluorescente de las proteínas mutantes. Además, se evaluará el uso de un sistema heterólogo basado en la transferencia de energía por resonancia (FRET), que permitirá evaluar la asociación o disociación de IF1 e IF3, en base al acercamiento o distanciamiento de los fluoróforos, en el contexto de la formación del 30S IC (Milon et al., 2007).

1.1 Planteamiento del problema

Las cepas resistentes de *M. tuberculosis* representan un gran problema, siendo las RR/MDR las causantes de aproximadamente medio millón de nuevos casos cada año (CDC, 2016; OMS, 2021). Además, en 2019, las infecciones por *M. tuberculosis* multidrogo resistentes (MDR) se clasificaron como una de las seis mayores causantes de muertes atribuidas a patógenos resistentes a antimicrobianos (Murray et al., 2022). Los tratamientos actuales para la TB-MDR están lejos de ser satisfactorios, debido a su larga duración, mayor necesidad de uso de fármacos y mayor toxicidad (OMS, 2020).

En el Perú la TB es una enfermedad endémica (MINSA, 2018). La Organización Panamericana de Salud, declara que el Perú es el segundo país de América con mayor cantidad de casos estimados de tuberculosis (39 000, 13.4 %) y el tercer país con mayor tasa de incidencia (120 nuevos casos y recaídas, por cada 100 000 habitantes) en el año 2020 (OPS, 2021). Para el caso de la RR-TB/MDR-TB, el Perú es el país de América con mayor número de casos estimados (3 100, 28%). Sólo Brasil y Perú juntos acumulan más de la mitad de los casos de toda la región (Cárdenas-Escalante et al., 2022; OPS, 2021). En lo que refiere a la tuberculosis extensamente resistente (TB-XDR), en América se reportaron un total de 138 casos, de los cuales el Perú reportó más de las dos terceras partes de estos, con 89 casos (69 %) (OPS, 2021). Del total de casos del Perú, Lima Metropolitana y Callao reportan aproximadamente un 64 % de los casos de TB, un 70 % de TB-MDR y un 79 % de TB-XDR (Cárdenas-Escalante et al., 2022). Debido a lo anteriormente expuesto, existe una

creciente necesidad por nuevos antibióticos con mecanismos de acción novedosos que puedan contrarrestar los mecanismos de resistencia (Mabhula & Singh, 2019).

Actualmente la resistencia a los antibióticos es una de las 10 principales amenazas a la salud pública (United Nations Environment Programme, 2023). El uso indebido y excesivo de los antimicrobianos es uno de los principales factores que ha fomentado la aparición de patógenos farmacorresistentes (WHO, 2014). En conjunto a esto, se ha observado un declive en la investigación, producción e introducción de nuevos antibióticos al mercado. Esto debido al alto coste, baja tasa de éxito y varios años de investigación que implica el desarrollo de antibióticos (Plackett, 2020; Projan, 2003). Además de la rápida aparición de resistencia, lo que perjudicaría el arduo esfuerzo para la obtención del fármaco. Por ello, se requiere el desarrollo racional de fármacos, estableciendo qué blancos tendrían mayor probabilidad de éxito (Fabbretti et al., 2011; Giuliadori et al., 2018). Lo que, a su vez, permitiría incrementar las ganancias que se podrían obtener de su producción e incentivaría la búsqueda de nuevos antibióticos. Uno de estos blancos ampliamente validados podría ser la inhibición del proceso de traducción, específicamente en la fase de iniciación que se encuentra subexplotada, además de ser una fase que diverge bastante entre procariotas y eucariotas (Brandi, Fabbretti, et al., 2006; Fabbretti et al., 2011; Giuliadori et al., 2018; Walsh & Wencewicz, 2014). Esto permitiría reducir la probabilidad de que el antibiótico presente problemas de resistencia cruzada y de que haya efectos secundarios para el paciente.

Cada vez existe mayor evidencia que procesos biológicos fundamentales y conservados como la traducción pueden diferir entre microorganismos (Sawyer et al., 2018). Sólo un número limitado de estudios ha investigado las diferencias en el proceso de traducción de *M. tuberculosis*, en comparación con el organismo modelo *E. coli* (Grabowska, 2021; Sawyer et al., 2021; Smith et al., 2022). Debido a ello existe un desconocimiento teórico sobre cuánto de lo que se conoce sobre la fase de iniciación de la traducción en *E. coli* puede ser aplicable a *M. tuberculosis*. Es necesario evaluar esta fase a profundidad, ya que podría tener implicancias, por ejemplo, en la identificación de nuevos compuestos contra cada uno de sus componentes, que podrían llevar al descubrimiento de mejores tratamientos contra la tuberculosis.

1.2 Justificación de la investigación

La TB es un problema de escala global que causa millones de muertes anualmente (OMS, 2021). El Perú es uno de los países en América con mayor cantidad de casos estimados y con mayor predominancia de formas drogo resistentes de la TB (OPS, 2021). En este aspecto, este estudio va a aportar un sistema heterólogo de FRET que, posteriormente, de confirmarse diferencias con el sistema de FRET de *E. coli*, proveerá información sobre los mecanismos de inhibición de las drogas que atacan a la iniciación de la traducción de *M. tuberculosis*, lo cual sería utilizado para el desarrollo racional de compuestos de nueva-generación (ej.: aptámeros) tal y como se ha venido realizando anteriormente en *E. coli* (Barrenechea et al., 2021; Brandi, Fabbretti, et al., 2006; Brandi, Lazzarini, et al., 2006; Chulluncuy et al., 2016; Sánchez Castro, 2022).

La identificación de ciertas diferencias estructurales entre los ribosomas de *E. coli* y *Mycobacterium*, tanto en las proteínas que lo componen como en su ARN ribosomal, además del menor tamaño de los factores de iniciación de *E. coli* frente a los de *M. tuberculosis*; nos resalta ciertas divergencias en la maquinaria traduccional entre esta bacteria y el organismo modelo *E. coli* (Sawyer et al., 2018; Yang et al., 2017). Actualmente, se conoce que los factores IF1 e IF3 están involucrados en la correcta formación del complejo de iniciación 30S; sin embargo, se desconoce si los mecanismos moleculares de los factores IF1 e IF3 de *E. coli* se extrapolan a los de *M. tuberculosis*. Debido a ello, y, considerando que se tiene establecido el sistema de FRET para *E. coli*, este trabajo contribuye con metodología para producir versiones fluorescentes de las proteínas IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y con un sistema heterólogo de FRET que permitirá investigarlas. Además, el sistema biofísico que se diseñará en este trabajo, a futuro, podría aportar conocimiento teórico sobre las diferencias específicas de su especie de los factores IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y su influencia en la formación del complejo de iniciación de la traducción. Finalmente, todo esto brindará nuevos conocimientos que aportarían a la problemática de salud mundial que representa la tuberculosis (OMS, 2021).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la asociación de IF3 e IF1 de *M. tuberculosis* a la subunidad 30S de *E. coli* usando un sistema heterólogo de FRET, para comprobar si se asocian a la subunidad 30S de *E. coli* de la misma manera que los factores IF1 e IF3 de *E. coli*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar *in silico* las secuencias y estructuras de las proteínas IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de la información que se encuentra en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y del Banco de Datos de proteínas (PDB).
- Transformar células competentes de *E. coli* con los plásmidos pET24a(+), conteniendo los genes de las proteínas IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando el marcador genético de resistencia a la Kanamicina.
- Determinar la producción de las proteínas IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis* por las células transformadas con los plásmidos pET24a(+)
- Marcar las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} con etiquetas fluorescentes, Atto 540Q o Alexa Fluor488, acopladas a grupos maleimido los cuales reaccionan con el grupo SH de las cisteínas.
- Determinar la asociación de las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* marcadas fluorescentemente a la subunidad 30S, mediante la transferencia de energía utilizando un sistema de FRET.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Síntesis de proteínas bacteriana

En las bacterias, las proteínas son producidas a partir de la información genética almacenada en el genoma (Clark et al., 2015). Esta información genética es transmitida en 2 etapas: Transcripción y traducción. Primero el ADN es transcrito a ARNm. Luego la información que lleva el ARNm es traducida para generar una secuencia de aminoácidos formando una cadena polipeptídica. En el proceso de traducción, la biosíntesis de proteínas es realizada por grandes complejos macromoleculares de ribonucleoproteínas llamados ribosomas compuestos por una subunidad pequeña 30S (Fig. 1) y una subunidad grande 50S (Laursen et al., 2005). Ambas subunidades se unen mediante la formación de puentes intermoleculares, proveyendo un espacio o interfase entre las subunidades, que es importante para la acomodación de los ARNts (Huter et al., 2021). El ribosoma posee 3 sitios de unión para los ARNts, estos son, el sitio-A (sitio aceptor), el sitio-P (sitio peptidil), y el sitio-E (sitio de salida) (Fig. 1 y 3). Los ribosomas no solo van a interactuar con los ARNts y ARNm; sino también, de acuerdo con la etapa de la traducción en que se encuentren, con diferentes factores proteicos, como los factores de iniciación o elongación, los cuales aseguran un rápido y eficiente proceso de traducción. Este proceso está compuesto por 4 etapas: Iniciación, elongación, terminación y reciclaje ribosomal (Laursen et al., 2005; Sawyer et al., 2018).

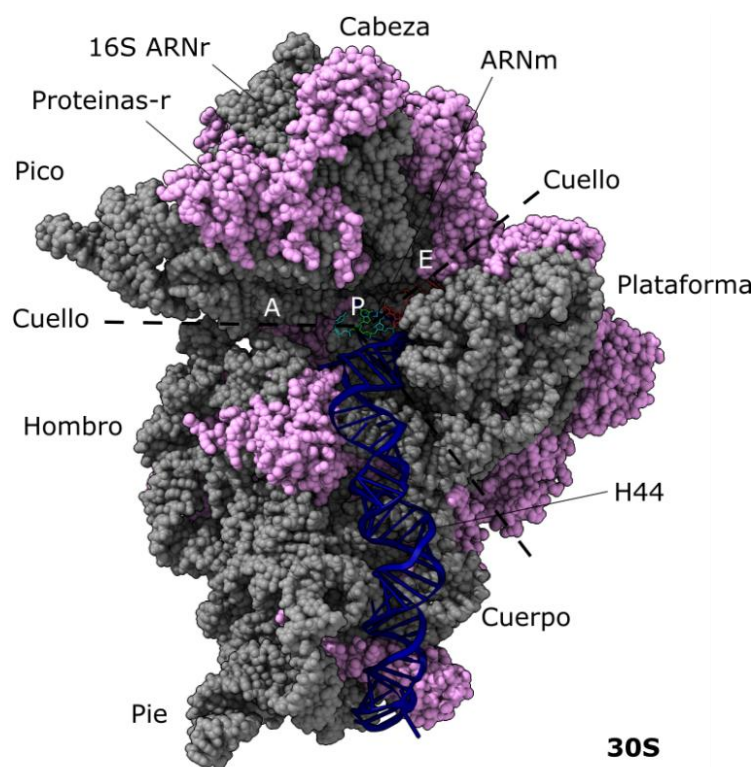


Figura 1: Modelo estructural de la subunidad 30S visto desde la interfase entre la subunidad 30S y 50S (PDB: 5LMV) (Hussain et al., 2016). Los dominios 5' (Cabeza y el pico), central (Plataforma) y 3' (Cuerpo con el hombro y el pie en el borde superior izquierdo e inferior izquierdo respectivamente) se encuentran separados por líneas segmentadas. Se observan los sitios A, P y E y el ARNm en el cuello. La hélice 44 (H44) se encuentra de color azul, las proteínas ribosomales (Proteínas-r) están resaltadas en rosado y el ARN ribosomal (ARNr) en gris.

2.1.1 Fase de Iniciación de la traducción

Antes de que la síntesis de proteínas se realice, la subunidad pequeña y la subunidad grande del ribosoma están libres y por separado en el citosol de la célula (Clark et al., 2015). En la primera etapa de la iniciación de la traducción, los factores de iniciación, fMet-ARNt^{fmet}, y ARNm son reclutados a la subunidad 30S, para formar el 30S PIC (Fig. 2) (Milón & Rodnina, 2012). Los factores IF3 e IF2 son los primeros en asociarse a la subunidad 30S, seguidos de IF1 y finalmente del fMet-ARNt^{fmet} que se acopla al IF2 previamente unido al 30S. El ARNm llega sin un orden establecido y de forma independiente a la composición del 30S PIC. El reconocimiento del codón de iniciación en el sitio-P por el fMet-ARNt^{fmet} desencadena cambios conformacionales que convierten al 30S PIC en el complejo funcionalmente competente, 30S IC (Laursen et al., 2005; Milón et al., 2012).

La asociación de la subunidad 50S al 30S IC forma el 70S PIC (Milón & Rodnina, 2012). Esta unión desencadena la hidrólisis del GTP por IF2 y la consecutiva liberación de IF1 e IF3 del complejo. La eyección de IF1 libera el sitio-A para la futura llegada de un aminoacil-tRNA (Laursen et al., 2005). La subsiguiente disociación del IF2 deriva en un 70S IC maduro, el cual es funcionalmente competente para realizar la traducción del ARNm (Milón & Rodnina, 2012). El último paso es la unión en el sitio A del complejo ternario (TC) EF-Tu·GTP·ARNt -aminoacil seguido por la formación del primer enlace peptídico, completando así, la transición de la etapa de iniciación a la elongación (Fig. 2) (G. Karp et al., 2016; Milón & Rodnina, 2012).

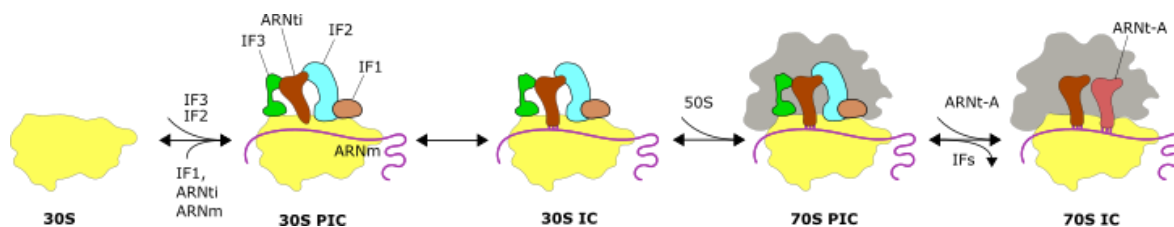


Figura 2: Representación esquemática de la formación del complejo de iniciación 70S (70SIC). Se observa la asociación de IF3, IF2, IF1, ARNt iniciador (ARNti o fMet-ARNt) y el ARNm a la subunidad 30S para formar el complejo de pre-iniciación (30S PIC). Posteriormente se da la interacción codón-anticodón entre el ARNti y el ARNm para formar el complejo de iniciación 30S (30S IC). Luego llega la subunidad 50S y se forma el complejo de pre-iniciación 70S (70S PIC). Finalmente se disocian los factores, completando la formación del complejo de iniciación 70S (70S IC) y dando paso a la unión del ARNt-aminoacil (ARNt-A) para pasar a la fase de la elongación. Referencia: Milón & Rodnina, 2012.

2.1.1.1 Factores de Iniciación

IF1 (Fig. 3, en rojo) estabiliza la asociación de IF2 e IF3 al 30S IC e, indirectamente, modula la interacción codón-anticodón del ARNm y del fMet-ARNt^{fMet} para mantener la fidelidad del 70S IC (Fig. 3 y 4) (Milon et al., 2008; Milón et al., 2012; Milón & Rodnina, 2012; Qin & Fredrick, 2009). Para lograr lo último, IF1 induce un desplazamiento de una hebra de la hélice h44 (Fig. 1 y 3) ocasionando una disrupción en sus pares de bases no canónicos A1413:G1487 y U1414:G1486, los cuales se encuentran entre los puentes B2a y B3 que conectan ambas subunidades, inhibiendo la unión de la subunidad 50S (Qin & Fredrick, 2009). Cuando se da una correcta interacción codón-anticodón, el efecto en la h44 se revierte permitiendo continuar con la iniciación de la traducción (Qin & Fredrick, 2009).

IF3 (Fig. 3, en verde) funciona manteniendo la fidelidad en la formación del 70S IC (Milon et al., 2008; Nakamoto et al., 2021; Singh et al., 2022). Para ello previene la unión prematura de la subunidad 50S a la subunidad 30S, aumenta la velocidad de interacción codón-anticodón del fMet-ARNts y del ARNm con codones de iniciación canónicos; y aumenta la velocidad de disociación de complejos de iniciación conteniendo Met-ARNts no formilados, ARNts que no sean iniciadores (Ej.: aminoacil-ARNt), ARNm no canónicos y ARNm “leaderless” (Gualerzi et al., 2001; Nakamoto et al., 2021; Risuleo et al., 1976; Sussman et al., 1996; Tedin et al., 1999). IF3, en conjunto con IF1, también estabilizan o inducen una

conformación rotada de la cabeza de la subunidad 30S, lo que permite que el codón de iniciación del mRNA se posicione en el sitio P, listo para interactuar con el ARNt (Julián et al., 2011).

IF2 (Fig. 3, en azul) promueve la asociación del fMet-ARNt^{fMet} al 30S PIC (Fig. 3) (Julián et al., 2011; Milon et al., 2010). También, mediante la hidrólisis de su GTP, propicia la reversión del giro de la cabeza de la subunidad 30S permitiendo al 70S IC proseguir hacia la elongación (Julián et al., 2011; Marshall et al., 2009). Además, IF2 en condiciones de estrés se une a ppGpp, una alarmona (molécula de señalización intracelular) que aumenta su concentración en situaciones adversas, bloqueando la iniciación de la traducción (Milon et al., 2006).

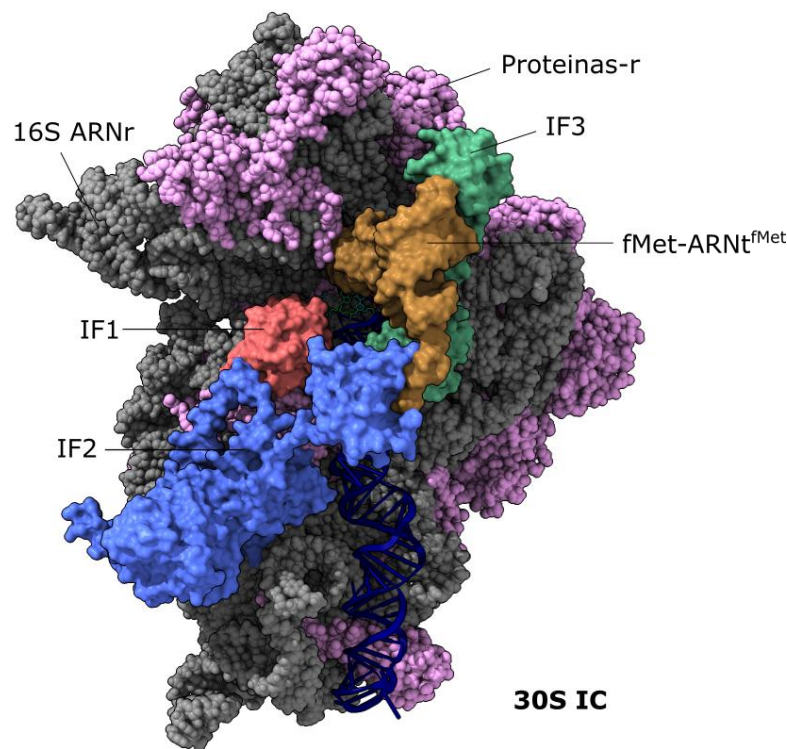


Figura 3: Modelo estructural del complejo de iniciación 30S (30S IC) visto desde la interfase entre la subunidad 30S y 50S (PDB: 5LMV) (Hussain et al., 2016). Se observan los 3 factores de iniciación (IF1, IF2, IF3) y el fMet-ARNt^{fMet}. La parte C-terminal de IF2 interactúa con la formil-metionina (fMet) y el brazo aceptor del fMet-ARNt^{fMet}, permitiendo el reclutamiento específico de este ARNt (Huter et al., 2021). Se observa una interacción entre el dominio N terminal de IF3 y el codo del fMet-ARNt^{fMet}, lo que cataliza la interacción codón-anticodón si son los correctos ARNt y ARNm (Hussain et al., 2016; Nakamoto et al., 2021; Singh et al., 2022). IF1 se encuentra resaltado de rojo, IF2 de azul e IF3 de verde. Las

proteínas ribosomales (Proteínas-r) están resaltadas en rosado y el ARN ribosomal (ARNr) en gris.

2.2 Antibióticos contra la fase de iniciación de la traducción

El proceso de traducción es uno de los blancos de antibióticos con mayor uso clínico (Walsh & Wencewicz, 2014). La mayoría de los antibióticos afectan al ribosoma generalmente interactuando con su ARN ribosomal (Wilson, 2009). Las estructuras moleculares de las subunidades 30S y 50S de los ribosomas unidos a los antibióticos revelaron que estos predominantemente atacan sus centros funcionales, los cuales son las partes estructurales del ribosoma que llevan a cabo funciones específicas durante la traducción, como por ejemplo el centro decodificador (DC) en la subunidad 30S, el centro peptidil transferasa (PTC) y el túnel de salida de la subunidad 50S (Fig. 4) (Musa Wilson, 2020; Wilson, 2009).

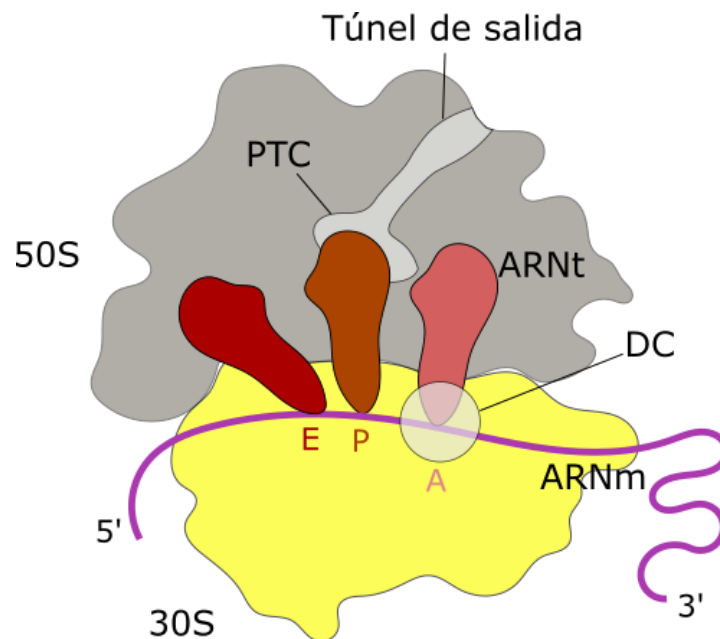


Figura 4: Representación esquemática del ribosoma 70S, donde se ve la subunidad grande 50S (gris), la subunidad pequeña 30S (amarillo), el ARNt aminidoacyl (A; rosado), el sitio peptidil (P; marrón) y de salida (E; rojo), el ARNm (violeta). El Centro Decodificador (DC) en la subunidad 30S, el Centro Peptidil Transferasa (PTC) y el Túnel de Salida, están representados de color gris pálido. Referencia: Huter et al., 2021

Generalmente los antibióticos que atacan la síntesis proteica inhiben la etapa de elongación (Wilson, 2014). Aunque también hay compuestos que atacan la fase de iniciación como:

Kasugamicina, edeina, pactamicina y GE81112, que se unen a la subunidad 30S; ortomicinas (evernimicina y avilamicina) y tiopeptidos que se unen a la subunidad 50S; y la termorubina que se une al complejo 70S (Wilson, 2009, 2014). A pesar de ello, estos están limitados en sus aplicaciones clínicas debido a problemas con su especificidad (edeina y pactamicina), toxicidad (Evernimicina) y solubilidad (tiopeptidos y termorubina) (Wilson, 2014).

A pesar de que más de la mitad de los antibióticos apuntan a la maquinaria traduccional de las bacterias, esta, todavía ofrece oportunidades para identificar inhibidores capaces de evitar los mecanismos de resistencia debido a su complejidad funcional y estructural (Brandi, Fabbretti, et al., 2006). Esto se debe a que, al atacar componentes, pasos o fases de la traducción sin explotar, se minimizaría la posibilidad de que el nuevo antibiótico resulte inhibido por resistencia-cruzada (Gould & Bal, 2013). Esta sucede cuando la adquisición de resistencia a una droga le confiere a la bacteria resistencia a otra droga; ya sea porque ambas drogas atacan el mismo blanco, tienen la misma ruta de acceso al citoplasma o están envueltos en la misma vía que lleva a la inhibición del crecimiento o la muerte celular (Colclough et al., 2019; Sommer et al., 2017). Además, debido a la conservación de la maquinaria traduccional, sería posible generar o encontrar principalmente antibióticos de amplio espectro, lo cual sería útil para combatir varios patógenos resistentes (Fabbretti et al., 2011).

2.3 Síntesis de proteínas en *Mycobacterium tuberculosis*

Los procesos biológicos fundamentales pueden variar entre microorganismos (Sawyer et al., 2018). *Mycobacterium tuberculosis* tiene ciertas peculiaridades en el proceso de síntesis proteica que lo diferencian del organismo modelo *E. coli*. Estas peculiaridades se encuentran en los componentes de su maquinaria traduccional y los elementos que regulan la traducción.

2.3.1 Maquinaria traduccional de *Mycobacterium tuberculosis*

2.3.1.1 Ribosomas

Todas las proteínas ribosomales de *E. coli* tienen homólogos en *M. tuberculosis*, a excepción de la bS21 que se encuentra ausente en *M. tuberculosis*. Esta ausencia, hace que los ribosomas de *M. tuberculosis* se parezcan a los ribosomas 61S de *E. coli*, los cuales surgen en presencia de kasugamicina y están especializados en la traducción de leaderless ARNm

(l1mRNA). (Backendorf et al., 1981; Kaberdina et al., 2009; Shasmal & Sengupta, 2012). En general, el ribosoma de *M. tuberculosis* contiene proteínas más largas y más positivamente cargadas (tienen un punto isoeléctrico más alto) que las de *E. coli* (Lönnroth & Ridell, 1985; Sawyer et al., 2018; Shasmal & Sengupta, 2012). También posee dos proteínas nuevas, la S22 y L37 (Hentschel et al., 2017; Yang et al., 2017). La primera se encuentra en la subunidad 30S cerca al centro decodificador (DC), y la última se encuentra en la subunidad 50S cerca al centro peptidil transferasa (PTC) (Fig. 4) (Hentschel et al., 2017; Yang et al., 2017).

Mycobacterium reprograma su ribosoma en ambientes con baja concentración de iones zinc, reemplazando sus proteínas ribosomales primarias S14, S18, L28 y L33, las cuales presentan dedos de zinc (C+), con cuatro proteínas-r alternativas que carecen de dedos de zinc (C-) (Kumar et al., 2021; Sawyer et al., 2018). En el caso del organismo modelo *E. coli*, y a diferencia de *Mycobacterium*, su ribosoma solo tiene las proteínas-r C- S14, S18, L28 y L33; aunque, por otro lado, también tiene las proteínas-r C+/- L31 y L36 (Li et al., 2018; Makarova et al., 2001; Rasmussen et al., 2022). Se hipotetiza que, en *M. tuberculosis*, estas proteínas-r C- son una estrategia para asegurar la producción proteica en ambientes privados de zinc, como los que se encuentran al salir de los macrófagos (Sawyer et al., 2018).

Mycobacterium también cuenta con ARNr que no está presente en *E. coli*. Este es el caso de la hélice H54a (Fig. 5), que tiene 110 nucleótidos y se encuentra en el ARNr 23S de la subunidad 50S (Hentschel et al., 2017; Shasmal & Sengupta, 2012; Yang et al., 2017). Se ha observado que el 80% de los ribosomas de *M. tuberculosis* tiene un puente entre subunidades, denominado B9, que involucra a la hélice H54a de la subunidad 50S y la proteína bS6 de la subunidad 30S (Shasmal & Sengupta, 2012; Yang et al., 2017). Se sugiere que este puente previene la formación prematura del complejo de iniciación 70S, mientras que la ausencia del puente facilita la creación del complejo 70S. Otra diferencia identificada en el ARNr de *Mycobacterium*, es una interacción entre las hélices H16a y H15 presentes en la subunidad grande 50S (Kumar et al., 2021).

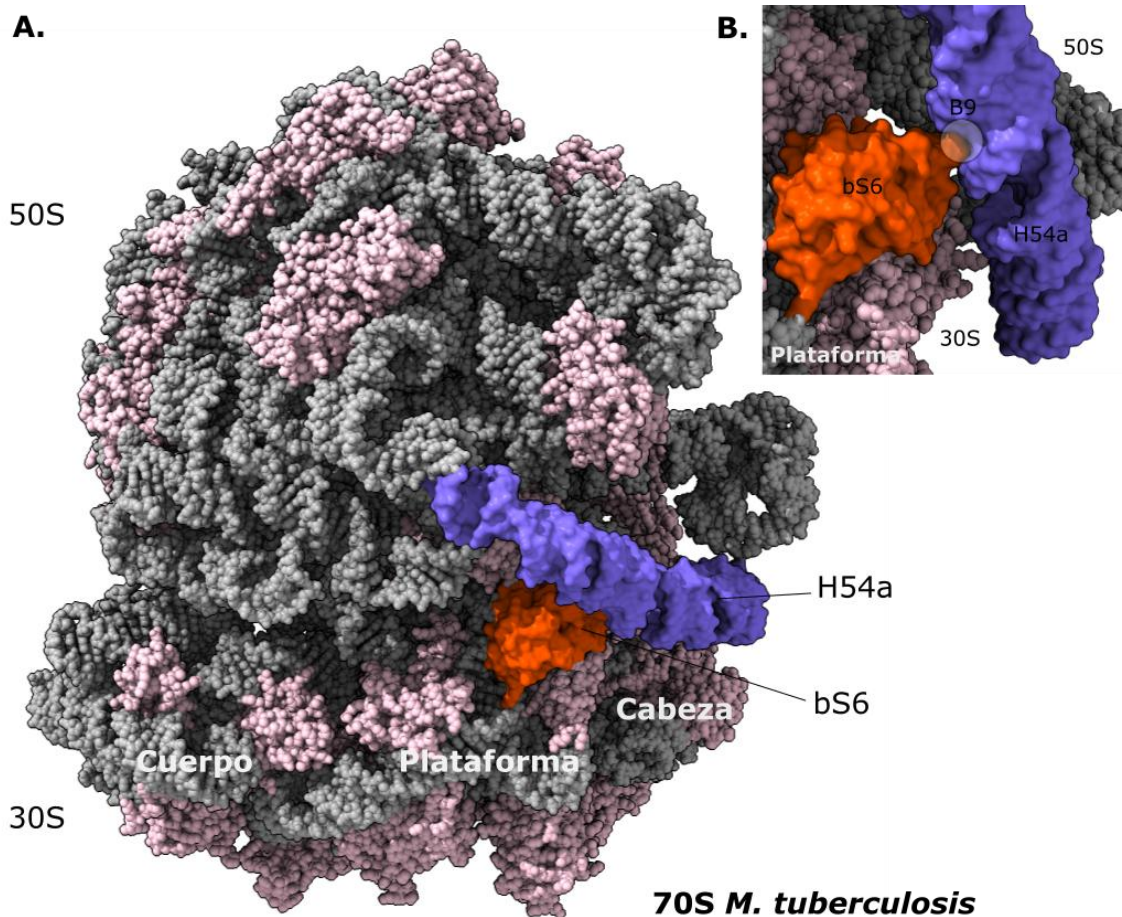


Figura 5: Modelo estructural del ribosoma 70S de *M. tuberculosis* (PDB: 5O61) (Hentschel et al., 2017). (A) La hélice H54a (violeta) se encuentra en el ARNribosomal 23S de la subunidad 50S, y la proteína ribosomal bS6 (naranja) está en la plataforma de la subunidad 30S. (B) Vista del puente entre subunidades B9, creado por la interacción entre la proteína bS6 y la H54. Referencia: Sawyer et al., 2018

2.3.1.2 Factores de traducción

Los factores de traducción son una serie de proteínas que contribuyen a la correcta síntesis de proteínas. Existen diferencias en el número y similitud de la secuencia de aminoácidos de estos factores, entre *M. tuberculosis* y *E. coli*.

<i>Factor</i>	<i>Nº AA en E.coli</i>	<i>Nº AA en Mtb</i>	<i>Identidad (%) entre las secuencias de E. coli y Mtb</i>
<i>IF1</i>	72	73	68 %

<i>IF2</i>	890	900	48 %
<i>IF3</i>	180	201	46 %
<i>EF-G</i>	704	701	59 %
<i>EF-Tu</i>	394	396	74 %
<i>EF-Ts</i>	283	271	40 %
<i>EF-P</i>	188	187	42 %
<i>RF1</i>	360	357	46 %
<i>RF2</i>	365	371	44 %
<i>RRF</i>	185	185	40 %

Tabla 1: Comparación de los factores de traducción de *E. coli* y de *M. tuberculosis* (*Mtb*). Se observa el porcentaje de identidad en la alineación entre las secuencias de los factores. Este porcentaje refleja la cantidad de residuos idénticos entre ambas secuencias, después de haber sido alineadas, dividido entre el total de residuos alineados sin considerar los espacios (Kumar et al., 2021).

2.3.2 Regulación de la traducción en *Mycobacterium tuberculosis*

2.3.2.1 Leaderless ARNm

El leaderless ARNm (l1mRNA) es aquel que carece de la región no traducida 5' (5' UTR), la cual cataliza la unión del mRNA al ribosoma (Fig. 6). Esta 5' UTR puede estar compuesta principalmente por la secuencia Shine-Dalgarno (SD), que es complementaria a la secuencia anti-SD (aSD) en el ARNr 16S de la subunidad 30S, y los elementos ricos en Adenina y Uracilo (AREs) que interactúan con la proteína ribosomal bS1 y previenen la formación de estructuras secundarias (Fig. 6) (Beck & Moll, 2018). Adicionalmente la 5' UTR puede tener secuencias que se unen a ciertos elementos, como proteínas o ARNs reguladores, que cambian la estructura secundaria del mRNA o bloquean su traducción. Aproximadamente un cuarto del transcriptoma de *M. tuberculosis* está compuesto por l1mRNA, a diferencia de *E. coli* y otros patógenos, que solo tienen un 1 – 2 % de su transcriptoma como leaderless (Kumar et al., 2021; Sawyer et al., 2018). Además, en los ribosomas mycobacterianos, la traducción de mRNA canónico y leaderless se produce con igual eficiencia (Kumar et al., 2021). En general, las bacterias en condiciones de estrés aumentan la expresión de l1mRNA, siendo este un mecanismo regulatorio por el cual modifican su proteoma para adaptarse a esas condiciones (Sawyer et al., 2018). Se hipotetiza que las cepas resistentes a antibióticos

cambian a la traducción de l1mRNA, por lo tanto, enfocar los estudios a la traducción de l1mRNA puede ayudar a buscar estrategias para combatir las mycobacterias multidrogoresistentes (Kumar et al., 2021).

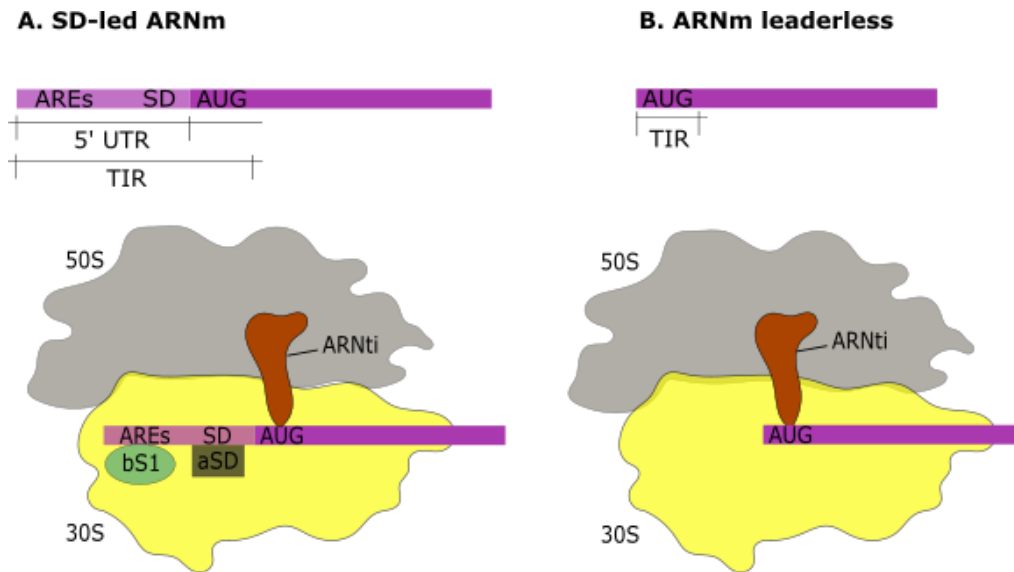


Figura 6: Representación esquemática de un ARNm con una secuencia líder Shine-Dalgarno (SD-led ARNm) y un ARNm sin la región no traducida 5' (ARNm leaderless). (A) La secuencia que se encuentra río arriba del codón de iniciación AUG conforma la región no traducida 5' (5' UTR); mientras que la región iniciadora de la traducción (TIR) la conforma la secuencia SD, catalizadores de la traducción como los elementos ricos Adenina y Uracilo (AREs), y el codón de iniciación (Vimberg et al., 2007). Se observa a la proteína ribosomal bS1 y la secuencia anti-SD del 16S ARNribosomal, de la subunidad 30S, interactuando con los AREs y la secuencia SD respectivamente. (B) El ARNm leaderless mayoritariamente es reclutado directamente a un complejo 70S ya formado (Moll et al., 2002, 2004; Udagawa et al., 2004).

2.3.2.2 Elementos de respuesta al estrés

En condiciones de adversidad como hipoxia (ej.: dentro de macrófagos), falta de nutrientes, choque térmico, bajas temperaturas, estrés por antibióticos, etc.; las bacterias han evolucionado para producir factores de respuesta al estrés (SRF) que modulan la traducción (Kumar et al., 2021). Estos bloquean la síntesis de proteínas, ocasionan la hibernación de los ribosomas o activan los sistemas toxina-antitoxina para reprogramar la maquinaria

traduccional. Las mycobacterias poseen ciertos SRF únicos como: el factor asociado al ribosoma bajo hipoxia (RafH), el producto del gen Rv1738 y la proteína alfa-cristalina, que se activan en condiciones de hipoxia; o la proteína mycobacteriana Y (MPY o RafS), que se activa en condiciones de falta de nutrientes (Bunker et al., 2015; Li et al., 2018; Tabira et al., 1998; Trauner et al., 2012).

En condiciones no optimas *E.coli* junta los monosomas 70S y forma dímeros 100S traduccionalmente inactivos, pasando a un estado de hibernación; a diferencia de este, *M. tuberculosis*, mediante el factor MPY, RafH o el producto del gen Rv1738, también pasa a un estado de hibernación, pero estabilizando al ribosoma en su forma asociada 70S (Li et al., 2018; Mishra et al., 2018; Trauner et al., 2012). No se ha detectado que las micobacterias sean capaces de formar dímeros 100S (Kumar et al., 2021).

Sobre los sistemas toxina-antitoxina (TA), estos usualmente están compuestos de sets de dos genes que codifican para una toxina, que inhibe el crecimiento celular, y su respectiva antitoxina que bloquea el efecto de la toxina por contacto directo con esta (Kumar et al., 2021). En condiciones de estrés la antitoxina se degrada liberando la toxina del complejo TA, esto genera que el crecimiento se detenga, aumenta la tolerancia a drogas, la persistencia, y patogénesis. Las toxinas suelen tener como blanco la traducción, la replicación del DNA o la biosíntesis de la pared celular (Sawyer et al., 2018). A diferencia de *E. coli* que tiene 11 sistemas TA de tipo II, *M. tuberculosis* tiene hasta 79. Estos sistemas se encuentran distribuidos en 6 familias: VapBC (50), MazEF (10), YefM/YoeB (1), RelBE (2), HigBA (2), ParDE (2); y también en un sistema tripartito y 11 sistemas no caracterizados (Kumar et al., 2021; Sala et al., 2014; Shao et al., 2011).

3 ANTECEDENTES

3.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es ocasionada por el bacilo acido-resistente, *Mycobacterium tuberculosis*, descubierto por Robert Koch en 1882 (Mabhula & Singh, 2019), y es la segunda causa de muerte en el mundo por una enfermedad infecciosa (OMS, 2021). Se trasmite por vía aérea cuando personas enfermas expelen la bacteria al aire, por ejemplo, al toser. Aunque *M. tuberculosis* es un patógeno principalmente pulmonar (TB pulmonar), también puede diseminarse a través del cuerpo (TB extrapulmonar) (Pai et al., 2016). La TB

tiene un espectro dinámico, es decir que va desde una infección asintomática/latente hasta una enfermedad peligrosa para la vida.

En 2020, la OMS estimó que un total 9,9 millones de personas enfermaron de TB y que 1,5 millones de personas murieron por esta enfermedad (OMS, 2021). También se calcula que medio millón de personas contraen RR-TB cada año, de las cuales un 78 % son TB-MDR, y aproximadamente 6.2 % de las personas con TB-MDR tienen TB-XDR (OMS, 2019). En el Perú, se estima que hay 39 000 casos de tuberculosis, 3 100 casos de TB-RR/MDR y 89 casos de TB-XDR (OPS, 2021).

Actualmente, la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es la única licenciada para la prevención de la TB (OMS, 2021). Esta fue desarrollada hace casi 100 años para prevenir formas severas de TB extrapulmonar en niños y es ampliamente usada (OMS, 2021). En el caso de los adultos, no existen vacunas que prevengan la TB, pero sí existen antibióticos para tratar la infección. El tratamiento se compone de 4 medicamentos de primera línea: Rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol (Pai et al., 2016). El régimen estándar consiste en una fase intensiva, que dura 2 meses, en la que se toma los 4 medicamentos; seguida de una fase continua con isoniazida y rifampicina por 4 meses (Mabhula & Singh, 2019).

Cuando el patógeno desarrolla resistencia a las drogas de primera línea, la enfermedad se denomina tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB). Esta es causada por una cepa de *M. tuberculosis* resistente a al menos la rifampicina y la isoniazida (OMS, 2021). Para los casos con MDR-TB existe un régimen corto de 9 – 12 meses y, si el paciente no es elegible para este régimen, hay un tratamiento largo que puede llegar a durar hasta 20 meses (Mabhula & Singh, 2019; Pai et al., 2016). En estos regímenes se usan diferentes combinaciones de medicamentos de segunda línea (fluoroquinolonas, inyectables de segunda línea, bedaquilina, linezolida, clofazimina, cicloserina, etc.) y de primera línea (WHO, 2020). También se han reportado casos de tuberculosis extensamente resistente (TB-XDR) causada por una cepa de *M. tuberculosis* resistente a la rifampicina, alguna fluoroquinolona, y al menos la bedaquilina o la linezolida (OMS, 2021). Estos casos se tratan siguiendo los mismos principios que se usan para la MDR-TB (Pai et al., 2016).

La resistencia a los antimicrobianos es una crisis global que amenaza el progreso en salud conseguido a lo largo de un siglo, con aproximadamente 1.2 millones de muertes por año a

nivel mundial (IACG, 2019; Murray et al., 2022). Específicamente, la RR/MDR-TB causa aproximadamente 230 000 muertes por año en el mundo y, en América, el Perú es el país con mayor prevalencia de estos casos (IACG, 2019; OPS, 2021). Debido a ello, y para solucionar este problema, es necesario desarrollar técnicas de diagnósticos rápidos en el punto de atención, más vacunas efectivas, y antibióticos efectivos y seguros que puedan ser usados en tratamientos cortos (OMS, 2017). La síntesis de proteínas de *M. tuberculosis*, específicamente la fase de iniciación de la misma es un blanco que puede ser explotado para nuevos antibióticos (Fabbretti et al., 2011).

3.2 Estudios que caracterizan la fase de iniciación de la síntesis de proteínas mediante el uso de sistemas de FRET

Análisis cinéticos, usando sistemas de FRET, demostraron que la vía cinéticamente más favorable para la formación del complejo de pre-iniciación 30S (30S PIC), comienza con la llegada de los factores de iniciación IF3 e IF2, seguidos por IF1 y finalmente por el fMet-ARNt^{fmet}. Además, reportaron que el ARNm llega de manera independiente a los factores de iniciación y que se puede asociar en cualquier momento del proceso de formación del 30S PIC (Milón et al., 2012).

En otro estudio, concluyeron que la eficiencia de la iniciación de la traducción del ARNm se encuentra determinada por su región iniciadora de la traducción (TIR). Demostraron que la unión de la subunidad 50S y la disociación del factor IF3 de la subunidad 70S, se encuentran influenciadas por el codón de iniciación y los elementos estructurales que conforman la región iniciadora de la traducción (TIR) del ARNm. Por lo tanto, probaron que la conversión del complejo de iniciación 30S a un ribosoma maduro 70S, constituye un importante punto de control en la selección de un correcto ARNm (Milon et al., 2008).

3.2.1 El rol de IF3 en la formación del complejo de iniciación

Mediante el uso de un sistema FRET demostraron que, en presencia de IF3, la formación del complejo de iniciación 70S (70S IC) es reversible y que los 70S IC se agrupan en dos clases, una con tiempos de vida más cortos y otra con tiempos de vida más largos. Además, reportaron que la presencia de IF3 en el 30S IC puede, mediante efectos alostéricos, alterar la conformación de IF2 con respecto al centro asociado a GTPasas del 50S (Macdougall &

Gonzalez, 2015).

Por otro lado, mediante el uso de un sistema intramolecular de FRET entre los dominios N-terminal y C-terminal de IF3, determinaron que este factor tiene una conformación dinámica en la subunidad 30S y que este dinamismo tiene un rol en la asociación rápida de la subunidad 50S a la subunidad 30S. Encontraron que IF3 en el 30S IC, existe en un equilibrio dinámico entre al menos tres conformaciones distintas y que una correcta interacción codón-anticodón entre el ARNt y el ARNm, en el complejo 30S IC, induce a un tipo de conformación del IF3, la cual es la que favorece la rápida asociación de la subunidad 50S (Elvekrog & Gonzalez, 2013).

Otro estudio probó que, cuando la subunidad 50S se asocia a la subunidad 30S, IF3 se distancia de IF1, IF2 y de su sitio de unión en la subunidad 30S; sin embargo, este todavía permanece asociado al 70S recientemente formado. Observaron que este distanciamiento de IF3 se da hacia un sitio de unión no canónico cerca a la proteína L33 de la subunidad 50S, por el sitio E del ribosoma. Discutieron que este sitio de unión no canónico podría tener relación con la participación de IF3 en modos de iniciación de la traducción alternativos que son realizados directamente por ribosomas 70S, como la iniciación con l1mRNAs o la reiniciación de la traducción sin la disociación de las subunidades 30S y 50S (Goyal et al., 2017).

Este dinamismo de IF3 también se ha observado en la acomodación de sus dominios en respuesta a los ligandos que se unen a la subunidad 30S. Reportaron que IF3 adopta una conformación extendida al llegar a la subunidad 30S, y que la llegada de IF1 e IF2 a la subunidad 30S promueven la compactación de IF3. También demostraron que la llegada del fMet-ARNt^{fmet} desplaza el dominio N terminal de IF3 de las cercanías del sitio P hacia la parte de la plataforma de la subunidad 30S, cerca de la proteína ribosomal uS11, y la interacción codón-anticodón entre el ARNm y el fMet-ARNt^{fmet} desplaza el dominio C terminal de IF3 fuera del sitio P. Finalmente, probaron que la formación del complejo de iniciación 70S compacta los dominios de IF3 preparándolo para su disociación y reciclado (Nakamoto et al., 2021).

3.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos en la formación del complejo de iniciación

Monitorearon mediante el uso de un sistema intramolecular de FRET entre los dominios C- y N-terminal de IF3, las perturbaciones ocasionadas por kanamicina y estreptomicina a este factor cuando se encontraba en la subunidad 30S. Demostraron que la kanamicina y la estreptomicina separan los dominios de IF3 cuando se encuentra en la subunidad 30S, en oposición a la conformación más cerrada que IF1 normalmente induce. Discutieron que estos aminoglucósidos interfieren con la iniciación de la traducción en bacterias, modulando la interacción entre los dominios de IF3 y la plataforma de la subunidad 30S (Chulluncuy et al., 2016).

Otro estudio demostró que las tetraciclinas (Oxytetraciclina, Democlociclina) inducen la compactación de IF3 en la subunidad 30S, retienen a IF1 durante el proceso de formación del complejo de iniciación 70S y ralentizan la transición hacia la fase de elongación en la traducción (Barrenechea et al., 2021).

3.3 Estudios sobre la producción y determinación de la estructura molecular de los factores de iniciación de *M. tuberculosis*.

Mediante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, expresaron IF1 de *M. tuberculosis* en células competentes BL21 (DE3)-RP. Obtuvieron cristales que pertenecían al sistema cristalino ortorrómbico, los parámetros de su celda unitaria eran $a = 73.95$, $b = 76.54$, $c = 28.03$ Å (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2007).

A partir de los cristales de IF1 de *M. tuberculosis*, determinaron su estructura molecular a una resolución de 1.47 Å y modelaron su interacción con la estructura existente de la subunidad ribosomal 30S de *Thermus thermophilus*. Demostraron que IF1 de *M. tuberculosis* adopta el plegamiento de unión a oligonucleótidos/oligosacáridos (OB fold) esperado y que estructuralmente coincidió con los ortólogos de IF1 conservados. Con el modelo de la interacción entre IF1 de *M. tuberculosis* y la subunidad 30S de *Thermus thermophilus* demostraron que, comparado a su forma en solución, solo las cadenas laterales de tres residuos importantes muestran grandes diferencias, mientras que el resto de la proteína en el complejo muestra cambios conformacionales limitados (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2010).

4 HIPÓTESIS

Si los factores de iniciación de la traducción IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* son producidos y marcados fluorescentemente, entonces podrá evaluarse su asociación a la subunidad 30S de *E. coli*, lo cual se evidenciaría mediante el sistema heterólogo de FRET.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

El estudio se realizó en el Grupo de Biofísica y Bioquímica Aplicada del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Lima, Perú.

5.2 Tipo y diseño de la investigación

Se realizó un estudio de tipo experimental prospectivo *in silico* e *in vitro*.

5.3 Variables

5.3.1 Variable independiente

- Factores de iniciación IF1, IF1_{D5C}, IF3 e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*.
- Factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* modificados fluorescentemente.

5.3.2 Variable dependiente

- Asociación de IF3 e IF1 de *M. tuberculosis* a la subunidad 30S de *E. coli*

5.4 Operacionalización de las variables

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES					
Objetivo específico	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
<p>Analizar <i>in silico</i> las secuencias y estructuras de las proteínas IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, a partir de la información que se encuentra en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y del Banco de Datos de Proteínas (PDB).</p>	<p>Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>E. coli</i>.</p>	Identidad	Porcentaje	CLC Genomics Workbenc	Cuantitativa
	<p>Alineamiento de las estructuras de IF1 e IF3 de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>E. coli</i>.</p>	RMSD	Armstrong (Å)	ChimeraX	Cuantitativa
	<p>Distancia entre los sitios de marcado fluorescente de IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de <i>M. tuberculosis</i> en el</p>	Distancia	Armstrong (Å)	ChimeraX	Cuantitativa

	complejo de pre-iniciación 30S				
Transformar células competentes de <i>E. coli</i> con los plásmidos pET24a(+), conteniendo los genes de las proteínas IF1, IF3, IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , utilizando el marcador genético de resistencia a la Kanamicina.	Producción de los factores de iniciación IF1, IF3, IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Eficiencia de Transformación	CFU/μg	Observación visual	Cuantitativa
Inducir la expresión de las proteínas IF1, IF3, IF1 _{D5C} e IF3 _{D157C} de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en las células transformadas con los plásmidos pET24a(+).		Presencia de bandas en geles de electroforesis	KiloDalton (kDA)	Electroforesis vertical	Cualitativa
		Concentración de la proteína IF1 e IF1 _{D5C}	Micromolar (μM)	Electroforesis vertical	Cuantitativa
		Concentración de la proteína IF3 e IF3 _{D157C}	Micromolar (μM)	Lector de placas Synergy™ H1	Cuantitativa

				Hybrid Multi-Mode (Agilent).	
<p>Marcar las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} con etiquetas fluorescentes, Atto 540Q o Alexa Fluor 488, acopladas a grupos maleimido los cuales reaccionan con el grupo SH de las cisteínas.</p>	<p>Marcado fluorescente de los factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de <i>M. tuberculosis</i>.</p>	<p>Presencia de bandas fluorescentes en geles de electroforesis</p>	-	Electroforesis horizontal	Cualitativa
		<p>Concentración de la proteína marcada</p>	Micromolar (μM)	Espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher),	Cuantitativa
		<p>Concentración de la proteína total</p>	Micromolar (μM)	Electroforesis vertical	Cuantitativa
<p>Determinar la asociación de las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de <i>M. tuberculosis</i> marcadas fluorescentemente a la subunidad 30S, mediante la transferencia de energía</p>		<p>Incremento o disminución de fluorescencia entre diferentes pares FRET</p>	<p>Unidades de emisión de fluorescencia</p>	<p>Espectrofluorímetro de flujo-detenido SX20</p>	Cualitativa

utilizando un sistema de FRET.					
--------------------------------	--	--	--	--	--

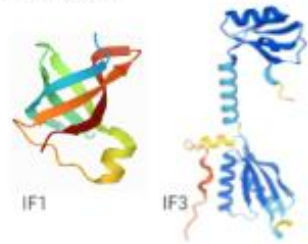
5.5 Procedimiento

Paso 1 Estudio in-silico

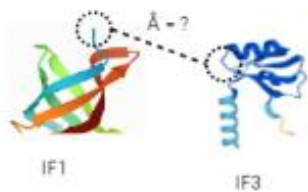
Comparar secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de E.coli y de M. tuberculosis



Comparar estructuras 3D de IF1 e IF3 de M. tuberculosis y de E. coli



Medir la distancia entre los residuos de cisteina de IF1 e IF3 mutantes de M. tuberculosis



Paso 2 Transformar

Insertar plásmido dentro de E.coli



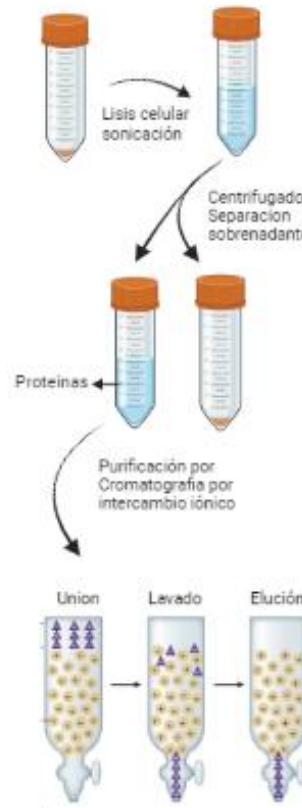
Paso 3 Expresar proteína

Inducción del plásmido mediante IPTG



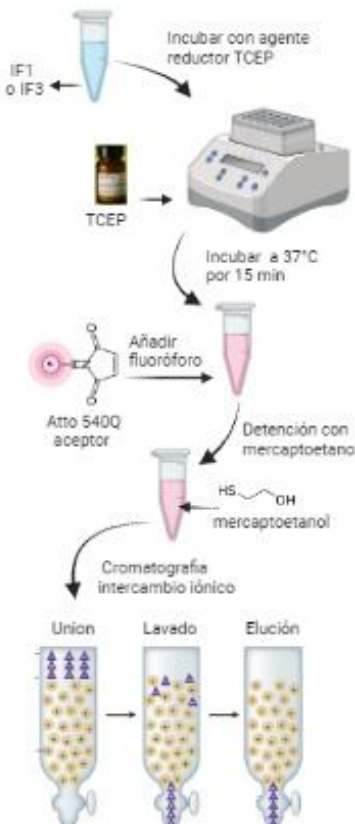
Paso 4 Purificar proteína

Aislamiento de la proteína mediante cromatografía por afinidad



Paso 5 Marcar Fluorescentemente

Conjugar cisteínas con el Fluoróforo



Paso 6 Mediciones Flujo-Detenido

Analizar la asociación de IF1 e IF3 de M.tuberculosis a la subunidad 30S

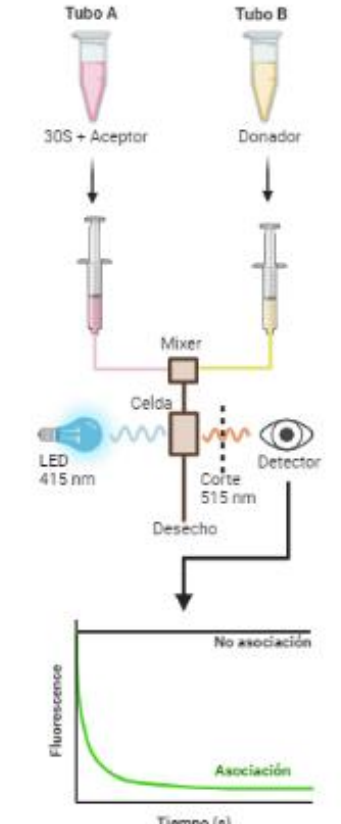


Figura 7: Diagrama de la metodología usada

5.5.1 Análisis *in silico* de las secuencias y estructuras de las proteínas IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*.

5.5.1.1 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de *Mycobacterium tuberculosis* y de *E. coli*

Se tomaron las secuencias de aminoácidos nativas de IF1 (Accesion ID: Rv3462c) e IF3 (Accesion ID: Rv1641) de *M. tuberculosis* (*Mtb*-IF1 y *Mtb*-IF3) de la base de datos de Biocyc (P. D. Karp et al., 2018). Se tomaron las secuencias de aminoácidos nativas de IF1 (Accesion ID: EG10504) e IF3 (Accesion ID: EG10506) de *E. coli* (*Ec*-IF1 y *Ec*-IF3) de la base de datos de Ecocyc (Keseler et al., 2021). Se realizó y se analizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos producidas, Create Alignment del programa CLC Genomics Workbench; y se visualizó en el programa UGENE.

5.5.1.2 Alineamiento de las estructuras tridimensionales de IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y de *E. coli*

Se obtuvieron las estructuras tridimensionales de *Mtb*-IF1 (PDB ID: 3I4O) y *Ec*-IF1 (PDB ID: 1AH9) del Protein Data Bank (Berman et al., 2000). Se realizó un modelado por homología de las secuencias de aminoácidos de *Mtb*-IF3 y *Ec*-IF3 con el servidor Swissmodel (Waterhouse et al., 2018). Se alinearon IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y de *E. coli* en el programa ChimeraX (Pettersen et al., 2021).

Se mutó el Ácido aspártico (D) por una Cisteína (C), en la posición 157 del modelo 3D de *Mtb*-IF3 con el programa Pymol (Schrödinger & DeLano, 2020). Se alinearon *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C} en el programa ChimeraX. Se modeló un Ácido aspártico (D) en la posición 5 de *Mtb*-IF1 con Pymol. Se refinó el loop creado con el servidor ModLoop (Fiser & Sali, 2003). Se mutó el Ácido aspártico (D) por una Cisteína (C), en la posición 5 del modelo 3D de *Mtb*-IF1 con el programa Pymol. Se alinearon *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C} en el programa ChimeraX.

5.5.1.3 Medición de la distancia entre los sitios de marcado fluorescente de IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* en el complejo de pre-iniciación 30S

Se buscó en el Protein Data Bank el modelo estructural bacteriano del complejo de pre-iniciación de la traducción en el estado 1-A (PDB ID: 5LMN) y la subunidad 30S de *E. coli* (PDB ID: 6O7k). En el programa ChimeraX se alinearon los modelos *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-

IF3_{D157C} y la subunidad 30S de *E. coli* a sus homólogos en el modelo del complejo de pre-iniciación 30S. Se midió la distancia entre los átomos de azufre de los residuos de cisteína de *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-IF3_{D157C} con el programa ChimeraX.

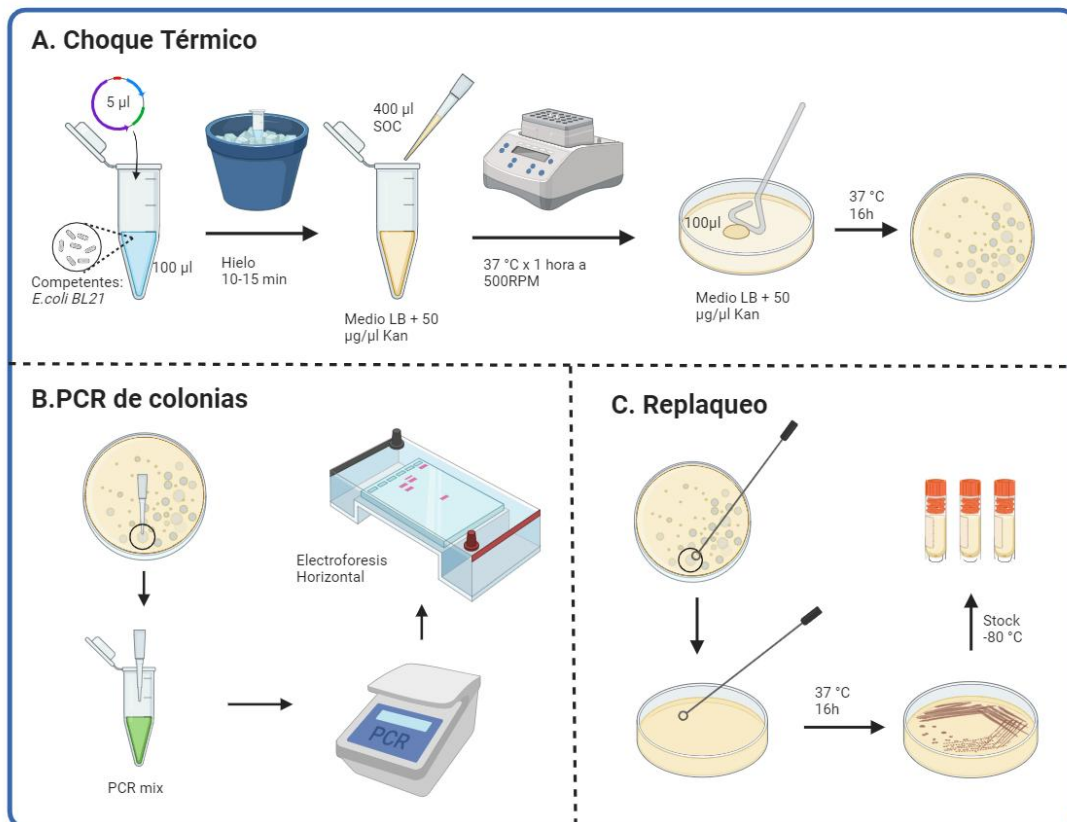
5.5.2 Transformación de células competentes de *E. coli* con los plásmidos correspondientes a las proteínas IF1, IF1_{D5C}, IF3, IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*

Los plásmidos pET-24a+ con los genes *Mtb-infA* e *Mtb-infA*_{D5C} correspondientes a *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C}, y *Mtb-infC* e *Mtb-infC*_{D157C} correspondientes a *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C}, fueron diseñados por José Alberto Nakamoto del Grupo Milón del laboratorio de Biomoléculas y se obtuvieron comercialmente (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

Células competentes BL21 de *E. coli* fueron transformadas con plásmidos con los genes *Mtb-infA*, *Mtb-infA*_{D5C}, *Mtb-infC* e *Mtb-infC*_{D157C}, mediante la técnica de choque térmico, la cual se basa en un cambio drástico de temperatura en conjunto con el uso de iones de calcio (CaCl₂), para volver la membrana celular más permeable. Se mezcló 100 µL de células competentes y 5 µL del plásmido correspondiente (10 ng). Las células se incubaron en hielo por 5-10 minutos. Se añadió 400 µL de caldo de cultivo SOC y se incubó en el termobloque con agitación (Eppendorf) a 37 °C por 1 hora. Se usaron placas con medio LB + Kanamicina 50 µg/µL (Kan) para sembrar 100 µL de las células transformadas, las cuales se esparcieron con un asa de Drigalski. Se realizó una placa para el control de contaminación (medio LB sin sembrar), una para el control de la transformación (células competentes sin transformar, en medio LB con antibiótico) y una placa para el control de la viabilidad de las células competentes (células competentes en medio LB sin antibiótico). Se incubaron las placas a 16 ± 2 h a 37 °C (Paso 2^A). Se halló la eficiencia de transformación con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Colonias transformadas (CFU)}}{\text{ADN plaqueado (}\mu\text{g)}} = \text{Eficiencia de transformación}$$

Paso 2: Transformación



Paso 2: Diagrama de la transformación bacteriana. (A) Choque térmico para introducir el plásmido en las células competentes. (B) PCR de colonias para identificar el plásmido correspondiente en una colonia. (C) Replaqueo para aislar y almacenar la colonia transformada.

Se realizó una PCR de colonias para comprobar que las células transformadas contienen el plásmido con la secuencia de interés (Paso 2^B). Se seleccionaron las dos colonias más grandes, por plásmido transformado, y se marcaron en la base de la placa. Se tomó la décima parte de la colonia con un asa de Drigalski y se sumergió en la mezcla del PCR (Tabla 2). Se incluyó un control negativo (mezcla del PCR sin colonia) y un control positivo (stock de *E. coli* BL21 transformada con un plásmido con el gen correspondiente a la proteína *Ec*-IF3). Se realizó el PCR con los parámetros mostrados en la tabla 3. Se analizaron las muestras mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa de 2 % (p/v). Se usó el marcador de peso molecular de ADN GeneRuler 1 Kb (ThermoFisher) como referencia. Se mezclaron 5 µL de las muestras y del marcador, con 1 µL del stock 6x preparado de solución intercalante

de ácidos nucleicos SYBR Gold, además del colorante de carga de ADN TriTrack, para la visualización y seguimiento de las bandas. Se observó el resultado en un transiluminador de luz azul (Clever Scientific).

Mezcla del PCR		
Componentes	1x	12x
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	7.5 µL	90 µL
Primer T7 Forward	1.5 µL	18 µL
Primer T7 Reverse	1.5 µL	18 µL
Muestra (colonia)	-	-
H ₂ O libre de nucleasas	4.5 µL	54 µL
Volumen Final	15 µL	180 µL

Tabla 2: Componentes y cantidades de la mezcla del PCR.

PCR			
Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min.	1
Desnaturalización	95 °C	30 seg.	20
Hibridación	55 °C	30 seg.	
Elongación	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	5 min	1

Tabla 3: Parámetros usados en el PCR de colonias.

Las colonias positivas, previamente guardadas en placas, fueron plaqueadas nuevamente en placas frescas con medio LB con Kan 50 µg/µL (Paso 2C). Se incubó a 37 °C por 16 h. Se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso. Se inoculó una de las colonias obtenidas en un matraz con 20 mL de LB con Kan 50 µg/µL. Se incluyó un control negativo de contaminación. Se incubó a 37 °C con agitación a 150 RPM por 16 h. Se añadió 618 µL del cultivo resultante

en viales de crio-preservación de 2 mL con 882 μ L de Glicerol al 85 %. Se mezcló invirtiendo hasta homogenizar las 2 fases y se almacenó a -80 °C.

5.5.3 Producción de las proteínas IF1, IF1_{D5C}, IF3 e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*

5.5.3.1 Expresión proteica

5.5.3.1.1 Inducción analítica

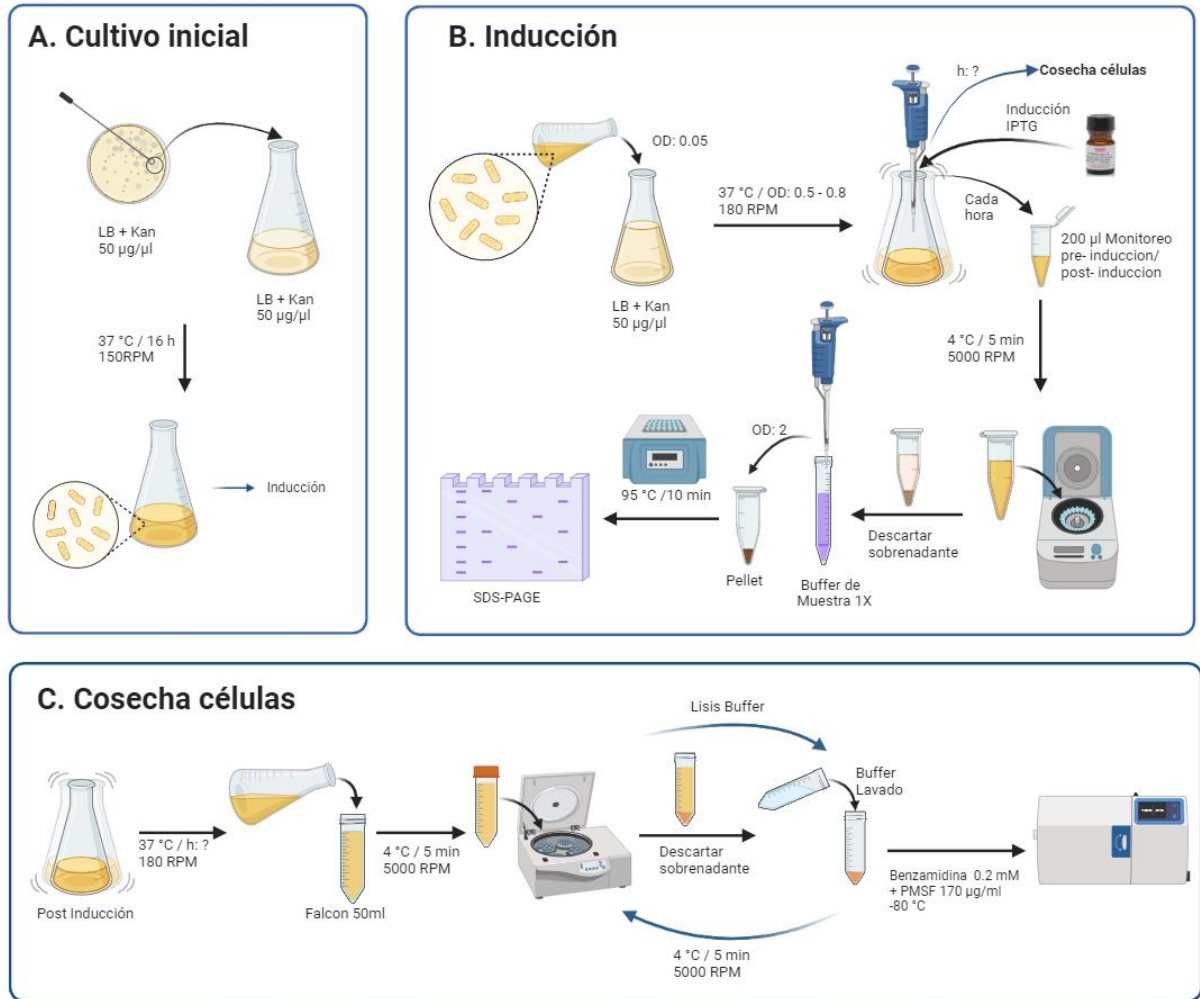
Se inoculó la colonia positiva con el plásmido de interés en un matraz con 20 mL de LB + Kan 50 μ g/ μ L. Se incubó a 150 RPM a 37 °C por 16 h (Paso 3^A). Se transfirió el cultivo inicial a un matraz con 50 mL de LB fresco con Kan 50 μ g/ μ L hasta llegar a un OD₆₀₀ de 0.05 (Paso 3^B). Se incubó a 37 °C con agitación a 150 RPM hasta llegar a un OD₆₀₀ de 0.8. Se tomaron 200 μ L de muestra para el monitoreo de pre-inducción. Se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM para *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C}, y a una concentración final de 0.1-1 mM para *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C}. Se incubó a 37 °C con agitación a 180 RPM por 3-4 horas. Se tomaron 200 μ L de la muestra cada hora para el monitoreo post-inducción y se midió el OD 600 (se mantuvieron las muestras en hielo). Las muestras obtenidas para el monitoreo se centrifugaron a 5000 RPM por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en Buffer de Muestra 1x (SDS, β -mercaptoetanol, Azul de Bromofenol y Glicerol) hasta un OD 600 = 2. Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE para verificar la inducción.

5.5.3.1.2 Inducción preparativa

Se repitió la metodología de la inducción analítica, pero se usó un cultivo inicial con 60 mL LB con Kan 50 μ g/ μ L, y un cultivo de inducción con 1 L de LB con Kan 50 μ g/ μ L para *Mtb*-IF1, *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C} y con 2 L de LB con Kan 50 μ g/ μ L para IF1_{D5C}. Se cosecharon las células después de tres horas de inducción (Paso 3^C). Se transfirió el medio a tubos cónicos de 50 mL (Aproximadamente 45 mL por tubo). Se centrifugó a 5000 RPM a 4 °C (Pre-enfriar a 4°C centrifuga) por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió cada pellet celular en 10 mL de Buffer de Lavado (TAKM10: 25 mM Tris-HCl (pH: 7.4), 70 mM AcNH₄, 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂) y se juntaron en un solo tubo. Se centrifugó a 5000 RPM a 4 °C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió

el pellet celular, en 5 mL por gramo de pellet, con Buffer de Lisis (Buffer A: 25 mM Tris-HCl (pH: 7.1), 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 10% Glicerol y 6 mM β-Mercaptoetanol). Se añadió Benzamidina y PMSF hasta una concentración de 0.2 mM y 170 µg/mL respectivamente. Se almacenó el pellet resuspendido a -80 °C.

Paso 3: Producción



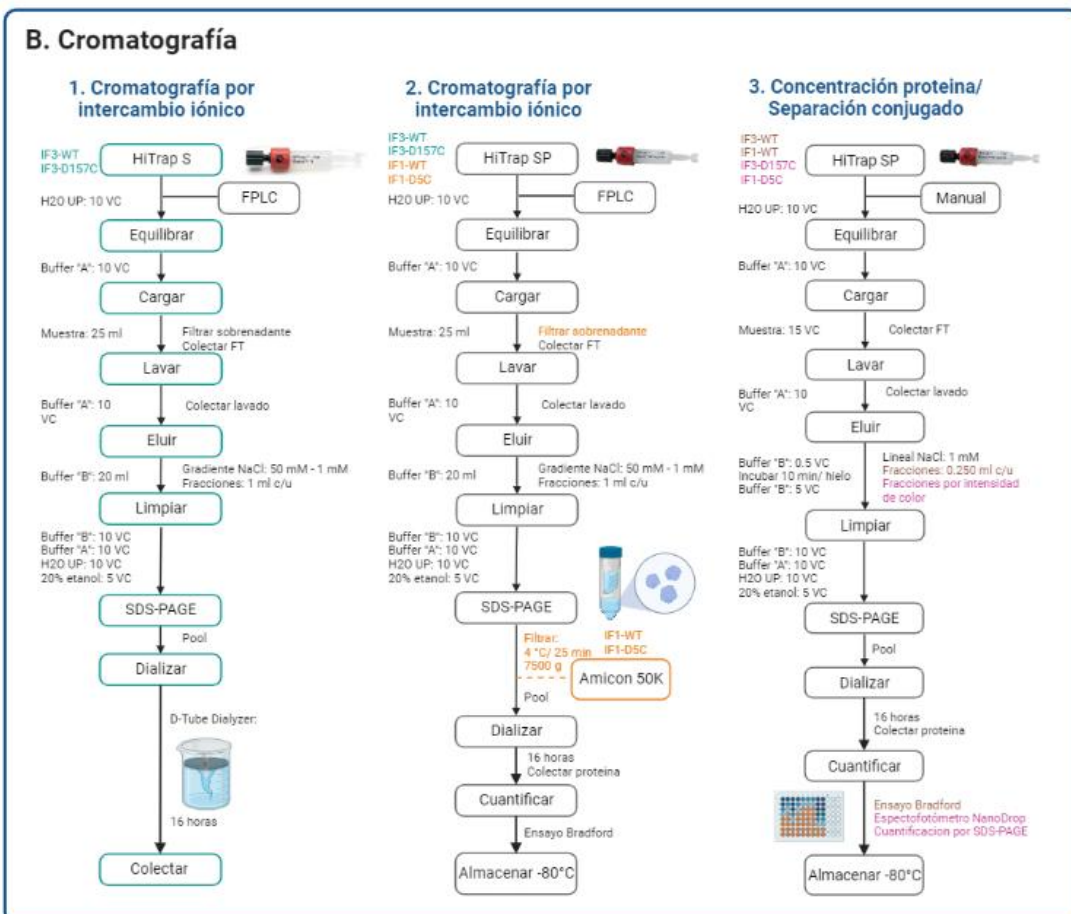
Paso 3: Diagrama de la producción proteica. (A) Cultivo inicial. (B) Inducción de la expresión proteica. (C) Cosecha de células con la proteína correspondiente.

5.5.3.2 Purificación de las proteínas

Se descongeló el pellet celular a 4 °C por aproximadamente 10 minutos (Paso 4^A). Se mezcló manualmente hasta que el pellet celular quedó totalmente en estado líquido. Se lisaron las células mediante sonicación con un homogeneizador ultrasónico Pulse 150 (Benchmark

Scientific) por 10-15 minutos, intercalando 2 segundos de encendido seguido de 3 segundos de pausa, a 50% de intensidad con una sonda de 6 mm de diámetro. Se centrifugó a 11 000 g a 4 °C por 45 minutos. Se transfirió el sobrenadante con proteína de interés a otro tubo falcon nuevo de 50 mL y se conservó el pellet celular. Se mantuvieron el sobrenadante y el pellet en hielo.

Paso 4: Purificación



Paso 4: Diagrama de la purificación proteica. (A) Lisis celular para extraer la proteína. (B) Cromatografía para purificar la proteína.

En el caso de *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C} se realizó una primera purificación por cromatografía de intercambio iónico usando la columna HiTrap 1 mL Capto S (Cytiva) (Paso 4^{B1}). Se limpió la Bomba A, Bomba B y el dispensador de muestra del sistema de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) con 30 mL de H₂O ultrapura (UP). Se conectó la columna HiTrap 1 mL Capto S al sistema FPLC y se removió el Buffer de Almacenamiento (20 % etanol) de la columna con 10 volúmenes de columna (VC) de H₂O UP (Paso 4^{B1}). Se usó una tasa de flujo de 1 mL/s (aproximadamente 1 gota cada 3 segundos). Se equilibró la columna con 10 VC de Buffer A1 (25 mM Tris-HCl (pH: 7.1), 50 mM NaCl, 6 mM B-Mercaptoetanol). Para clarificar el sobrenadante se filtró con una jeringa con filtro de 0,45 µm, para así evitar atascamientos en la columna. Se diluyó el filtrado con Buffer A1 hasta 20 mL, se cargó en la columna y se colectó el lisado no unido (FT) en un tubo cónico de 50mL. Se lavó la columna con 10 VC de Buffer A1. Se recolectó el lavado en un tubo cónico de 15 mL. Se eluyó con una gradiente de 0 % a 100 % (20 VC) de Buffer B1 (25 mM Tris-HCl (pH: 7.1), 1 M NaCl, 6 mM B-Mercaptoetanol). Se colectaron fracciones de 1 mL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se limpió la columna con 10 VC de Buffer B1, 10 VC de Buffer A1, 10 VC de H₂O UP y 5 VC de etanol 20 %. Se verificó cada fracción recolectada en la purificación, el pellet, el sobrenadante (SN), el lisado no unido (FT) y el lavado mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15% (100 voltios por 15 minutos, 200 voltios por 43 minutos). Se juntaron las fracciones considerando pureza y cantidad. Se dializaron las fracciones en un tubo de diálisis D-Tube Dialyser Maxi de límite de peso molecular (MWCO-Molecular Weight Cut-off) de 12-14 kDa, para *Mtb*-IF3 y *Mtb*-IF3_{D157C}; adicionalmente, se utilizó 1 L de Buffer de Almacenamiento (25 mM Tris-HCl (pH: 7.1), 200 mM NH₄Cl, 10 % Glicerol, 6 mM β-Mercaptoetanol) o Buffer de Marcado (25 mM Tris-HCl (pH: 7.1), 100 mM NH₄Cl, 10 % Glicerol) respectivamente, a 4 °C por 16 h. El siguiente día se colectó la proteína dializada en tubos de 1.5 mL y se centrifugó a 14 000 RPM por 15 min a 4 °C.

Para *Mtb*-IF3, *Mtb*-IF3_{D157C}, *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C} se realizó una nueva purificación por cromatografía de intercambio iónico, pero usando la columna HiTrap 1 mL Capto SP (Cytiva) (Paso 4^{B2}). Para *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C}, se repitieron los pasos realizados en la primera purificación hasta la centrifugación de las proteínas dializadas. En el caso de *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C}, se repitieron los pasos hasta la recolección de las fracciones por pureza y

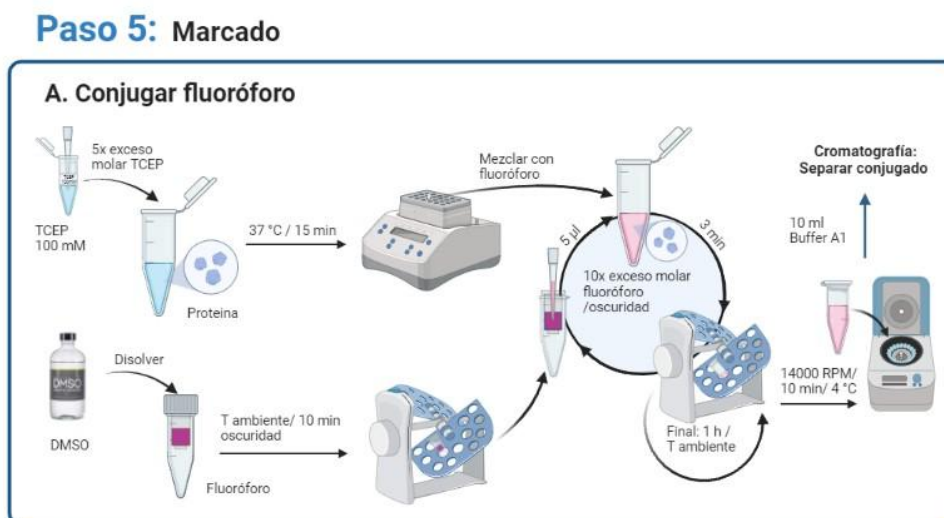
cantidad. Posteriormente, se colocaron en un filtro Amicon 50K y se centrifugaron a 7 500 g a 4 °C por 25 minutos. Luego, las fracciones filtradas se dializaron en un tubo de diálisis D-Tube Dialyser Maxi MWCO de 3.5 kDa, para *Mtb*-IF1 e *Mtb*-IF1_{D5C}; adicionalmente, se utilizó 1 L de Buffer de Almacenamiento o Buffer de Marcado respectivamente, a 4°C por 16 h. El siguiente día, se colectó la proteína dializada en tubos de 1.5 mL y se centrifugó a 14 000 RPM a 4°C por 15 min. Se cuantificó *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C} por ensayo de Bradford, y *Mtb*-IF1 y *Mtb*-IF1_{D5C} por densitometría. Se almacenó a -80 °C.

En el caso de *Mtb*-IF3 se concentró la proteína, usando manualmente la columna HiTrap 1 mL Capto SP (Paso 4^{B3}). Se conectó la columna a una jeringa de 10 mL y se removió el Buffer de Almacenamiento. Se repitió el paso 4^{B1} de equilibrado. Se diluyó la muestra con Buffer A1 hasta 10 mL, se cargó en la columna y se colectó el FT en un tubo cónico de 50 mL. Se repitió el paso 4^{B1} de lavado. Se indujo la elución con 0.5 VC de Buffer B1, se colectó el lisado no unido en un tubo de 1,5 mL. Se incubó la columna en hielo por 10 minutos y se eluyó con 5 VC de Buffer B1. Se colectaron las fracciones de 0.25 mL en tubos de 1.5 mL. Se repitieron el paso 4^{B1} de limpieza de la columna y los pasos posteriores a la cromatografía hasta la cuantificación. Se almacenó a -80 °C.

5.5.4 Marcado Fluorescente de las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*.

Se usó un stock de 100 mM de TCEP (Paso 5^A) y se agregó 5 veces la concentración molar de la proteína blanco. Se incubó a 37 °C con agitación a 200 RPM por 15 minutos. Se disolvió el fluoróforo (Atto 540Q maleimido o Alexa Fluor 488 C5 maleimido) en una cantidad determinada de DMSO que depende de la concentración de la proteína (El volumen de DMSO tiene que ser menor al 5 % del volumen final en el que está disuelto la proteína). Se incubó en el agitador rotatorio a temperatura ambiente por 10 minutos bajo oscuridad para proteger al fluoróforo del contacto con la luz. Se añadió el fluoróforo en 10 veces la concentración molar de la proteína. Se agregó el fluoróforo a la proteína de 5 µL en 5 µL, mezclando cada vez por 3 minutos en el agitador rotativo bajo oscuridad. Al terminar de añadir el fluoróforo, se incubó en el agitador rotativo por 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000 RPM por 10 minutos a 4 °C. Se transfirió la proteína a un tubo de 15 mL y se diluyó con Buffer A1 hasta 10 mL, lavando con Buffer A1 toda la proteína residual que queda en las paredes del tubo. El β-mercaptoetanol del Buffer A1 detuvo la reacción de

marcado entre el fluoróforo y la proteína. Se aisló la proteína conjugada con el fluoróforo mediante cromatografía (Paso 4^{B3}).



Paso 5: Diagrama del marcado fluorescente. (A) Conjugación del fluoróforo a la proteína mutante.

Para IF_{3D157C} e IF_{1D5C} se repitió la cromatografía de intercambio iónico realizada en el paso 4^{B3}. En la elución se colectaron las fracciones por intensidad de color fluorescente, una mayor intensidad de color implica mayor concentración de proteína fluorescente. Se verificó cada fracción recolectada en la purificación, el FT y el lavado mediante gel de electroforesis SDS-PAGE al 15% (100 voltios por 15 minutos, 200 Voltios por 43 minutos). Se juntaron las fracciones considerando la intensidad de fluorescencia y el color fluorescente. Se dializaron las fracciones en un tubo de diálisis D-Tube Dialyser Maxi MWCO de 3.5 kDa, para IF_{1D5C}, y de 12-14 kDa, para IF_{3D157C}; adicionalmente se utilizó 1 L de Buffer de Almacenamiento a 4 °C por 16 h. El siguiente día se colectó la proteína en tubos de 1.5 mL. Se centrifugó a 14 000 RPM a 4 °C por 15 min. En el caso de IF_{1D5C} e IF_{3D157C} marcados con Alexa488 se observó precipitado, por ello se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de 1.5 mL. En el caso de IF_{1D5C} e IF_{3D157C} marcados con Atto540Q no se observó precipitado. Se realizaron alícuotas de 30 µL en tubos de 0.5 mL. Se cuantificó la proteína marcada mediante fluorometría, con un espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher), y la proteína total (proteína sin marcar + proteína marcada) mediante densitometría; y, luego, se halló la eficiencia del marcado de la proteína marcada. Se almacenó a -80 °C hasta utilizar.

5.5.5 Cuantificación

5.5.5.1 Cuantificación por Bradford

Se prepararon al menos 5 diluciones seriadas del estándar de proteínas (Albumina de suero bovino - BSA) en placas de 96 pozos, usando buffer de almacenamiento como diluyente, para llegar a una concentración final recomendada de 15 – 250 µg/mL en 10 µL. Además, se realizó un pozo blanco usando solo Buffer de Almacenamiento. Se prepararon al menos 5 diluciones seriadas de las proteínas, en un rango de dilución recomendado de 1:2 – 1:128 en 10 µL. Se añadieron 90 µL de reactivo de Bradford a los 10 µL de cada dilución en la placa. Se mezcló golpeando la placa gentilmente unas 3 - 5 veces. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode (Agilent). Se obtuvo la data bruta y se normalizó mediante la sustracción de la absorbancia del blanco (solo Buffer de Almacenamiento). Se realizó un análisis de regresión lineal de la absorbancia normalizada ($R^2 > 0.98$). Se calculó la concentración de la proteína de interés reemplazando la absorbancia normalizada en la ecuación:

$$Y = m ([X]) + b$$

$$[X] = \frac{Y - b}{m}$$

Donde,

[X]: Concentración de la muestra (mg/mL)

Y: Absorbancia a 595 nm

b: Punto de intersección con el eje Y

m: Pendiente de la recta

Se corrigió la concentración resultante multiplicándola con el factor de dilución respectivo. Se halló la concentración molar de la muestra a partir de la concentración corregida, mediante la siguiente fórmula:

$$M = \frac{n}{V}$$

$$M = \frac{[X]}{MW}$$

Donde,

M: Concentración molar (n / L)

n: Moles (g / Da)

V: Volumen (L)

[X]: Concentración de la muestra (g / L)

MW: Peso Molecular de la muestra (Da)

Se convirtió la concentración molar a micromolar. Se promediaron las concentraciones obtenidas de cada punto.

5.5.5.2 Cuantificación por densitometría en geles SDS-PAGE

Se prepararon al menos 5 diluciones seriadas del estándar de BSA usando buffer de almacenamiento como diluyente, para llegar a una concentración final recomendada de 15 – 250 µg/mL en 10 µL.

Se preparó un stock de BSA, diluido con Buffer de Muestra hasta una concentración final de 0.5 µg/µL. Se prepararon al menos 3 diluciones seriadas de la proteína de interés usando Buffer de almacenamiento y Buffer de Muestra como diluentes. Se calentaron las diluciones a 95 °C por 5 minutos y se centrifugaron brevemente. Se prepararon los geles de SDS-PAGE con el porcentaje requerido para la proteína de interés. Se realizó un gradiente en el gel con al menos 4 volúmenes crecientes de la dilución de la proteína estándar (BSA a una concentración de 0.5 µg/µL) en un rango recomendado entre 0,5 µg – 3,5 µg. Se cargaron las diluciones de la proteína de interés en el gel y se hizo la electroforesis a 100 voltios por 15 minutos, seguido de 200 voltios por 45 minutos. Se tiñó el gel con Azul de Coomassie por 15 minutos y se destiñó con Solución de Desteñido (20 % etanol + 10 % ácido acético glacial + 70 % H₂O destilada). Se analizó la densidad de las bandas en las imágenes del gel con el programa ImageJ. Se aplicó el análisis de regresión lineal mencionado en el punto 5.5.5.1.

5.5.5.3 Cuantificación por fluorometría

*Para cuantificar la proteína marcada se usó un espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher).

Para cuantificar la proteína marcada con Alexa 488 se utilizó la longitud de onda = 495 nm, y para Atto 540 = 543 nm. Se utilizó Buffer Almacenamiento como blanco. Se utilizó 2 μ L de la muestra medidos por triplicado. El resultado se promedió y se determinó la concentración molar de la muestra mediante la ecuación de la Ley de Lambert y Beer:

$$A = \varepsilon \times C \times l$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

Donde,

A: Absorbancia de la muestra

ε : Coeficiente de extinción molar (Atto 540Q: 105 000 $M^{-1} cm^{-1}$; Alexa 488: 73 000 $M^{-1} cm^{-1}$)

l: longitud de la columna líquida (NanoDrop One: 1 cm)

C: Concentración molar de la muestra (M)

5.5.5.4 Eficiencia del Marcado

Se dividió la concentración micromolar de la proteína marcada, hallada mediante fluorometría, entre la concentración micromolar de la proteína total (proteína marcada + proteína sin marcar) hallada mediante densitometría; y se multiplicó por 100 %:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Proteína marcada}}{\text{Proteína total}} \times 100 \%$$

5.5.6 Asociación de IF3 e IF1 de *M. tuberculosis* a la subunidad 30S usando un sistema heterólogo intermolecular FRET

Se utilizó un espectrofluorímetro de flujo-detenido SX20 (Applied Phtophysics) para las mediciones de fluorescencia en flujo detenido. Se usó una fuente de luz LED para excitar el

fluoróforo. La longitud de onda de excitación del Alexa 488 fue de 470 nm. La señal de emisión fue medida después de pasar por un filtro de corte óptico de 515 nm. Se midieron 1000 puntos en escala logarítmica por cada réplica.

Antes del procedimiento, se degasó H₂O y TAKM₇ (50mM Tris (pH: 7.5), 70 mM NH₄Cl 30 mM KCl. 7 mM MgCl₂, 6mM 2β-Mercaptoetanol). Se activaron las subunidades 30S con TAKM₁₄₀ (50mM Tris (pH: 7.5), 70 mM NH₄Cl 30 mM KCl. 140 mM MgCl₂, 6mM 2β-Mercaptoetanol), a 37 °C por 30 minutos. Todas las muestras fueron preparadas en TAKM₇. Para las reacciones se usaron las siguientes concentraciones: 0.1 μM 30S, 0.3 μM aceptor, 0,1 μM donador. Se cargaron las muestras en la respectiva jeringa de bombeo. Se definió el voltaje (PM volts) y el tiempo a usar (si no se sabe el tiempo que toma la reacción, se adquirió primero una medición con amplio tiempo, ej.: 100 s). Las reacciones se realizaron a 25°C, se adquirieron 5–8 réplicas por reacción y se promediaron. Se analizaron los cambios de fluorescencia a través del tiempo en el programa GraphPad. Se removió la línea base de la data bruta. Se añadió un factor de amplificación equivalente a la mayor amplitud de la señal emitida. Se evaluaron los datos obtenidos en los experimentos de disociación mediante el ajuste de la función exponencial:

$$F_t = F_\infty - (Ae^{-k_{off}t})$$

Donde,

F_t: Fluorescencia en el tiempo t

F_∞: Fluorescencia final

A: Amplitud de la variación de fluorescencia

K_{off}: Constante de disociación

t: Tiempo

Las constantes de disociación (K_{off}) fueron determinadas bajo condiciones de pseudo primer orden, usando los factores nativos IF1 e IF3 de *E. coli* en un exceso de 10 veces contra el complejo de pre-iniciación 30S.

5.6 Recolección y análisis de datos

Los datos se registraron con los siguientes programas: Microsoft Word, Power Point y Excel. El análisis de datos se hizo con los sucesivos programas: ChimeraX y Pymol para el análisis de los modelos 3D y GraphPad para graficar los cambios de fluorescencia en las reacciones de flujo detenido. La concentración de los factores IF1 e IF3, obtenidos en la expresión de las proteínas, fueron analizados en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA), por SDS-PAGE o en el Synergy H1 microplate reader (BioTek, California, USA). La fluorescencia de los factores IF1 e IF3 marcados con Alexa 488 o Atto 540Q, fue observada mediante un transiluminador de luz azul. Los cambios de fluorescencia en las reacciones de flujo-detenido fueron medidas con un espectrofotómetro de flujo-detenido SX20 (Applied Photophysics, Leatherhead, Inglaterra) y analizadas por el programa Pro-Data SX.

5.7 Ética

Todos los experimentos que se llevaron a cabo en esta investigación fueron realizados *in vitro* en un laboratorio de Bioseguridad nivel I. No se utilizaron muestras humanas o de animales. El agente biológico que se utilizó es la bacteria *E. coli*, el cual es un organismo inocuo, con un bajo potencial de patogenicidad y que es utilizado frecuentemente para la expresión de proteínas recombinantes.

6 RESULTADOS

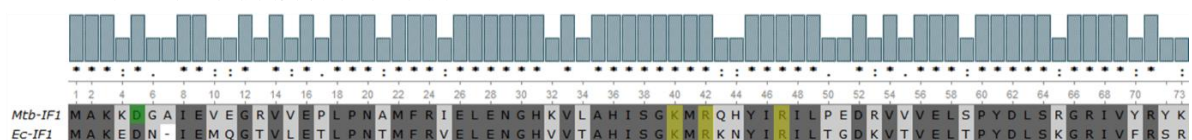
6.1 Análisis *in silico* de las secuencias y estructuras de las IF1, IF3, IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*.

6.1.1 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de *Mycobacterium tuberculosis* y de *E. coli*

El alineamiento entre IF1 nativo (*Wild-type*) de *M. tuberculosis* (*Mtb-IF1*) e IF1 nativo de *E. coli* (*Ec-IF1*) mostró 50 aminoácidos iguales entre ambas secuencias (Fig. 8A). Esto resulta en un 68 % de identidad entre ambas secuencias. También, en amarillo, se encuentran resaltados los 3 residuos funcionalmente importantes en la unión al 30S (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2010). Se observó que estos 3 aminoácidos son idénticos para *E. coli* y para *M. tuberculosis*. Por otro lado, IF1 de *M. tuberculosis* no presenta residuos de cisteínas. Por ello se usó una versión mutante, conocida como *Mtb-IF1_{D5C}*, que tiene una cisteína en la posición 5 que reemplaza un ácido aspártico (D5C) la cual permite su marcado fluorescente.

El alineamiento entre IF3 nativo de *M. tuberculosis* (*Mtb-IF3*) e IF3 nativo de *E. coli* (*Ec-IF3*) mostró 78 aminoácidos iguales entre ambas secuencias (Fig. 8B). Sin embargo, debido a la mayor cantidad de aminoácidos de IF3, esto resulta en una identidad más baja (39 %) que en el caso de IF1. También se señalaron en amarillo los aminoácidos que interactúan con el 16S ARNr, los cuales han sido detectados previamente en IF3 de *T. thermophilus* (Hussain et al., 2016). Se calculó que *M. tuberculosis* y *E. coli* tienen un 40 % de identidad específicamente en esta porción de la secuencia. También se observó que IF3 de *M. tuberculosis* tiene una cisteína en la posición 57 equivalente a la cisteína en la posición 65 de IF3 de *E. coli*. Sin embargo, esta no se encuentra expuesta lo que dificulta su marcado fluorescente (Fig. 10B). Por ello se usó una versión mutante, conocida como *Mtb-IF3_{D157C}*, que tiene una cisteína en la posición 157 que reemplaza un ácido aspártico (D5C) la cual permite su marcado fluorescente.

A. Alineamiento de Secuencias de IF1



B. Alineamiento de Secuencias de IF3

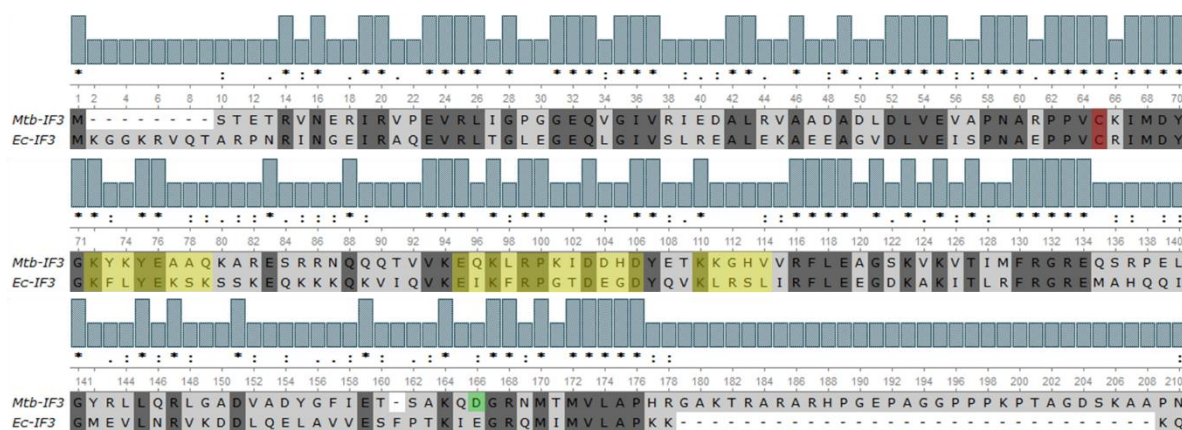


Figura 8: Alineamiento de secuencias. Los aminoácidos conservados están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos no conservados en gris claro. Las posiciones donde se encuentran cisteínas se encuentran resaltados en rojo y los residuos que fueron mutados por cisteínas se encuentran resaltados en verde. (A) Alineamiento de los aminoácidos de IF1 nativo de *M. tuberculosis* (*Mtb-IF1*) e IF1 nativo de *E. coli* (*Ec-IF1*). Se encuentran resaltados en amarillo los residuos funcionalmente importantes en la unión al 30S (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2010). (B) Alineamiento de los aminoácidos de IF3 nativo de *M. tuberculosis* (*Mtb-IF3*) e IF3 nativo de *E. coli* (*Ec-IF3*). Se encuentran resaltados en amarillo los residuos involucrados en la unión al 16S ARNr (Hussain et al., 2016).

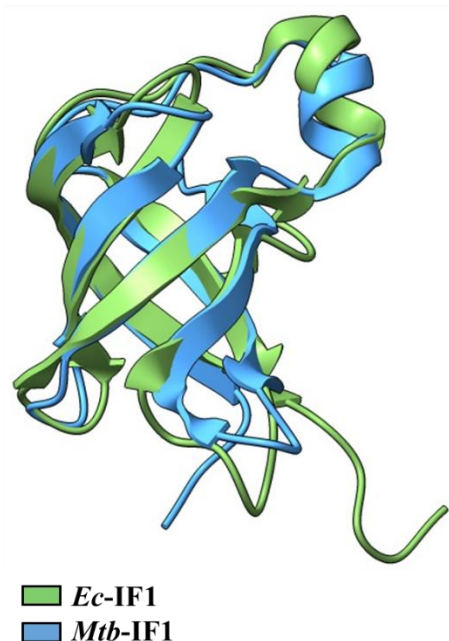
6.1.2 Alineamiento de las estructuras tridimensionales de IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y de *E.coli*.

El alineamiento de los modelos tridimensionales de IF1 e IF3 de *E. coli* y *M. tuberculosis* mostró que estas proteínas, a pesar de tener diferencias en la secuencia primaria de aminoácidos, tienen una estructura y plegamiento similar (Fig. 9). En el caso de IF1, algunos sectores de las láminas- β y α -hélices no se alinean correctamente, sin embargo, la forma de barril β con 5 láminas- β antiparalelas altamente enrolladas y una α -hélice protuberante se mantiene (Fig. 9A). Al comparar ambas estructuras se obtuvo un RMSD de 1.083 Å, lo cual es un bajo valor que indica alta similitud.

En el caso de IF3, las estructuras son altamente semejantes debido a que han sido modeladas a partir de Swiss-Model que usa la misma estructura de IF3 de *Thermus thermophilus* para

generarlas (Fig. 9B). Al comparar ambas estructuras se obtuvo un RMSD de 0.086 Å, un valor que es más bajo que el obtenido para IF1 e indica una muy alta similitud.

A. Comparación 3D de IF1 de *E. coli* y *M. tuberculosis*



B. Comparación 3D de IF3 de *E. coli* y *M. tuberculosis*

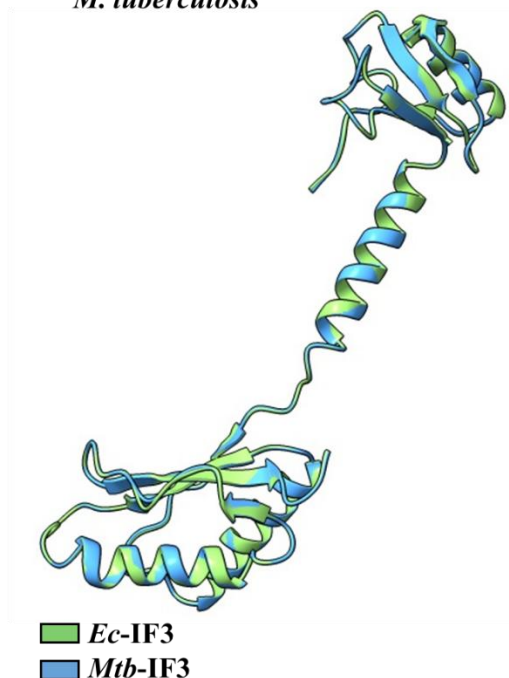


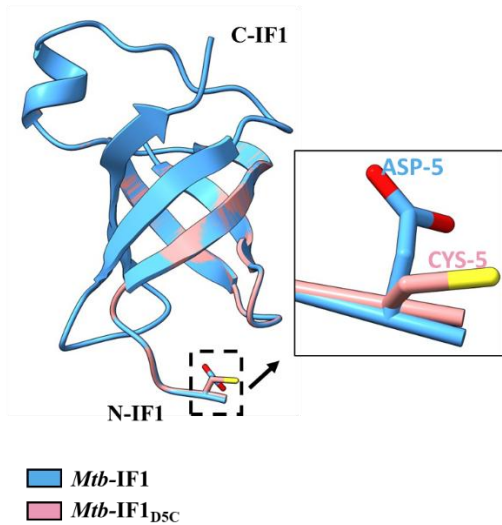
Figura 9: Alineamiento estructural. (A) Alineamiento de los modelos tridimensionales de *Mtb*-IF1 y *Ec*-IF1. (B) Alineamiento de los modelos tridimensionales de *Mtb*-IF3 y *Ec*-IF3.

A continuación, se muestra el modelo tridimensional de *Mtb*-IF1, y el modelo de la versión mutante *Mtb*-IF1_{D5C} con la cisteína (rosa pálido) expuesta (Fig. 10A). La cisteína se encuentra cerca al extremo N-terminal, reemplazando a un ácido aspártico que está en un “loop” poco estructurado, lo que indicaría que es poco probable que la mutación afecte el plegamiento y la función de la proteína nativa.

Por otro lado, *Mtb*-IF3 tiene una cisteína en la posición 57 (celestre metálico). Esta se encuentra en el dominio N-terminal, en una lámina B-plegada y cubierta por la estructura de la proteína, lo que dificultaría su marcado fluorescente (Fig. 10B). Asimismo, *Mtb*-IF3_{D157C} tiene una cisteína extra (rosa pálido), expuesta, que reemplaza a un ácido aspártico en un “loop” del dominio C-terminal. Esta cisteína expuesta fue conjugada con un fluoróforo sin

la necesidad de desnaturalizar la proteína, de tal forma que no se afecta su estructura y función.

A. Comparación 3D de IF1 y IF1_{D5C} de *M. tuberculosis*



B. Comparación 3D de IF3 e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*

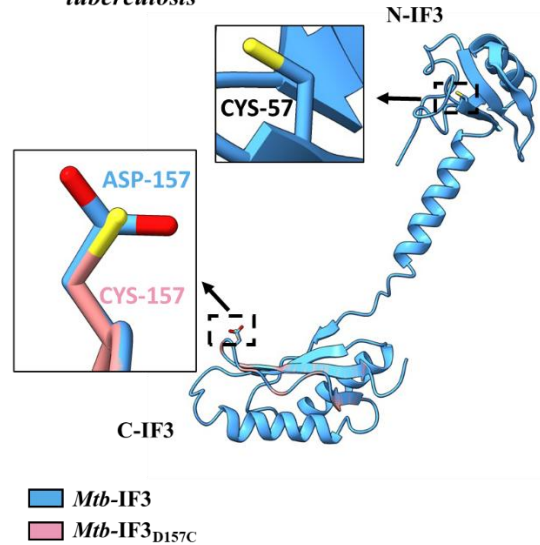


Figura 10: (A) Comparación de los modelos tridimensionales de *Mtb*-IF1 y *Mtb*-IF1_{D5C}. Se muestran los extremos N-terminal y C-terminal de IF1 como N-IF1 y C-IF1 respectivamente. (B) Comparación de los modelos tridimensionales de *Mtb*-IF3 y *Mtb*-IF3_{D157C}. Se muestran los extremos N-terminal y C-terminal de IF3 como N-IF3 y C-IF3 respectivamente.

6.1.3 Medición de la distancia entre los sitios de marcado fluorescente de IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* en el complejo de pre-iniciación 30S

Se alinearon los factores de iniciación *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} a la posición que ocuparían al formarse el 30S PIC. Se observó que estructuralmente estos factores modificados mantienen la estructura necesaria para poder asociarse *in silico* a la subunidad 30S de *E. coli* (Fig. 11A). Además, la medición de la distancia entre los átomos de azufre de las cisteínas mutadas de *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} en la subunidad 30S, resultó en 43.1 Å (Fig. 11B). Este valor se encuentra dentro del rango permitido de 100 Å que permite observar cambios de señal FRET (Algar et al., 2019; Wu et al., 2020).

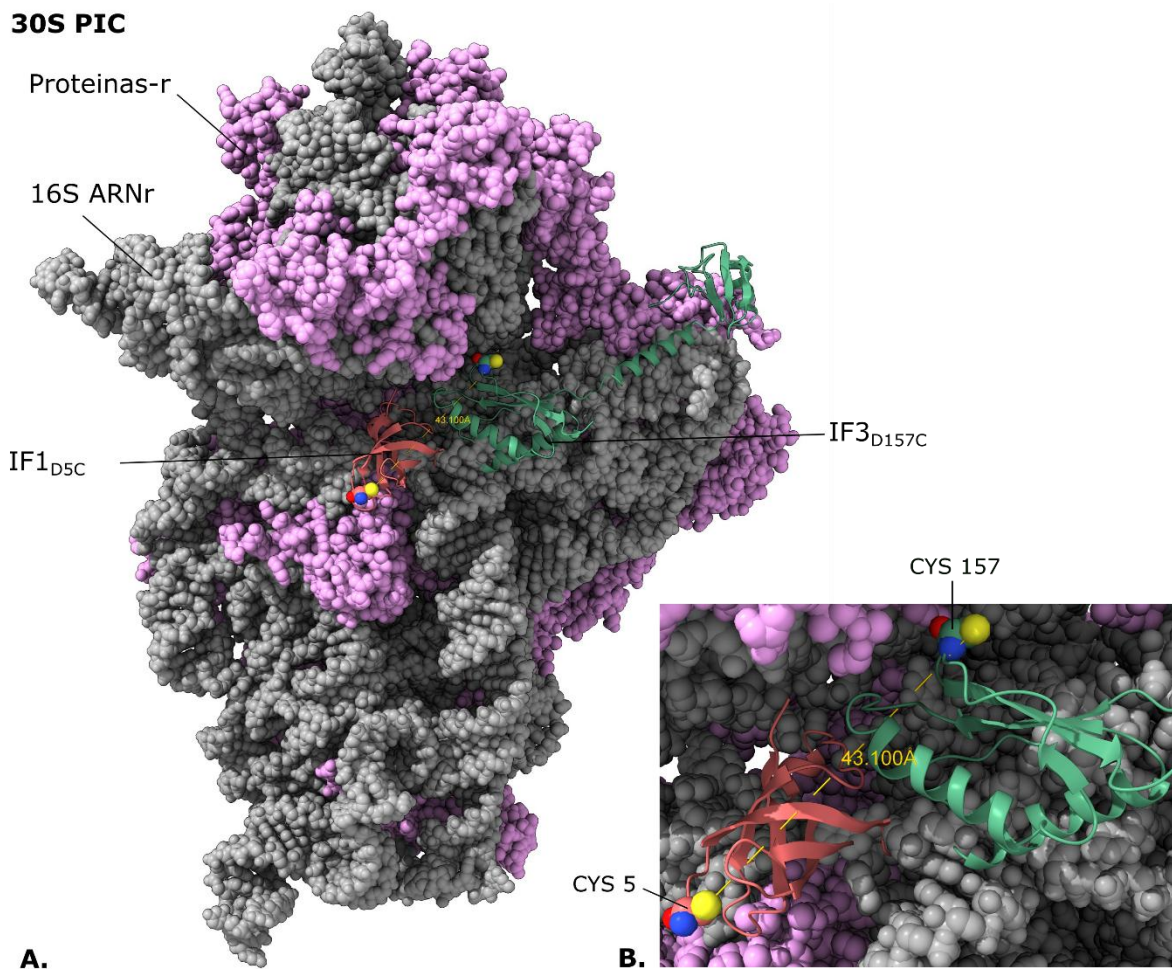


Figura 11: Modelo estructural del complejo de pre-iniciación 30S (30S PIC) de la traducción bacteriana (PDB ID: 5LMN) (Hussain et al., 2016) con los factores de iniciación *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} y la subunidad 30S de *E. coli*. (A) Se muestra *Mtb*-IF1_{D5C} y *Mtb*-IF3_{D157C} alineados a la posición donde se encontrarían al recién formarse el 30S PIC. Las proteínas ribosomales (Proteínas-r) están resaltadas en rosado y el ARN ribosomal (ARNr) en gris. (B) Vista de las cisteínas en la posición 5 de IF1 (CYS 5) y en la posición 157 de IF3 (CYS 157). La distancia calculada entre los átomos de azufre es de 43.100 Å. Los átomos de los residuos de cisteína se encuentran resaltados de distintos colores: El azufre de amarillo, el nitrógeno de azul, el oxígeno de rojo y el carbono se encuentra del color del factor de iniciación al que pertenece.

6.2 Transformación de células competentes de *E. coli* con los plásmidos

correspondientes a las proteínas IF1, IF1_{D5C}, IF3 e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*

Células competentes de *E. coli* BL21 fueron transformadas con los plásmidos pET24a(+) que tienen los genes de *M. tuberculosis* (*Mtb*):*Mtb-infA*, *Mtb-infA*_{D5C}, *Mtb-infC* e *Mtb-infC*_{D157C}. Estas mostraron un crecimiento de colonias óptimo en medio LB con Kanamicina (Fig. 12C, D, E, F). En cada experimento de transformación el control negativo de contaminación no mostró crecimiento proveniente de contaminación cruzada (Fig. 12A). Asimismo, el control de transformación muestra que no hubo crecimiento en medio LB con Kanamicina de células competentes sin transformar (Fig. 12B).

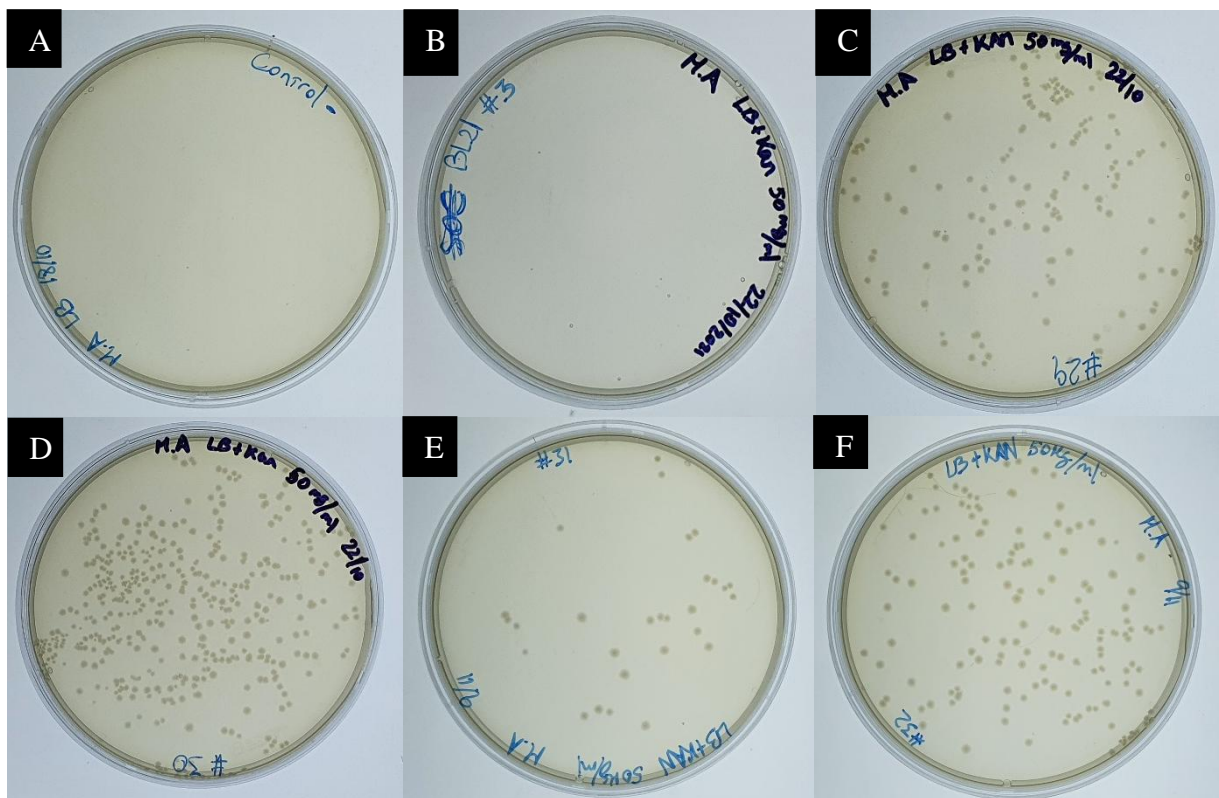


Figura 12: Resultados de la transformación de células competentes de *E. coli* BL21. (A) Control de contaminación. (B) Control de transformación. (C, D, E, F) Células competentes transformadas con los plásmidos que tienen los genes correspondientes a las proteínas *Mtb*-IF1 (C), *Mtb*-IF1_{D5C} (D), *Mtb*-IF3 (E) e *Mtb*-IF3_{D157C} (F).

Las células de *E. coli* transformadas con *Mtb-infA*_{D5C} mostraron la mayor eficiencia de transformación, sin embargo, sus colonias eran más pequeñas comparadas a los transformantes con los otros plásmidos. Por el contrario, las células transformadas con *Mtb*-

infC mostraron la menor eficiencia de transformación, pero sus colonias tenían mayor diámetro que las células transformadas con *Mtb-infA* y *Mtb-infA_{D5C}*, y similar tamaño a las transformadas con *Mtb-infC_{D157C}*.

Eficiencia de Transformación

<i>Plásmido</i>	<i>Mtb-infA</i>	<i>Mtb-infA_{D5C}</i>	<i>Mtb-infC</i>	<i>Mtb-infC_{D157C}</i>
#Colonias (CFU)	137	343	28	138
ADN plaqueado (μg)	0,002	0,002	0,002	0,002
<i>Eficiencia (CFU / μg)</i>	6.9×10^4	17.2×10^4	1.4×10^4	6.9×10^4

Tabla 4: Eficiencia de Transformación de las células competentes de *E. coli* BL21 transformadas con *Mtb-infA*, *Mtb-infA_{D5C}*, *Mtb-infC* e *Mtb-infC_{D157C}*.

Para confirmar que el plásmido con la secuencia de interés estuviera presente en las colonias transformadas, se realizó una prueba de PCR de colonias para el vector pET24a(+) usando los cebadores para el promotor T7: 5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG G- 3'; y para el terminador T7: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G- 3' (Fig. 13). Se analizaron dos colonias transformadas con *Mtb-infC* (*Mtb-InfC*(A) e *Mtb-InfC*(B)) y dos con *Mtb-infC_{D157C}* (*Mtb-infC_{D157C}*(A) e *Mtb-infC_{D157C}*(B)), en todos los casos se obtuvieron bandas esperadas de aproximadamente 861 pb que corresponden al tamaño del fragmento esperado para IF3. También se analizaron dos colonias transformadas con *Mtb-infA* (*Mtb-infA*(A) e *Mtb-infA*(B)) y dos con *Mtb-infA_{D5C}* (*Mtb-infA_{D5C}*(A) e *Mtb-infA_{D5C}*(B)), en todos los casos se obtuvieron bandas esperadas de aproximadamente 477 pb. No se observó ninguna banda para el control negativo (C-), indicándonos que no hubo contaminación de DNA en el proceso. Se uso como control positivo un stock previamente caracterizado de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET24a(+) con el gen de *infC* para *E. coli* (*Ec-infC*).

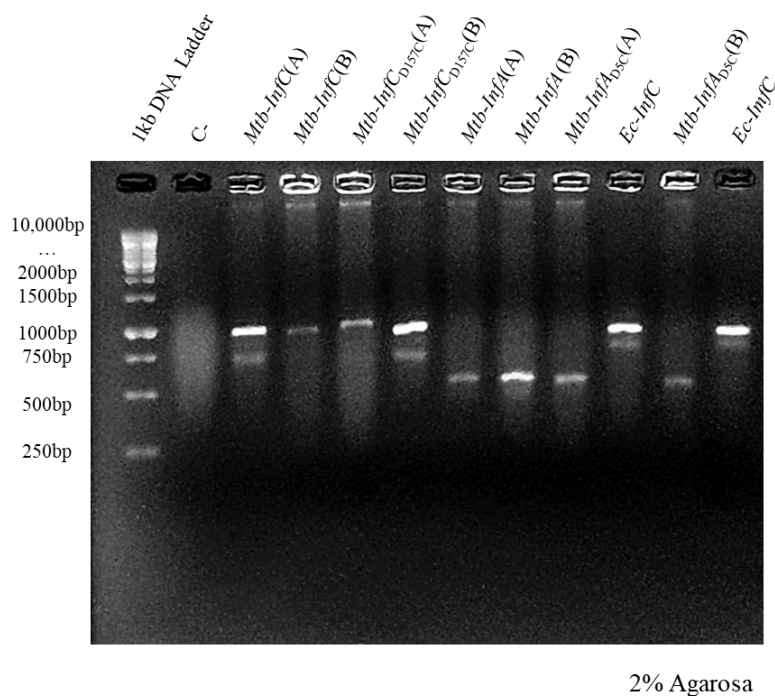


Figura 13: PCR de colonias a *E. coli* BL21 transformada con los plásmidos pET24a (+) con los genes de *M. tuberculosis* (*Mtb*): *Mtb-infC*, *Mtb-infC*_{D157C}, *Mtb-infA*, *Mtb-infA*_{D5C}. Se procesaron 2 colonias por plásmido transformado (A y B). Se incluyó un control negativo (C-) y un control positivo (*Ec-infC*). El control positivo se realizó de un stock de *E.coli* BL21 transformada con el plásmido pET24a(+) que contiene el gen de *E.coli* (*Ec*): *Ec-infC*.

6.3 Producción de las proteínas IF1, IF1_{D5C}, IF3 e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*.

6.3.1 Expresión proteica

6.3.1.1 Expresión analítica

Se determinaron las condiciones óptimas de expresión de las colonias transformadas con plásmidos que tienen los genes correspondientes a las proteínas de *M. tuberculosis*: *Mtb-IF1*, *Mtb-IF1*_{D5C}, *Mtb-IF3*, *Mtb-IF3*_{D157C}. Se optimizó la expresión de *Mtb-IF1* a 3 horas post inducción con IPTG de 1 mM y 0.1 mM (Fig. 14A). Debido a las variaciones observadas en los niveles de expresión de *Mtb-IF1*_{D5C} se realizó la expresión de dos colonias distintas, A y B. Se observó mayor expresión de la colonia A a las 3 horas post inducción con 0.5 mM de IPTG. Se usó la colonia A para la expresión preparativa (Fig. 14B).

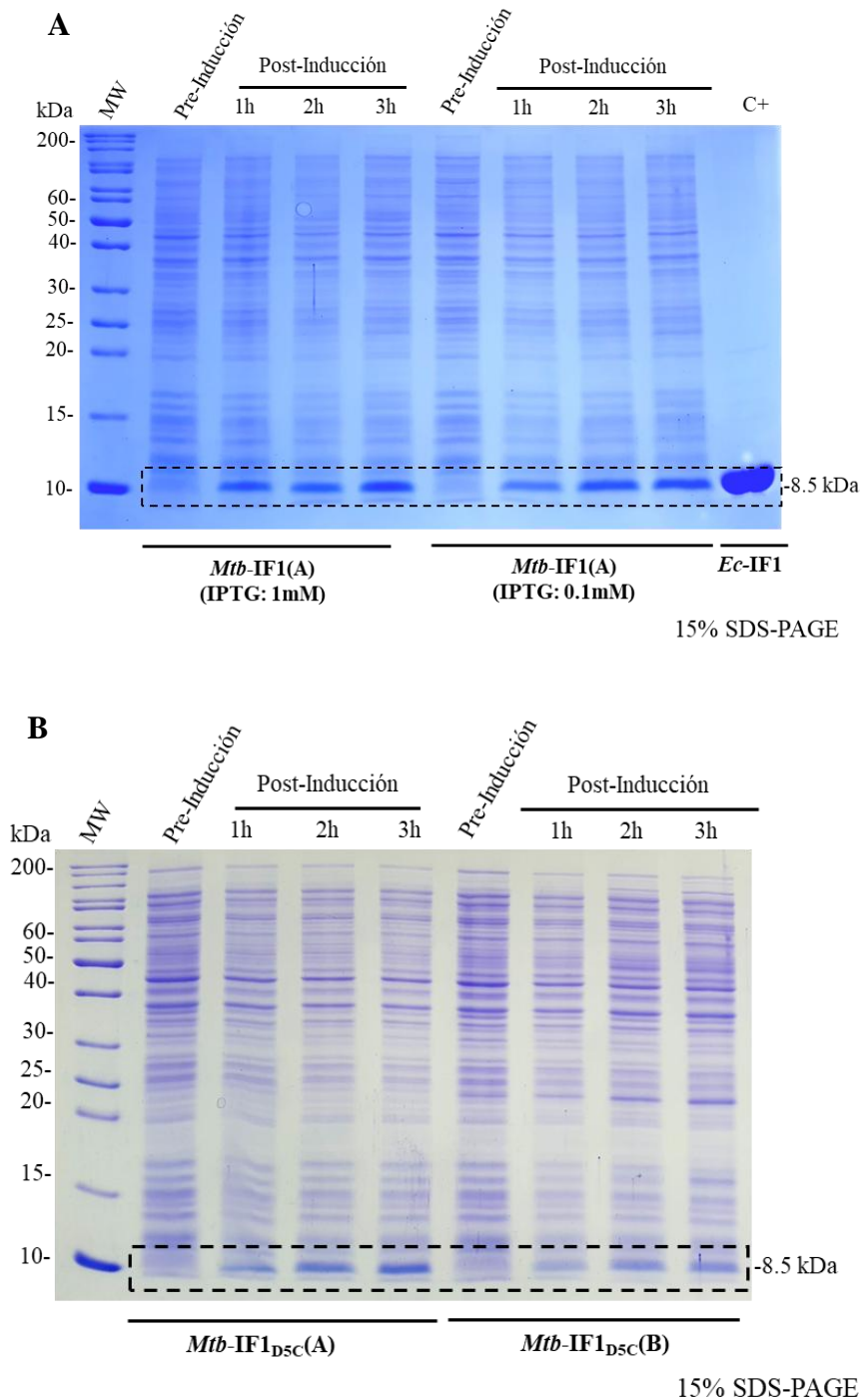


Figura 14: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la expresión analítica de *Mtb*-IF1 usando una misma colonia inducida a concentraciones de 0.1 mM y 1 mM IPTG. Se usó como control positivo, para verificar el tamaño de la banda, a la proteína IF1 de *E. coli* (*Ec*-IF1). (B) SDS-PAGE de la expresión analítica de *Mtb*-IF1_{D5C} usando las colonias A y B a 0.5 mM IPTG.

En el caso de *Mtb*-IF3 y *Mtb*-IF3_{D157C} se optimizó la expresión a 3 horas post inducción con 1 mM IPTG de dos colonias distintas (A y B) para cada uno. Se usó la colonia B para la expresión preparativa de *Mtb*-IF3 (Fig. 15A), y la colonia A para *Mtb*-IF3_{D157C} (Fig. 15B).

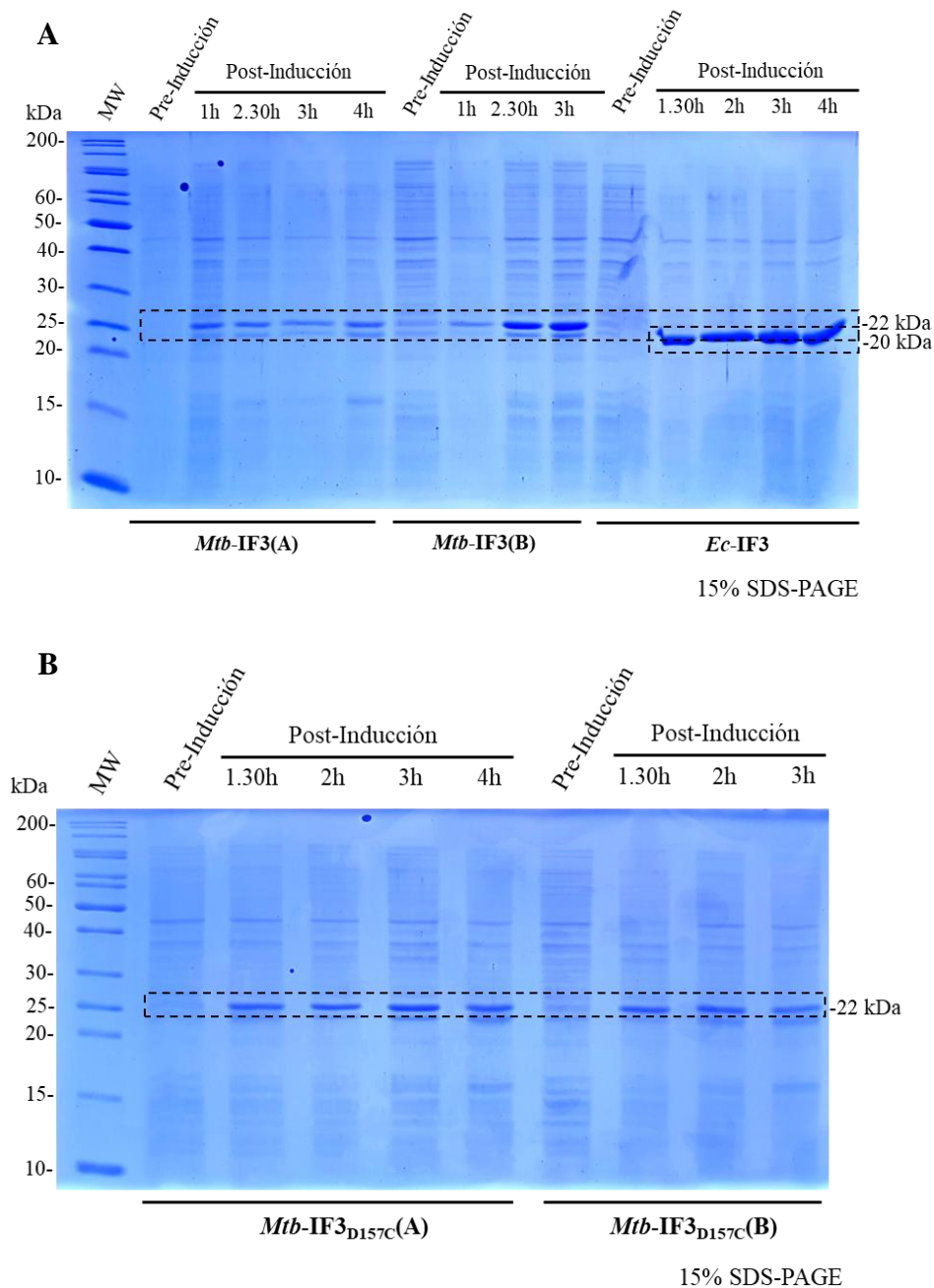
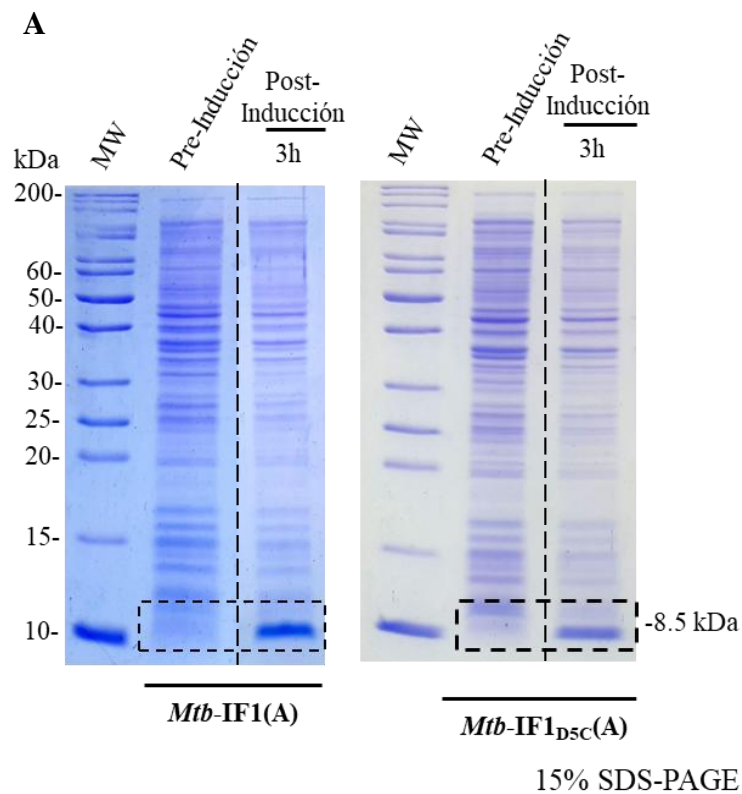


Figura 15: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la expresión analítica de *Mtb*-IF3 usando 2 colonias distintas: A y B. Se usó como control positivo un stock previamente caracterizado que expresa la proteína de *E. coli*: *Ec*-IF3. (B) SDS-PAGE de la expresión analítica de *Mtb*-IF3_{D157C} usando 2 colonias diferentes: A y B.

6.3.1.2 Expresión preparativa

A partir de las condiciones optimizadas de la expresión analítica, se realizó la expresión preparativa. Se expresaron las proteínas *Mtb*-IF1, *Mtb*-IF1_{D5C}, *Mtb*-IF3 e *Mtb*-IF3_{D157C} a 3 horas post inducción a 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM e 1 mM IPTG respectivamente. (Fig. 16A, B). En el caso de *Mtb*-IF1_{D5C} se trabajó con un volumen mayor de cultivo (2 L) debido a que se observó menor expresión en la inducción analítica. Mientras que para *Mtb*-IF3, *Mtb*-IF3_{D157C} e *Mtb*-IF1 se obtuvieron las proteínas a partir de 1 L de cultivo celular (Anexos - Tabla 4).



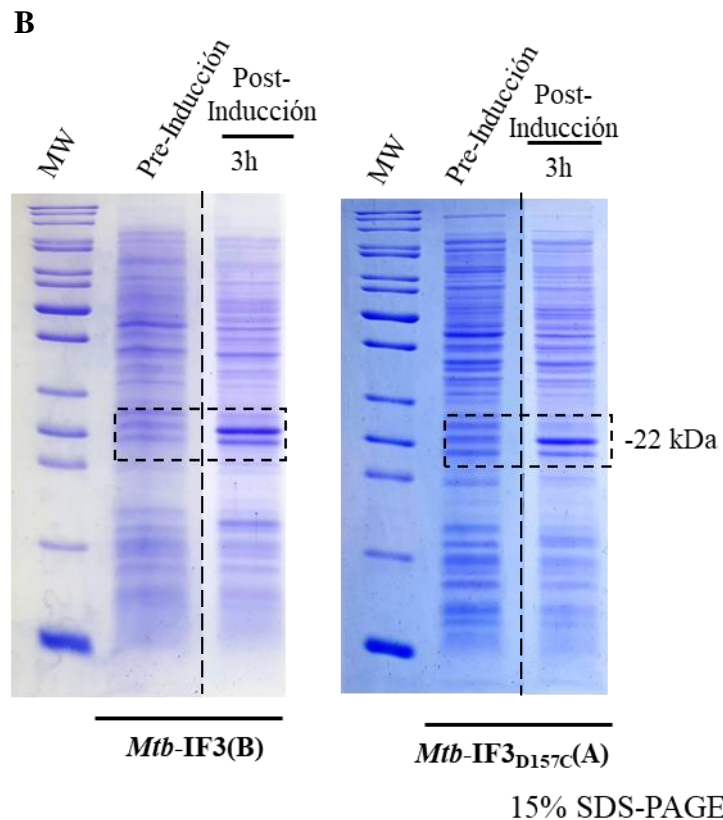
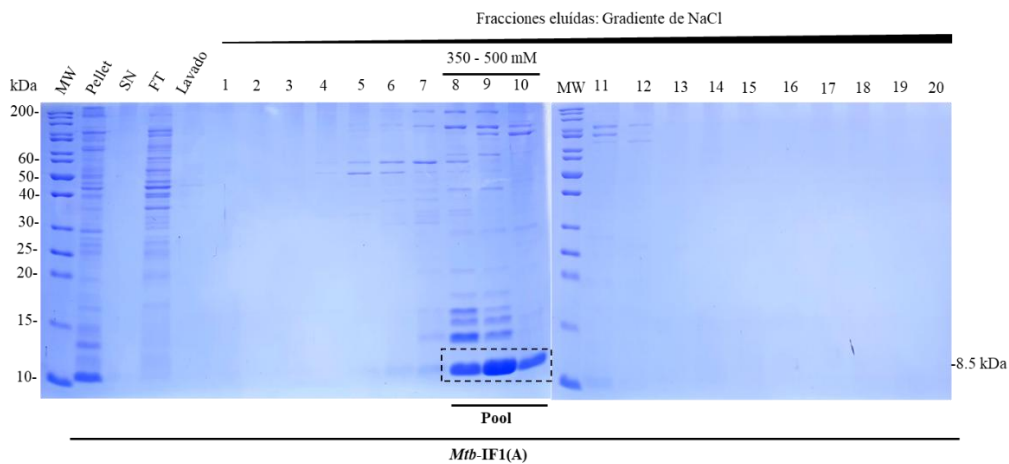


Figura 16: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la expresión preparativa de *Mtb-IF1* e *Mtb-IF1_{D5C}* con 3 horas de inducción con 0.1 mM e 0.5 mM IPTG respectivamente. (B) SDS-PAGE de la expresión preparativa de *Mtb-IF3* e *Mtb-IF3_{D157C}* con 3 horas de inducción con 1 mM IPTG.

6.3.2 Purificación de las proteínas.

A partir de los pellets celulares producidos en la expresión preparativa, se purificaron las proteínas: *Mtb-IF1*, *Mtb-IF1_{D5C}*, *Mtb-IF3* y *Mtb-IF3_{D157C}*. Se purificó *Mtb-IF1* en dos pasos. En el primer paso de la purificación se usó la columna de cromatografía de intercambio catiónico HiTrap Canto SP, y se obtuvo la proteína a una gradiente de concentración de NaCl de 350-500 mM pero con presencia de bandas contaminantes de alto peso molecular (Fig. 17A). Para eliminar los contaminantes se purificaron las fracciones correspondientes en un segundo paso de filtración y centrifugación, y se obtuvo *Mtb-IF1* con un grado de pureza del 87 % (Fig. 17B).

A. Cromatografía de intercambio iónico: HiTrap Capto-SP



B. Post-Amicon 50 K

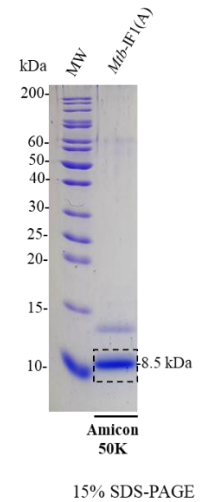


Figura 17: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la purificación de *Mtb*-IF1 mediante cromatografía de intercambio iónico. Se usó una columna de intercambio catiónico: HiTrap Capto SP 1 mL; y una gradiente de NaCl de 0.05-1M en 20 fracciones de 1 mL cada una. (B) SDS-PAGE del pool de *Mtb*-IF1 filtrado por Amicon 50K. El pellet, el sobrenadante (SN), el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 10 a 200 kDa.

De igual manera, se purificó *Mtb*-IF1_{D5C} utilizando una columna de cromatografía de intercambio catiónico HiTrap Capto SP, y se obtuvo la mayor cantidad de proteína a una gradiente de NaCl de 450-600 mM con la presencia de bandas contaminantes de alto peso molecular (Fig. 18A). Posteriormente se purifican las fracciones correspondientes obtenido mediante filtración y centrifugación con un y se obtuvo *Mtb*-IF1_{D5C} con un grado de pureza del 99 % (Fig. 18B).

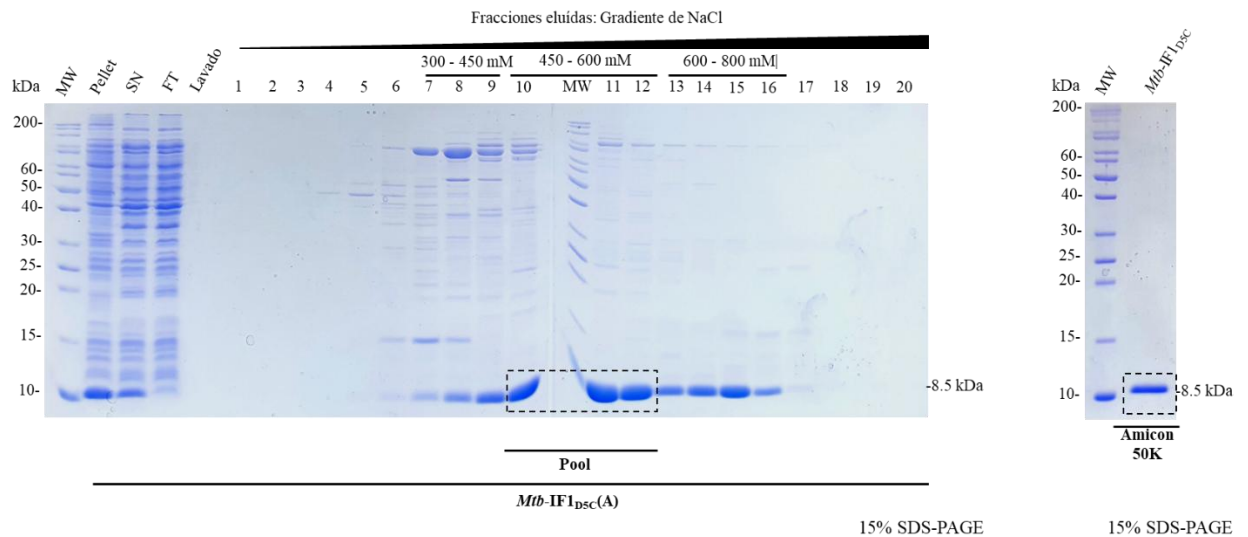
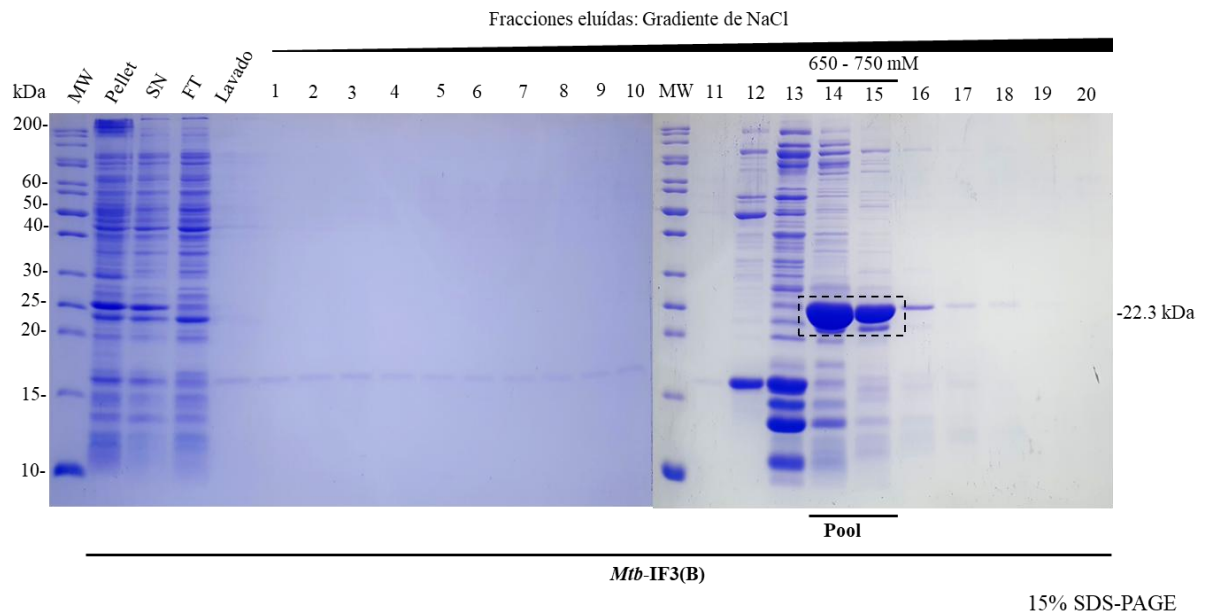
A. Cromatografía de intercambio iónico: HiTrap Capto-SP**B. Post-Amicon 50 K**

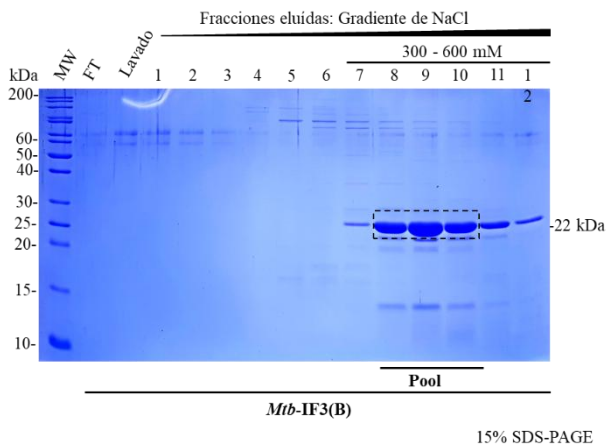
Figura 18: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la purificación de *Mtb-IF1_{D5C}* mediante cromatografía por intercambio iónico. Se usó una columna de intercambio catiónico: HiTrap Capto SP; y una gradiente de NaCl de 0.05-1 M en 20 fracciones de 1 mL cada una. (B) SDS-PAGE del pool de *Mtb-IF1_{D5C}* filtrado por Amicon 50K. El pellet, el sobrenadante (SN), el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 10 a 200 kDa.

Para *Mtb-IF3* se utilizaron dos pasos de purificación por cromatografía de intercambio catiónico y un paso de concentración. Primero se obtuvo *Mtb-IF3* usando la columna HiTrap Capto-SP, a una gradiente de NaCl de 650-750 mM (Fig. 19A). Posteriormente, para eliminar los contaminantes se purificaron las fracciones obtenidas del paso anterior con una columna HiTrap Capto-S. Se obtuvo la proteína a una gradiente de concentración de NaCl de 350–500 mM (Fig.19B). Finalmente se concentró la proteína usando la columna HiTrap Capto-SP nuevamente y se obtuvieron 4 fracciones con gran cantidad de proteína y un grado de pureza del 80 % (Fig. 19C).

A. Cromatografía de intercambio iónico: HiTrap Capto-SP



B. Cromatografía de intercambio iónico: HiTrap Capto-S



C. Cromatografía de intercambio iónico: HiTrap Capto-SP

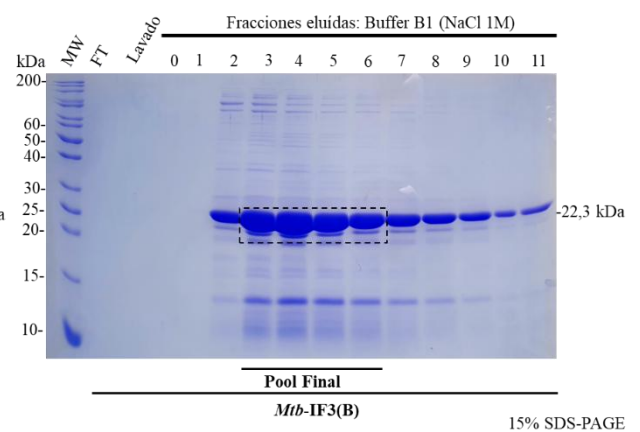


Figura 19: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la purificación de *Mtb*-IF3 mediante cromatografía de intercambio iónico con una columna HiTrap Capto SP 1 mL y una gradiente de NaCl de 0.05-1M en 20 fracciones de 1 mL cada una. (B) SDS-PAGE del segundo paso de purificación del pool de *Mtb*-IF3 mediante cromatografía de intercambio iónico con la columna Capto S 1mL y una gradiente de NaCl de 0.05-1M en 20 fracciones de 1 mL cada una. (C) SDS-PAGE de la concentración del pool de *Mtb*-IF3 mediante cromatografía de intercambio iónico con una columna Capto SP y una gradiente de NaCl de 1M en 20 fracciones de 0.25 mL cada una. El pellet, el sobrenadante (SN), el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 10 a 200 kDa.

Se obtuvo *Mtb*-IF3_{D157C} mediante cromatografía de intercambio catiónico usando una columna HiTrap Capto-S y una gradiente de concentración de NaCl de 350-600 mM (Fig. 20A). Se observaron contaminantes de bajo peso molecular, por lo que se purificó nuevamente la proteína con una columna HiTrap Capto-SP. Se obtuvo la proteína a una gradiente de NaCl de 700-750 mM con un grado de pureza del 94 % (Fig. 20B).

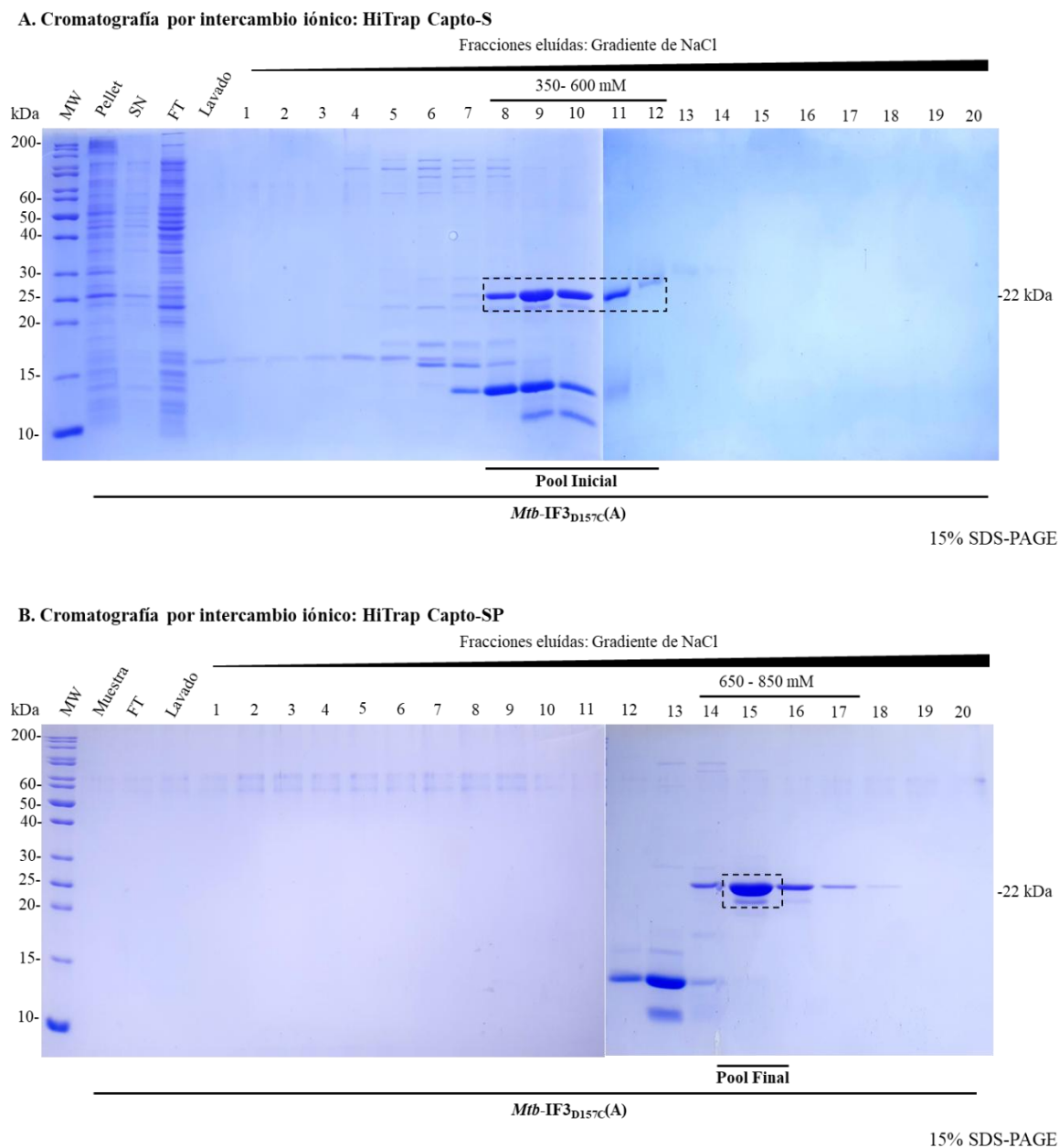


Figura 20: (A) Resultados de electroforesis en geles SDS-PAGE de la purificación de *Mtb*-IF3_{D157C} mediante cromatografía por intercambio iónico usando columna Capto S 1mL, y una gradiente de NaCl de 0.05-1 M en 20 fracciones de 1 mL cada una. (B) SDS-PAGE del

segundo paso de purificación del pool de *Mtb-IF3_{D157C}* mediante cromatografía de intercambio iónico usando la columna Capto SP 1mL, y un gradiente de NaCl de 0.05-1M en 20 fracciones de 1 mL cada una. El pellet, el sobrenadante (SN), el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 10 a 200 kDa.

Todas las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante Bradford (Tabla 5). Las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}*, y *Mtb-IF3_{D157C}* se obtuvieron en mayor cantidad, pureza y en concentraciones entre 40 - 60 μ M, ideales para el marcado fluorescente. Las proteínas nativas no se marcaron y fueron usadas directamente en el sistema heterólogo intermolecular FRET (Tabla 5).

Dato	<i>Mtb-IF1</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>
<i>Concentración</i>	15.5 μ M	43 μ M	60 μ M	51 μ M
<i>Volumen</i>	3 mL	2.05 mL	0.6 mL	1 mL
<i>Cantidad</i>	46.5 nmol	88.2 nmol	36 nmol	51 nmol
<i>Pureza</i>	87 %	99 %	80 %	94 %

Tabla 5: Concentración, volumen y cantidad en nanomoles (nmol) de las proteínas producidas *Mtb-IF1*, *Mtb-IF1_{D5C}*, *Mtb-IF3* y *Mtb-IF3_{D157C}*.

También, a partir de las cuantificaciones obtenidas mediante Bradford, se calcularon los miligramos de proteína producida, los cuales se dividieron con los gramos de pellet (peso mojado) que se utilizaron en la purificación, para obtener el índice de productividad (Tabla 6). Se observó que *Mtb-IF1_{D5C}* es la proteína que se obtuvo en mayor cantidad; sin embargo, se usaron más gramos de pellet celular para producirla. Además, debido a la baja masa molecular de IF1 se obtuvieron menos miligramos por gramo de pellet que IF3, y, por ende, una menor productividad.

Productividad de la producción proteica

Proteína	<i>Mtb-IF1</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>
<i>Pellet purificado</i>	1.86 g	6.77 g	1.50 g	4.40 g
<i>Masa de la proteína producida</i>	0.39 mg	0.75 mg	0.80 mg	1.14 mg
<i>Productividad (mg/g)</i>	0.20	0.11	0.53	0.25

Tabla 6: Productividad de la producción proteica, entendida como los miligramos de proteína producida entre los gramos de pellet purificados (peso mojado).

Con el objetivo de determinar la masa de *Mtb-IF1*, *Mtb-IF1_{D5C}*, *Mtb-IF3*, *Mtb-IF3_{D157C}* que se produjo a partir de cada litro de medio LB, se calculó la eficiencia de purificación (Tabla 7). Para ello se dividió los miligramos de proteína producida entre el volumen de medio LB del cual se obtuvo el pellet que se purificó (Tabla 6, Anexos - Tabla 4). Los resultados indican que *Mtb-IF3* es la proteína que más se logró producir usando una menor cantidad de medio LB. En contraparte *Mtb-IF1_{D5C}* es la proteína que menos se logró producir usando una menor cantidad de medio. En general, podemos notar que las proteínas nativas (*Mtb-IF1* y *Mtb-IF3*) son las que mayor eficiencia de purificación mostraron.

Eficiencia de purificación

Proteína	<i>Mtb-IF1</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>
Medio LB purificado	0.5 L	2 L	0.5 L	2 L
Masa de la proteína producida	0.39 mg	0.75 mg	0.80 mg	1.14 mg
Eficiencia (mg/L)	0.78	0.375	1.6	0.57

Tabla 7: Eficiencia de la purificación, entendida como los miligramos de proteína producida entre los litros de medio LB a partir de los cuales se obtuvo el pellet que se purificó.

6.4 Marcado fluorescente de las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}* e *Mtb-IF3_{D157C}* de *M. tuberculosis*.

Se marcó cada mutante, *Mtb-IF1_{D5C}* y *Mtb-IF3_{D157C}*, con ambos fluoróforos Atto540Q maleimido (aceptor) y Alexa488 C5-maleimido (donador). Las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}* y *Mtb-IF3_{D157C}* marcadas con Atto540Q se conocieron como *Mtb-IF1_Q* y *Mtb-IF3_Q* respectivamente; mientras que las marcadas con Alexa488 se conocieron como *Mtb-IF1_D* y *Mtb-IF3_D* respectivamente. Se marcó un mayor volumen de proteína con Atto540Q, porque para las reacciones FRET se usaron mayores concentraciones del aceptor.

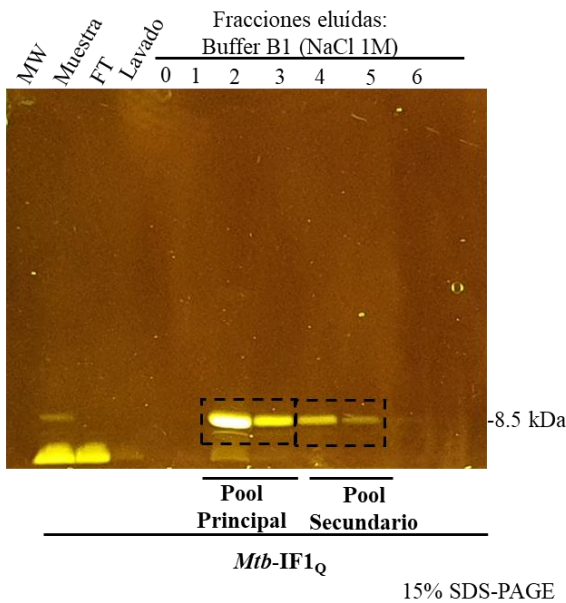
Dato	Atto540Q		Alexa488	
	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>
Concentración	43 μ M	51 μ M	43 μ M	51 μ M
Volumen	1400 μ L	500 μ L	650 μ L	500 μ L
Proteína inicial	0.512 mg	0.569 mg	0.238 mg	0.569 mg

Tabla 8: Concentraciones y volúmenes de las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}*, *Mtb-IF3_{D157C}*, para el marcado con los fluoróforos Atto540Q maleimido y Alexa 488 C5-maleimido

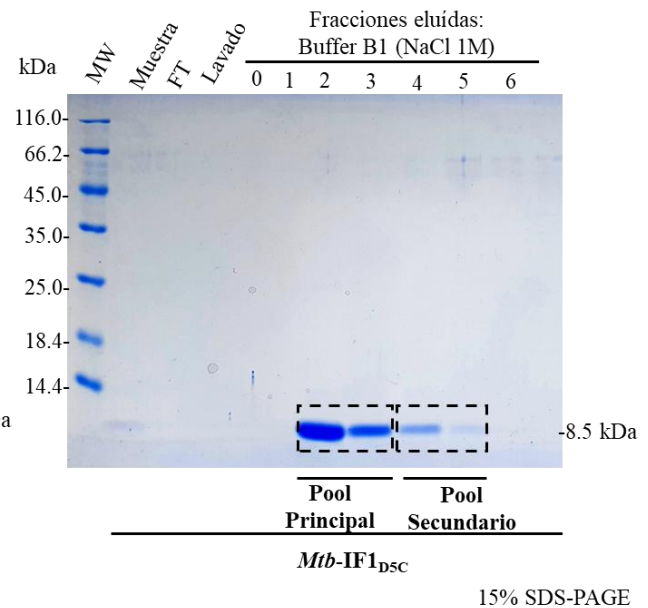
6.4.1 Marcado fluorescente con Atto540Q maleimido

La señal fluorescente producida por la porción de la proteína *Mtb-IF1_{D5C}* y *Mtb-IF3_{D157C}* que se logró conjugar con el fluoróforo Atto540Q, se observó usando el transiluminador de luz azul (Fig. 21A, C). En los geles pre-tinción, se observa en el FT, el fluoróforo no conjugado con la proteína y, en las fracciones eluidas, la proteína marcada. Posteriormente, usando tinción con Azul de Comassie (post-tinción) de los mismos geles, se distinguió la cantidad total de las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}* y *Mtb-IF3_{D157C}* que se obtuvo después del marcado (Fig. 21B, D).

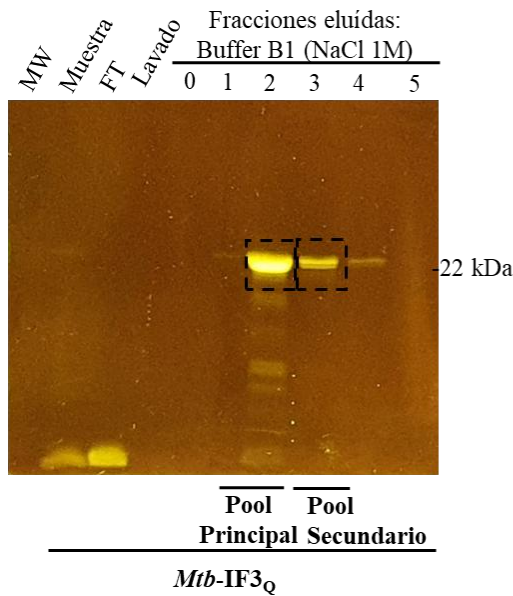
A. Pre-Tinción



B. Post-Tinción



C. Pre-Tinción



D. Post-Tinción

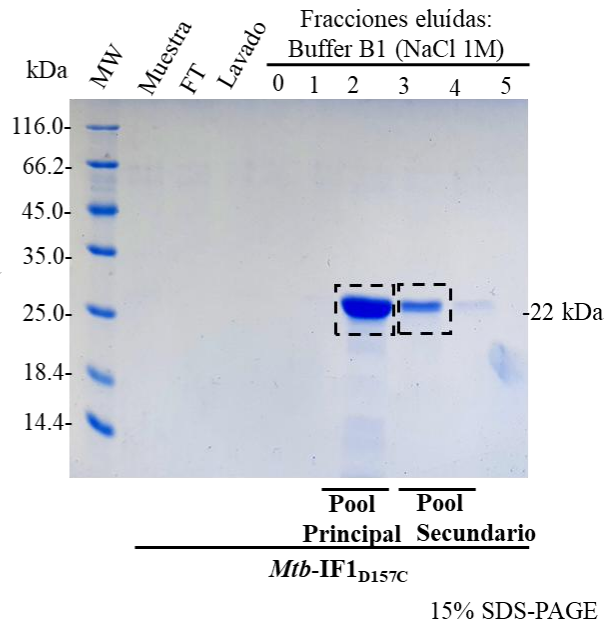


Figura 21: Resultados de electroforesis en geles SDS- PAGE del marcado de *Mtb-IF1_{D5C}* y *Mtb-IF3_{D157C}* con Atto540Q maleimido. (A) Señal fluorescente producida por *Mtb-IF1_{D5C}* conjugada al fluoróforo (*Mtb-IF1_Q*). (B) Total de *Mtb-IF1_{D5C}* teñido con azul de comassie. (C) Señal fluorescente producida por *Mtb-IF3_{D157C}* conjugada al fluoróforo (*Mtb-IF3_Q*). (D) Total de *Mtb-IF3_{D157C}* teñido con azul de comassie. La muestra, el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 14.4 a 116 kDa.

6.4.2 Marcado fluorescente con Alexa488 C5-maleimido

La señal fluorescente producida por la porción de las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}* e *Mtb-IF3_{D157C}* que se conjugó con el fluoróforo Alexa488 (Fig. 22A, C) se observó con un transiluminador de luz azul. Posteriormente, por tinción con Azul de Comassie se distinguió la totalidad de las proteínas *Mtb-IF1_{D5C}* e *Mtb-IF3_{D157C}* que se obtuvo después del marcado (Fig. 22B, D). En los geles pre-tinción y post-tinción, se observa la proteína conjugada con el fluoróforo que precipitó, la muestra marcada antes de purificarla y la proteína marcada que eluyó en distintas fracciones.

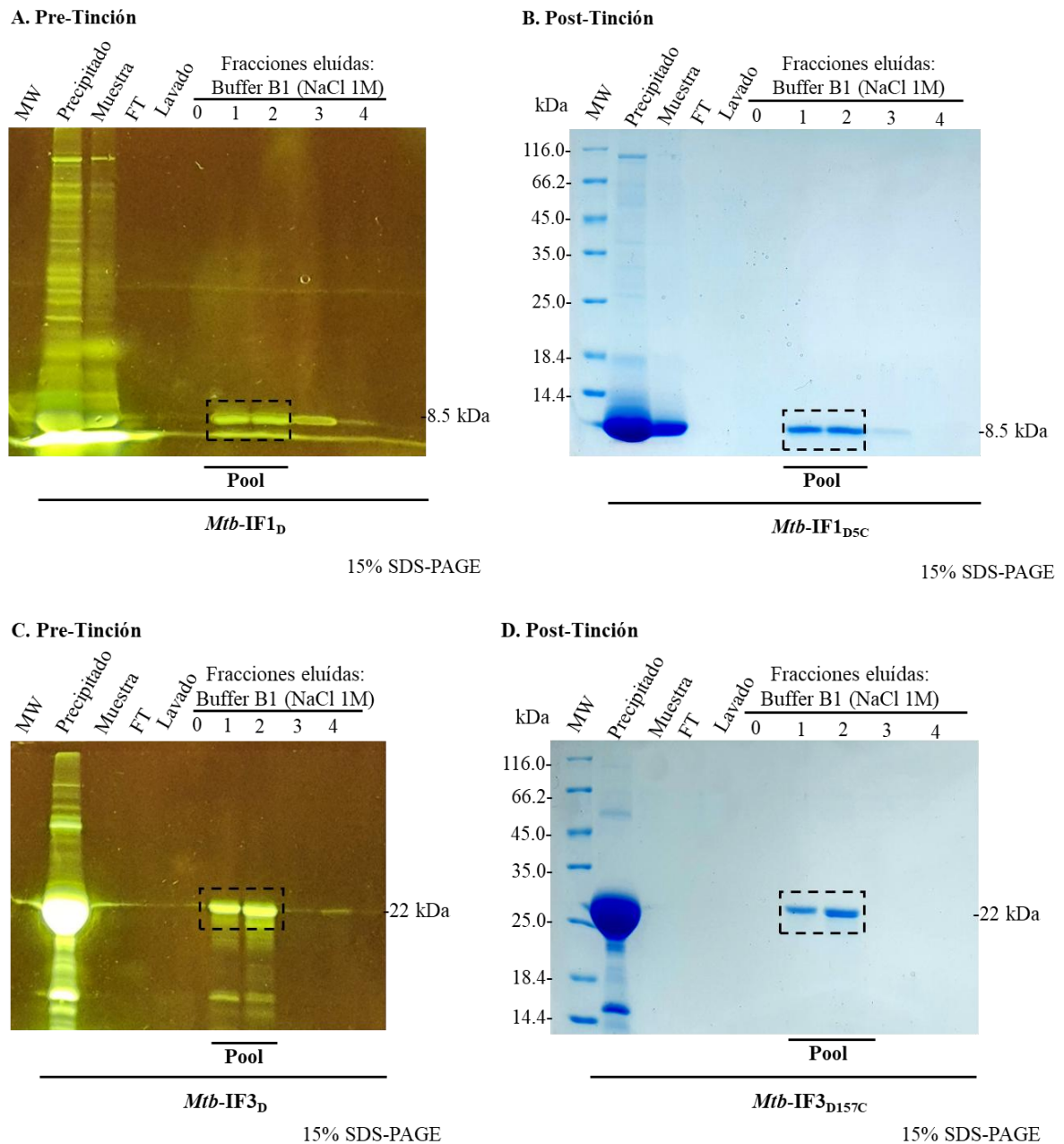


Figura 22: Resultados de electroforesis en geles SDS- PAGE del marcado de *Mtb-IF1_{D5C}* e *Mtb-IF3_{D157C}* con Alexa Fluor 488 C5-maleimido. (A) Señal fluorescente producida por *Mtb-IF1_{D5C}* conjugada al fluoróforo (*Mtb-IF1_D*). (B) Total de *Mtb-IF1_{D5C}* teñido con azul de Comassie. (C) Señal fluorescente producida por *Mtb-IF3_{D157C}* conjugada al fluoróforo (*Mtb-IF3_D*). (D) Total de *Mtb-IF3_{D157C}* teñido con Azul de Comassie. El precipitado, la muestra, el lisado no unido (FT), el lavado y las fracciones obtenidas se analizaron por geles SDS-PAGE al 15 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (MW) en un rango de 14.4 a 116 kDa.

6.4.3 Eficiencia del marcado fluorescente

Usando la ley de Lambert-Beer, se cuantificó *Mtb*-IF1_Q y *Mtb*-IF3_Q por fluorometría y se obtuvieron concentraciones de 30.57 uM y 12.95 uM, respectivamente (Tabla 9). Dado que, por el método anterior, solo se mide la porción marcada, también se realizó la cuantificación por densitometría y se obtuvieron concentraciones totales de las proteínas *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-IF3_{D157C} de 49.68 uM y 17.50 uM, respectivamente. A partir de las concentraciones obtenidas se obtuvo una eficiencia de marcado con Atto540Q de 62% para *Mtb*-IF1_{D5C} y de 74% para *Mtb*-IF3_{D157C} (Tabla 9).

De la misma forma se cuantificó *Mtb*-IF1_D y *Mtb*-IF3_D y se obtuvieron concentraciones de 6.84 uM y 3.15 uM, respectivamente (Tabla 9). Por densitometría se obtuvieron concentraciones totales de las proteínas *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-IF3_{D157C} de 13.73 uM y 5.33 uM, respectivamente. A partir de las concentraciones obtenidas se obtuvo una eficiencia de marcado con Alexa 488 de 50 % para *Mtb*-IF1_{D5C} y de 59 % para *Mtb*-IF3_{D157C} (Tabla 9).

<i>Fluoróforo</i>	Atto 540Q		Alexa 488	
	<i>Mtb</i> -IF1 _{D5C}	<i>Mtb</i> -IF3 _{D157C}	<i>Mtb</i> -IF1 _{D5C}	<i>Mtb</i> -IF3 _{D157C}
<i>Proteína</i>				
<i>Volumen</i>	420 µL	300 µL	400 µL	630 µL
<i>Proteína marcada</i>	0.109 mg	0.087 mg	0.023 mg	0.044 mg
<i>Proteína Total</i>	0.177 mg	0.117 mg	0.046 mg	0.075 mg
<i>Eficiencia Marcado</i>	62 %	74 %	50 %	59 %

Tabla 9: Eficiencia del marcado fluorescente de *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-IF3_{D157C} con los fluoróforos Atto540Q maleimido y Alexa 488 C5-maleimido.

A partir de las cantidades iniciales de proteína que se usaron para el marcado fluorescente y de las cantidades de proteína marcada que se obtuvieron, se calculó la eficiencia de recuperación del marcado. En el marcado con Atto540Q se obtuvieron eficiencias de recuperación del 21 % para *Mtb*-IF1_{D5C} y del 15 % para *Mtb*-IF3_{D157C}. En el marcado con Alexa488 se obtuvieron eficiencias de recuperación del 10 % para *Mtb*-IF1_{D5C} y del 8 % para *Mtb*-IF3_{D157C} (Tabla 10).

<i>Fluoróforo</i>	Atto 540Q		Alexa 488	
<i>Proteína</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>	<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>
<i>Proteína inicial</i>	0.512 mg	0.569 mg	0.238 mg	0.569 mg
<i>Proteína marcada</i>	0.109 mg	0.087 mg	0.023 mg	0.044 mg
<i>Eficiencia recuperación marcado</i>	21 %	15 %	10 %	8 %

Tabla 10: Eficiencia de recuperación del marcado de *Mtb-IF1_{D5C}* e *Mtb-IF3_{D157C}* con los fluoróforos Atto540Q maleimido y Alexa 488 C5-maleimido.

6.5 Asociación de IF3 e IF1 de *M. tuberculosis* a la subunidad 30S usando un sistema heterólogo intermolecular FRET

Se produjeron y marcaron fluorescentemente los factores IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* con el objetivo de analizar su asociación a la subunidad 30S de *E. coli*. Para ello se utilizó un sistema FRET que se basa en cambios en la señal fluorescente dependiendo de si los factores se unen o no a la subunidad 30S de *E. coli* (Fig. 23). Si los factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} se acercan debido a su asociación a la subunidad 30S, la fluorescencia desciende, y si los factores de iniciación se distancian la fluorescencia aumenta.

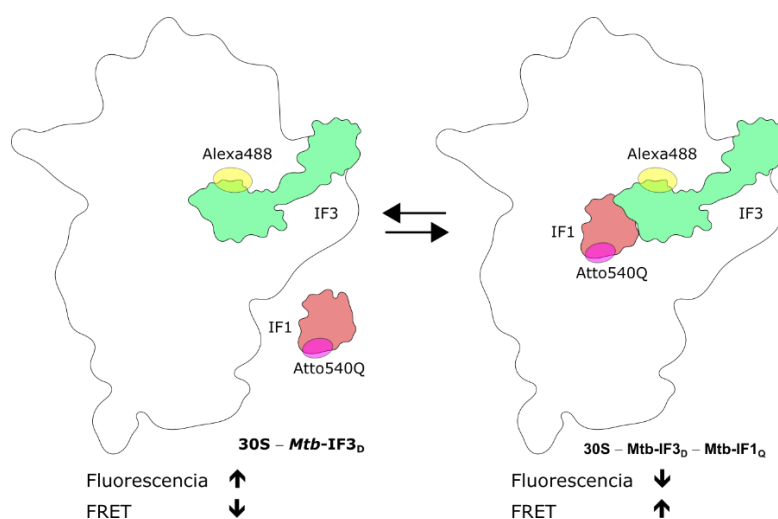


Figura 23: Diagrama de los cambios en la fluorescencia y en FRET, debido a la asociación de *Mtb-IF1_Q* al complejo formado por la subunidad 30S de *E. coli* (*Ec30S*) y *Mtb-IF3_D*.

Posteriormente se analizó la disociación de los factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* de la subunidad 30S de *E. coli*, mediante la adición de los factores IF1 e IF3 de *E. coli*, con el objetivo de comprobar si los factores de *M. tuberculosis* están asociados al mismo sitio de unión que los factores de *E. coli* (Fig. 24). Entonces, si uno de los factores de iniciación *Mtb*-IF1_{D5C} e *Mtb*-IF3_{D157C} se disocia de la subunidad 30S, la fluorescencia aumenta, y si los factores de iniciación no se disocian la fluorescencia se mantiene baja.

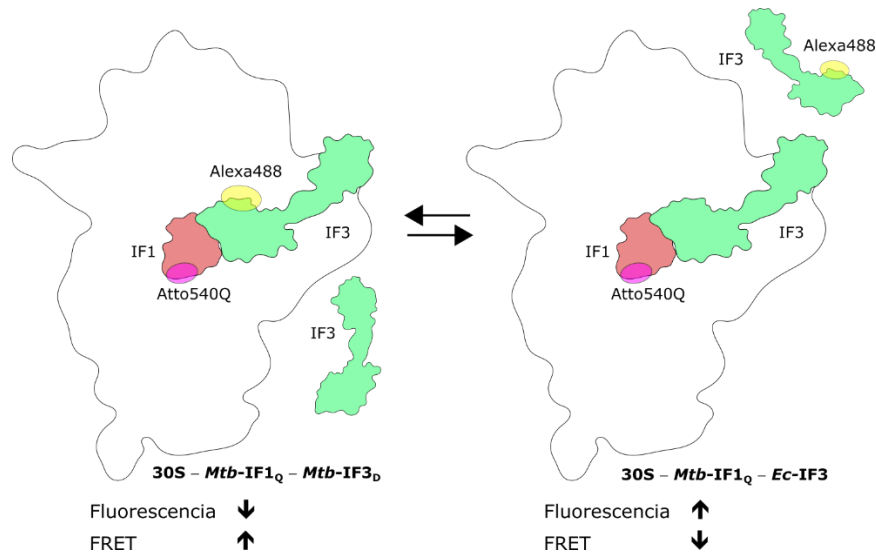


Figura 24: Diagrama de los cambios en la fluorescencia y en el FRET, debido a la disociación de *Mtb*-IF3_D, por la adición de *Ec*-IF3, del complejo formado por la subunidad 30S de *E. coli*, *Mtb*-IF3_D y *Mtb*-IF1_Q.

En estos experimentos se usaron las proteínas *Mtb*-IF1_D y *Mtb*-IF3_D como donadores y las proteínas *Mtb*-IF1_Q y *Mtb*-IF3_Q como quenchers. También se usaron las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{E166C} de *E. coli* marcadas con un donador Alexa 488, llamándolas *Ec*-IF1_D y *Ec*-IF3_D respectivamente, y marcadas con un aceptor Atto540Q llamándolas *Ec*-IF1_Q y *Ec*-IF3_Q respectivamente. Estas proteínas de *E. coli* fueron producidas por otros miembros del laboratorio de Biomoléculas y se utilizaron como controles en la presente investigación. Además, se usó la subunidad 30S de *E. coli*, como plataforma a la cual se unían los diversos factores de iniciación.

6.5.1 Asociación de *Mtb*-IF1_D al complejo de pre-iniciación 30S – *Ec*-IF3_Q

Con el objetivo de evaluar la asociación de *Mtb*-IF1_D a la subunidad menor 30S, se usó *Ec*-IF3_Q pre unido al 30S. Los resultados indican que *Mtb*-IF1_D interactúa con la subunidad 30S a través de dos fases, una rápida, visualizada por un aumento de fluorescencia, seguida de una lenta en la cual la fluorescencia disminuye en el tiempo. Por el contrario, cuando se mide la asociación de *Ec*-IF1_D, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia disminuye. Los resultados obtenidos sugieren que *Mtb*-IF1 usa un mecanismo de unión distinto a aquel de *Ec*-IF1. Además, los presentes resultados indican que *Mtb*-IF1 se une al 30S de *E. coli*, sin embargo, no se puede excluir que pueda ocupar un sitio distinto al de *Ec*-IF1 (Fig. 25).

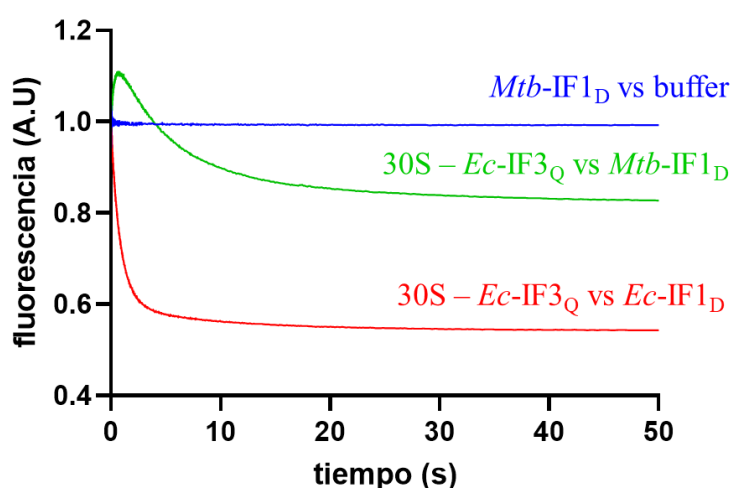


Figura 25: Asociación de *Mtb*-IF1_D al complejo formado por la subunidad 30S y *Ec*-IF3_Q. La asociación de *Mtb*-IF1_D a la subunidad 30S previamente unida a *Ec*-IF3_Q, se muestra en verde. El control negativo, *Mtb*-IF1_D solo, se muestra en azul. El control positivo, *Ec*-IF1_D asociándose a la subunidad 30S previamente unida a *Ec*-IF3_Q, en rojo. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.2 Asociación de *Mtb*-IF3_D al complejo de pre-iniciación 30S – *Ec*-IF1_Q

Con el objetivo de evaluar la asociación de *Mtb*-IF3_D a la subunidad menor 30S se usó *Ec*-IF1_Q pre unido al 30S. Los resultados indican que *Mtb*-IF3_D interactúa con la subunidad 30S a través de dos fases, una rápida, visualizada por un aumento de fluorescencia, seguida de una lenta en la cual la fluorescencia disminuye en el tiempo. Por el contrario, cuando se mide

la asociación de $Ec\text{-IF3}_D$, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia disminuye. Los resultados obtenidos sugieren que $Mtb\text{-IF3}$ usa un mecanismo de unión distinto a aquel de $Ec\text{-IF3}$. Además, los presentes resultados indican que $Mtb\text{-IF3}$ se une al 30S de *E. coli*, sin embargo, no se puede excluir que pueda ocupar un sitio distinto al de $Ec\text{-IF3}$ (Fig. 26).

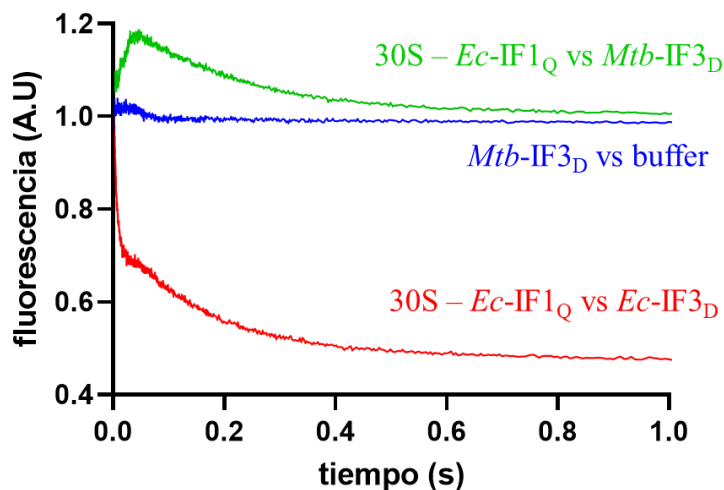


Figura 26: Asociación de $Mtb\text{-IF3}_D$ al complejo formado por la subunidad 30S y $Ec\text{-IF1}_Q$. La asociación de $Mtb\text{-IF3}_D$ a la subunidad 30S previamente unida a $Ec\text{-IF1}_Q$, se muestra en verde. El control negativo, $Mtb\text{-IF3}_D$ solo, se muestra en azul. El control positivo, $Ec\text{-IF3}_D$ asociándose a la subunidad 30S previamente unida a $Ec\text{-IF1}_Q$, en rojo. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.3 Asociación de $Mtb\text{-IF1}_Q$ al complejo de pre-iniciación 30S – $Mtb\text{-IF3}_D$

Con el objetivo de evaluar la asociación de $Mtb\text{-IF1}_Q$ a la subunidad menor 30S se usó $Mtb\text{-IF3}_D$ pre unido al 30S. Los resultados indican que $Mtb\text{-IF1}_Q$ interactúa con la subunidad 30S a través de una fase visualizada por una disminución de la fluorescencia en el tiempo. De la misma manera, cuando se mide la asociación de $Ec\text{-IF1}_D$ a la subunidad 30S previamente unida a $Ec\text{-IF3}_Q$, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia disminuye. Los resultados obtenidos sugieren que $Mtb\text{-IF1}$ usa un mecanismo de unión similar a aquel de $Ec\text{-IF1}$, cuando ambos factores son de la misma especie. Además, los presentes resultados indican que $Mtb\text{-IF1}$ se une al 30S de *E. coli*, sin embargo, no se puede excluir que pueda ocupar un sitio distinto al de $Ec\text{-IF1}$ (Fig. 27).

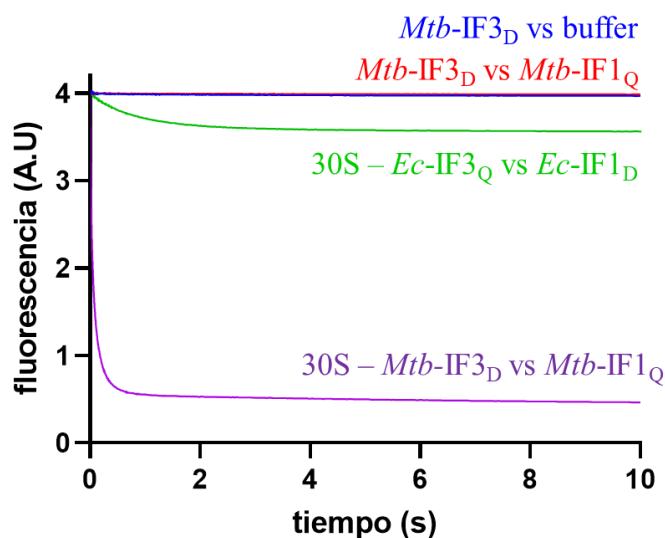


Figura 27: Asociación de *Mtb-IF1_Q* al complejo formado por la subunidad 30S de *E. coli* con *Mtb-IF3_D*. La asociación de *Mtb-IF1_Q* asociándose a la subunidad 30S previamente unida a *Mtb-IF3_D*, se muestra en violeta. El control negativo, *Mtb-IF3_D* solo, se muestra en azul. El control negativo, *Mtb-IF3_D* versus *Mtb-IF1_Q*, en rojo. El control positivo, *Ec-IF1_D* asociándose a la subunidad 30S previamente unida a *Ec-IF3_Q*, en verde. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.4 Asociación de *Mtb-IF3_D* al complejo de pre-iniciación 30S – *Mtb-IF1_Q*

Con el objetivo de evaluar la asociación de *Mtb-IF3_D* a la subunidad menor 30S se usó *Mtb-IF1_Q* pre unido al 30S. Los resultados indican que *Mtb-IF3_D* interactúa con la subunidad 30S a través de una fase visualizada por una disminución de la fluorescencia en el tiempo. De la misma manera, cuando se mide la asociación de *Ec-IF3_D* a la subunidad 30S previamente unida a *Ec-IF1_Q*, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia disminuye. Los resultados obtenidos sugieren que *Mtb-IF3* usa un mecanismo de unión similar a aquel de *Ec-IF3*, cuando ambos factores son de la misma especie. Además, los presentes resultados indican que *Mtb-IF3* se une al 30S de *E. coli*, sin embargo, no se puede excluir que pueda ocupar un sitio distinto al de *Ec-IF3* (Fig. 28).

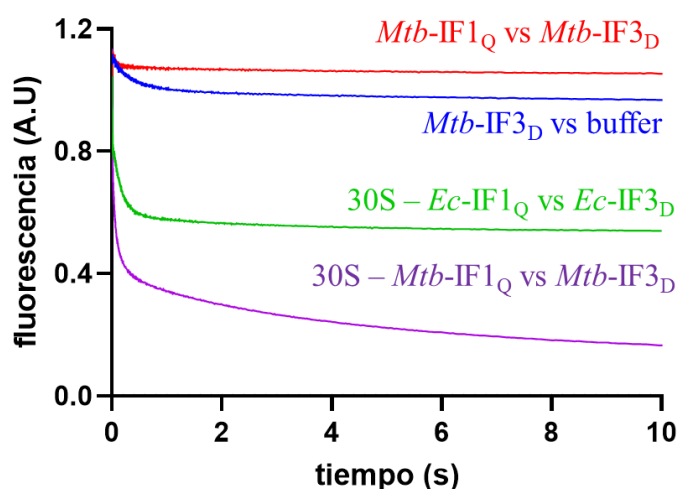


Figura 28: Asociación de *Mtb-IF3_D* al complejo formado por la subunidad 30S de *E. coli* con *Mtb-IF1_Q*. La asociación de *Mtb-IF3_D* asociándose a la subunidad 30S previamente unida a *Mtb-IF1_Q*, se muestra en violeta. El control negativo, *Mtb-IF3_D* solo, en azul. El control negativo, *Mtb-IF3_D* versus *Mtb-IF1_Q*, en rojo. El control positivo, *Ec-IF3_D* asociándose a la subunidad 30S previamente unida a *Ec-IF1_Q*, en verde. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.5 Disociación de *Mtb-IF1_Q* del complejo de pre-iniciación 30S – *Mtb-IF1_Q* – *Mtb-IF3_D* por la adición *Ec-IF1*

Los resultados obtenidos anteriormente han demostrado que *Mtb-IF1* es capaz de asociarse a la subunidad 30S previamente unida al factor IF3 tanto de *M. tuberculosis* como de *E. coli*; sin embargo, no se ha excluido que *Mtb-IF1* ocupe un sitio de unión al 30S distinto al de *Ec-IF1*. Con el objetivo de evaluar si *Mtb-IF1* ocupa el mismo sitio de unión a la subunidad 30S que *Ec-IF1*, se adicionó *Ec-IF1* al 30S pre unido a *Mtb-IF1_Q* y *Mtb-IF3_D*. Los resultados indican que *Mtb-IF1_Q* se disocia de la subunidad 30S a través de una fase, visualizada por un aumento de fluorescencia en el tiempo. De la misma manera, cuando se mide la disociación de *Ec-IF1_Q*, mediante la adición de *Ec-IF1* a la subunidad 30S previamente unida a *Ec-IF1_Q* y *Ec-IF3_D*, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia aumenta. Los resultados obtenidos sugieren que *Mtb-IF1* usa un mecanismo de disociación similar a aquel de *Ec-IF1*. Además, los presentes resultados indican que *Mtb-IF1* se une al 30S de *E. coli* ocupando el mismo sitio de unión que *Ec-IF3* (Fig. 29).

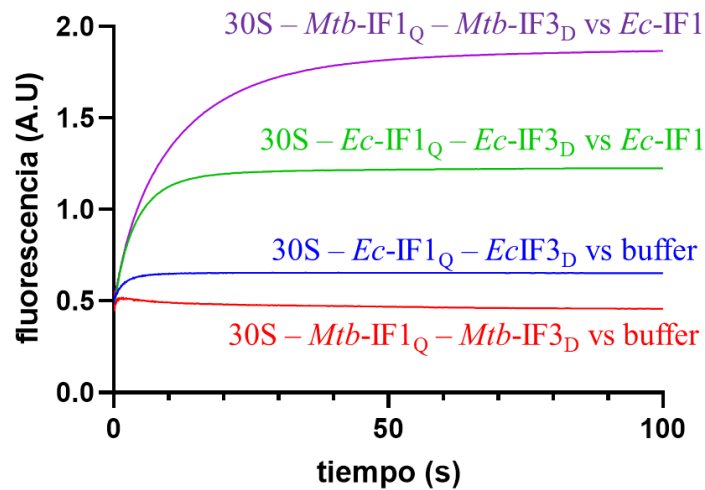


Figura 29: Disociación de *Mtb*-IF1_Q, por la adición de *Ec*-IF1, de la subunidad 30S de *E. coli* previamente unida a *Mtb*-IF3_D y a *Mtb*-IF1_Q, se muestra en violeta. El control positivo, *Ec*-IF1_Q disociándose, por la adición de *Ec*-IF1, de la subunidad 30S previamente unida a *Ec*-IF3_D y a *Ec*-IF1_Q, se muestra en verde. El control negativo, la subunidad 30S unida a *Mtb*-IF1_Q y a *Mtb*-IF3_D, en rojo. El control negativo, la subunidad 30S unida a *Ec*-IF1_Q y a *Ec*-IF3_D, en azul. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.6 Disociación de *Mtb*-IF3_D del complejo de pre-iniciación 30S – *Mtb*-IF1_Q – *Mtb*-IF3_D por la adición de *Ec*-IF3

Los resultados obtenidos anteriormente han demostrado que *Mtb*-IF3 es capaz de asociarse a la subunidad 30S previamente unida al factor IF1 tanto de *M. tuberculosis* como de *E. coli*; sin embargo, no se ha excluido que *Mtb*-IF3 ocupe un sitio de unión al 30S distinto al de *Ec*-IF3. Con el objetivo de evaluar si *Mtb*-IF3 ocupa el mismo sitio de unión a la subunidad 30S que *Ec*-IF3, se adicionó *Ec*-IF3 al 30S pre unido a *Mtb*-IF1_Q y *Mtb*-IF3_D. Los resultados indican que *Mtb*-IF3_D se disocia de la subunidad 30S a través de una fase, visualizada por un aumento de fluorescencia en el tiempo. De la misma manera, cuando se mide la disociación de *Ec*-IF3_D, mediante la adición de *Ec*-IF3 a la subunidad 30S previamente unida a *Ec*-IF1_Q y *Ec*-IF3_D, se observa solamente una fase en la cual la fluorescencia aumenta. Los resultados obtenidos sugieren que *Mtb*-IF3 usa un mecanismo de disociación similar a aquel de *Ec*-IF3. Además, los presentes resultados indican que *Mtb*-IF3 se une al 30S de *E. coli* ocupando el mismo sitio de unión que *Ec*-IF3 (Fig. 29).

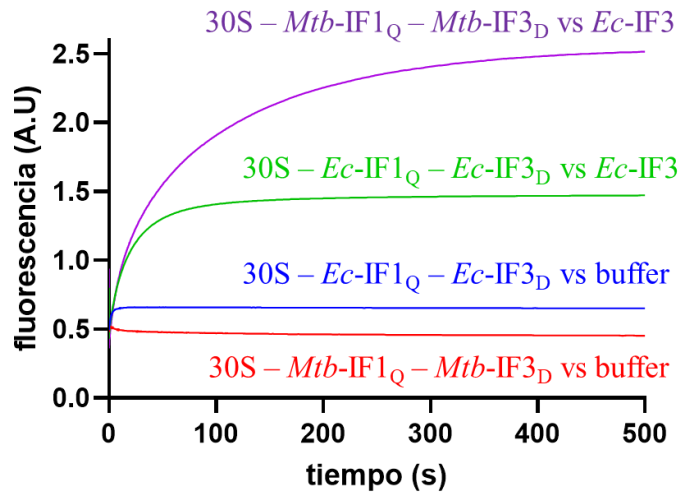


Figura 30: Disociación de *Mtb-IF3_D*, por la adición de *Ec-IF3*, de la subunidad 30S de *E. coli* previamente unida a *Mtb-IF3_D* y a *Mtb-IF1_Q*, se muestra en violeta. El control positivo, *Ec-IF3_D* disociándose, por la adición de *Ec-IF3*, de la subunidad 30S previamente unida a *Ec-IF3_D* y a *Ec-IF1_Q*, se muestra en verde. El control negativo, la subunidad 30S unida a *Mtb-IF1_Q* y a *Mtb-IF3_D*, en rojo. El control negativo, la subunidad 30S unida a *Ec-IF1_Q* y a *Ec-IF3_D*, en azul. La fluorescencia se encuentra en unidades arbitrarias (A.U) y el tiempo en segundos (s).

6.5.7 Ajuste de la disociación de *Mtb-IF3_D* e *Mtb-IF1_Q* del complejo de pre-iniciación **30S – *Mtb-IF1_Q* – *Mtb-IF3_D* por la adición de *Ec-IF1* e *Ec-IF3***

Con el objetivo de comparar cuantitativamente las disociaciones de los factores IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* con los de *E. coli*, se determinó la constante de disociación (K_{off}) de *Mtb-IF1_Q*, *Ec-IF1_Q*, *Mtb-IF3_D* y *Ec-IF3_D* ajustando la función exponencial a los datos obtenidos en los experimentos de disociación. Los resultados indican que ambos factores de *E. coli* se disocian más rápido que los factores de *M. tuberculosis*. Esto nos sugiere que los factores de *M. tuberculosis* tienen mayor afinidad por la subunidad 30S que los factores de *E. coli*. También notamos que, en general, el factor IF1 se disocia más rápido que el factor IF3, en el complejo de pre-iniciación 30S – IF1 – IF3.

Complejo	Perseguidor	$K_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$
30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q – <i>Mtb</i> -IF3 _D	<i>Ec</i> -IF1	0.1 ± 0.001
30S – <i>Ec</i> -IF1 _Q – <i>Ec</i> -IF3 _D	<i>Ec</i> -IF1	0.2 ± 0.002
30S – <i>Mtb</i> -IF1 _Q – <i>Mtb</i> -IF3 _D	<i>Ec</i> -IF3	0.02 ± 0.0005
30S – <i>Ec</i> -IF1 _Q – <i>Ec</i> -IF3 _D	<i>Ec</i> -IF3	0.05 ± 0.001

Tabla 10: Constantes de disociación (K_{off}) determinadas por los experimentos de disociación de *Mtb*-IF1_Q, *Ec*-IF1_Q, *Mtb*-IF3_D y *Ec*-IF3_D. Los perseguidores fueron usados en un exceso de 10 veces (1 μM), sobre los complejos de pre-iniciación (0.1 μM).

7 DISCUSIÓN

En esta investigación se realizó la producción de las proteínas IF1 y, por primera vez reportado, IF3 de *M. tuberculosis*. Ambas proteínas fueron marcadas exitosamente con los fluoróforos Alexa488 C5-maleimido y Atto540Q maleimido, en residuos específicos de cisteínas expuestos y de manera similar a sus homólogos en *E. coli* (Milon et al., 2008; Nakamoto et al., 2021). Estas proteínas marcadas permitieron generar un sistema heterólogo de FRET que permite evaluar la asociación de IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* a la subunidad 30S de *E. coli* y por ende ser evaluadas en base a la formación del complejo de pre-iniciación 30S. Los resultados demostraron que IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* se asocian a la subunidad 30S en el mismo sitio de unión que sus homólogos en *E. coli*.

En la producción de las proteínas de *M. tuberculosis* se alcanzaron concentraciones micromolares de IF3 similares a concentraciones de IF3 de *E. coli* anteriormente reportadas por métodos de producción similares (Sánchez Castro, 2022; Nakamoto, datos no publicados). Por otro lado, previamente se ha reportado una producción de IF1 nativa de *M. tuberculosis* a partir de 1 L de cultivo y una posterior concentración a 10 mg/mL para estudios de cristalografía (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2007). Sin embargo, en la presente investigación la purificación de IF1 e IF1_{D5C} de *M. tuberculosis* ha resultado desafiante, debido a los bajos niveles de expresión observados, llegando a 0.13 mg/mL obtenidos a partir de 1.86 g de pellet y 0.36 mg/mL a partir de 6.77 g de pellet respectivamente.

En los resultados de este trabajo no se han encontrado diferencias en la expresión proteica ya sea por una reducción de la temperatura post-inducción, por variación de las concentraciones de IPTG en un rango de 0.1 mM – 1 mM o por una reducción del estrés ambiental omitiendo el antibiótico al medio de crecimiento (Baneyx et al., 1991; Chesshyre & Hipkiss, 1989; Einsfeldt et al., 2011; Perona & Timoteo Prado, 2017); pero sí se han encontrado diferencias en la expresión proteica entre las colonias transformadas con un mismo plásmido, encontrando mayor expresión en las colonias que visualmente tienen una mayor circunferencia. Previamente se ha reportado que células de *E. Coli* DH5 α transformadas con un mismo plásmido, tienen diferencias entre ellas en el número de copias de este y que las células que tenían un mayor número de copias del plásmido producen mayor cantidad de la proteína verde fluorescente (Jahn et al., 2016). Es posible que, en el caso de IF1 de *M. tuberculosis*, la relación positiva entre una mayor expresión proteica y las colonias

de mayor circunferencia, se deba a que las células de esta colonia contienen un mayor número de copias del plásmido de interés y, por ende, pueden prosperar mejor en el medio con antibiótico y producir más proteína.

La eficiencia del marcado fluorescente de las proteínas *Mtb*-IF3_{D157C} e *Mtb*-IF1_{D5C} varía en un rango de 50-75 %, mostrando cierta concordancia con lo reportado anteriormente en otros estudios en los que se han marcado fluorescentemente los factores de iniciación de *E. coli* (Nakamoto, 2019; Sánchez Castro, 2022). El marcado de las proteínas *Mtb*-IF3_{D157C} e *Mtb*-IF1_{D5C} con el fluoróforo Alexa488 C5-maleimido tuvo la menor eficiencia, probablemente debido a la gran cantidad de proteína que precipitó al centrifugarla después de conjugarla con el fluoróforo. Esta precipitación se puede deber a un uso excesivo del fluoróforo para el marcado, por ello, se recomienda optimizar el marcaje reduciendo el exceso molar a proporciones menores a 10 (Molecular Probes, 2006).

Mediante el alineamiento de secuencias se demostró que la similitud entre los factores de *E. coli* y de *M. tuberculosis* es de un 68 % para el factor IF1 y de un 39 % para el factor IF3, lo cual se acerca a lo reportado anteriormente (Kumar et al., 2021). Además, se probó que la región de unión al 16S ARNr del 30S de IF3 varía bastante entre *E. coli* y *M. tuberculosis* (Hussain et al., 2016). Sin embargo, a pesar de estas diferencias, los estudios FRET realizados en este estudio han demostrado que IF3 de *M. tuberculosis* es capaz de asociarse a la subunidad 30S. Esto posiblemente se debe a que la forma característica del factor y ciertos aminoácidos críticos como la tirosina-75 (numeración de *E. coli*) se mantienen constantes, lo que permite que este interactúe correctamente con la subunidad 30S (Hussain et al., 2016). En el caso de IF1 de *M. tuberculosis*, los alineamientos estructurales y estudios previos muestran que el factor conserva su forma característica y ciertos residuos críticos para la unión al 30S, lo que también permite que este se asocie correctamente a la subunidad 30S como lo demuestra los estudios FRET realizados en este trabajo (Hatzopoulos & Mueller-Dieckmann, 2010).

Los factores de iniciación IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* marcados fluorescentemente permitieron generar un sistema heterólogo FRET para evaluar su asociación a la subunidad 30S de *E. coli*. Los resultados indican que IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* logran asociarse a la subunidad 30S y en el mismo sitio de unión que sus homólogos de *E. coli*. Sin embargo, cuando se combinaron los factores de iniciación de *M. tuberculosis* y *E. coli* se observaron

cambios de fluorescencia que divergen de lo esperado y que no han sido reportados previamente. Esto podría deberse a las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de los factores de iniciación de *E. coli* y *M. tuberculosis* (Kumar et al., 2021). Esta divergencia se observa en el caso de *Mtb*-IF3_D contra el complejo 30S – *Ec*-IF1_Q y en el caso de *Mtb*-IF1_D contra el complejo 30S – *Ec*-IF3_Q. En ambos casos se observaron dos fases, una rápida caracterizada por un aumento de fluorescencia, seguida de una lenta, caracterizada por un descenso de la fluorescencia. Las razones que expliquen el aumento de fluorescencia pueden ser múltiples y es probable que no estén relacionadas al acercamiento o distanciamiento de los fluoróforos, sino que se deban a cambios en el donador (Ej.: un cambio conformacional en el factor que resulte en una mayor exposición del fluoróforo). Por otro lado, el descenso lento de fluorescencia sí lo podríamos atribuir a un acercamiento de los fluoróforos y, por ende, a la asociación del factor a la subunidad 30S. Hacen falta estudios estructurales y bioinformáticos para poder develar claramente los fenómenos detrás de estas reacciones.

En la asociación de *Mtb*-IF1_Q al complejo 30S – *Mtb*-IF3_D, se observó un amplio y aparentemente más rápido descenso de fluorescencia comparado con el modelo de *E. coli*. Lo que nos plantearía que quizá los tiempos establecidos para la formación del pre-complejo de iniciación en el modelo *E. coli* son diferentes en *M. tuberculosis* (Milón et al., 2012). En la asociación de *Mtb*-IF3_D al complejo 30S – *Mtb*-IF1_Q, se observó que esta tuvo un mayor descenso de fluorescencia que el control positivo, pero aparentemente a la misma velocidad. Este descenso de fluorescencia más marcado nos puede indicar que hay una mayor cercanía entre los factores de *M. tuberculosis* o que hay una mayor cantidad de *Mtb*-IF3_D asociándose al complejo 30S – *Mtb*-IF1_Q.

En este trabajo se demostró, mediante experimentos de disociación de los factores de *M. tuberculosis* de la subunidad 30S por factores de *E. coli*, que los factores de *M. tuberculosis* tienen el mismo sitio de unión al 30S que los factores de *E. coli*. De esta manera es posible descartar algún sitio de unión no canónico en el 30S para los factores de *M. tuberculosis*. También se observó que la disociación de los factores de *M. tuberculosis* es más lenta que la de los factores de *E. coli*. Esto podría indicarnos, específicamente para el caso de *Mtb*-IF3, que las variaciones observadas en los aminoácidos del sitio de unión al 16S ARNr estarían aumentando la afinidad entre el factor y la subunidad 30S (Hussain et al., 2016). Para el caso de IF1 de *M. tuberculosis*, podríamos deducir que también se están dando variaciones en los aminoácidos del sitio de unión al 30S que estarían aumentando la afinidad

entre el factor y la subunidad. En síntesis, los factores de iniciación IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* sí pueden unirse correctamente al 30S de *E. coli* y en el mismo sitio de unión que sus homólogos de *E. coli*, y con mayor afinidad que los factores de *E. coli*.

Finalmente, los factores de iniciación IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* producidos y marcados fluorescentemente, funcionan de forma óptima en un sistema heterólogo intermolecular FRET con la subunidad 30S de *E. coli*. Como perspectiva a futuro, este trabajo servirá como base para poder caracterizar la iniciación de la traducción de *M. tuberculosis* y, de esta manera, entender qué tan diferente es este proceso respecto al del organismo modelo *E. coli*. Además, podrá servir para obtener información sobre la influencia de las drogas que atacan a la iniciación de la traducción en los factores de iniciación de *M. tuberculosis*, tal cual como ya se ha reportado anteriormente en otros estudios con *E. coli* (Barrenechea et al., 2021; Chulluncuy et al., 2016). Por último, esto sería de utilidad para desarrollar nuevos tratamientos contra la tuberculosis, de manera similar al estudio de Sanchez Castro en el que se identificó el Aptámero₃₄₃, el cual retrasa la formación de complejos intermedios de la fase de iniciación (Sánchez Castro, 2022).

8 CONCLUSIONES

- Existen diferencias entre las secuencias de aminoácidos de IF1 e IF3 de *M. tuberculosis* y *E. coli*, sin embargo, las estructuras tridimensionales entre los homólogos de ambos factores se mantienen.
- Las células competentes de *E. coli* BL21 transformadas con los plásmidos correspondientes a las proteínas IF1, IF1_{D5C}, IF3 e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*, mostraron eficiencias de transformación de 6.9×10^4 , 17.2×10^4 , 1.4×10^4 y de 6.9×10^4 respectivamente.
- En la producción de las proteínas IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *Mycobacterium tuberculosis*, se obtuvieron eficiencias de purificación de 0.375 mg/L y de 0.57 mg/L respectivamente, y grados de pureza mayores al 90 %. En el caso de las proteínas IF1 e IF3 nativas de *M. tuberculosis* se obtuvieron eficiencias de purificación de 0.78 mg/L y de 1.6 mg/L, y grados de pureza menores al 90 %. Es necesario optimizar las eficiencias de purificación de IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis*, ya sea incrementando su productividad o mejorando el método de purificación usado.
- El marcaje fluorescente de los factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* no fue óptimo, ya que se obtuvieron eficiencias de marcado menores al 90 %. Es necesario incrementar las eficiencias de marcado, mejorando la metodología usada y/o ajustando los ratios de proteína:fluoróforo para evitar la precipitación de las proteínas.
- Los factores de iniciación IF1_{D5C} e IF3_{D157C} de *M. tuberculosis* logran asociarse a la subunidad 30S de *E. coli*, en el mismo sitio de unión y con mayor afinidad que sus homólogos de *E. coli*.

9 REFERENCIAS

- Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S., & Medintz, I. L. (2019). FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature Methods*, *16*(9), 815–829. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8>
- Backendorf, C., Ravensbergen, C. J. C., Van Der Plas, J., Van Boom, J. H., Veeneman, G., & Van Duin, J. (1981). Basepairing potential of the 3' terminus of 16S RNA: dependence on the functional state of the 30S subunit and the presence of protein S21. *Nucleic Acids Research*, *9*(6).
- Baneyx, F., Ayling, A., Palumbo, T., Thomas, D., & Georgiou, G. (1991). Optimization of growth conditions for the production of proteolytically-sensitive proteins in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *36*, 14–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00164691>
- Barrenechea, V., Vargas-Reyes, M., Quiliano, M., & Milón, P. (2021). A Complementary Mechanism of Bacterial mRNA Translation Inhibition by Tetracyclines. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682682>
- Beck, H. J., & Moll, I. (2018). Leaderless mRNAs in the Spotlight: Ancient but Not Outdated! *Microbiology Spectrum*, *6*(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0016-2017>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>
- Brandi, L., Fabbretti, A., La Teana, A., Abbondi, M., Losi, D., Donadio, S., & Gualerzi, C. O. (2006). Specific, efficient, and selective inhibition of prokaryotic translation initiation by a novel peptide antibiotic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(1), 39–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507740102>
- Brandi, L., Lazzarini, A., Cavaletti, L., Abbondi, M., Corti, E., Ciciliato, I., Gastaldo, L., Marazzi, A., Feroggio, M., Fabbretti, A., Maio, A., Colombo, L., Donadio, S., Marinelli, F., Losi, D., Gualerzi, C. O., & Selva, E. (2006). Novel tetrapeptide inhibitors

- of bacterial protein synthesis produced by a *Streptomyces* sp. *Biochemistry*, 45(11), 3692–3702. <https://doi.org/10.1021/bi052540k>
- Bunker, R. D., Mandal, K., Bashiri, G., Chaston, J. J., Pentelute, B. L., Lott, J. S., Kent, S. B. H., Baker, E. N., & Petsko, G. A. (2015). A functional role of Rv1738 in *Mycobacterium tuberculosis* persistence suggested by racemic protein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14), 4310–4315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422387112>
- Canonaco, M. A., Pon, C. L., Pawlik, R. T., Calogero, R., & Gualerzi, C. 9. (1987). Relationship between size of mRNA ribosomal binding site and initiation factor function. In *Biochimie* (Vol. 69).
- Cárdenas-Escalante, J., Fernandez-Saucedo, J., & Cubas, W. S. (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis in Peru: Are we forgetting anyone? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 40(1), 46–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimce.2021.07.008>
- CDC. (2016). *The Urgent Threat of TB Drug Resistance*. <http://www.cdc.gov/globalhivtb>
- Chesshyre, J. A., & Hipkiss, A. R. (1989). Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 31, 158–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00262455>
- Chulluncuy, R., Espiche, C., Nakamoto, J. A., Fabbretti, A., & Milón, P. (2016). Conformational response of 30S-bound IF3 to A-site binders streptomycin and kanamycin. *Antibiotics*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics5040038>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & Michelle, M. R. (2015). Molecular Biology. In *Molecular Biology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 37–72). https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Colclough, A., Corander, J., Sheppard, S. K., Bayliss, S. C., & Vos, M. (2019). Patterns of cross-resistance and collateral sensitivity between clinical antibiotics and natural

- antimicrobials. *Evolutionary Applications*, 12(5), 878–887.
<https://doi.org/10.1111/eva.12762>
- Einsfeldt, K., Severo Júnior, J. B., Corrêa Argondizzo, A. P., Medeiros, M. A., Alves, T. L. M., Almeida, R. V., & Larentis, A. L. (2011). Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, 29(41), 7136–7143.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.073>
- Elvekrog, M. M., & Gonzalez, R. L. (2013). Conformational selection of translation initiation factor 3 signals proper substrate selection. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(5), 628–633. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2554>
- Fabbretti, A., Gualerzi, C. O., & Brandi, L. (2011). How to cope with the quest for new antibiotics. *FEBS Letters*, 585(11), 1673–1681.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.029>
- Fiser, A., & Sali, A. (2003). ModLoop: Automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics*, 19(18), 2500–2501. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg362>
- Giuliodori, A. M., Spurio, R., Milón, P., & Fabbretti, A. (2018). Antibiotics Targeting the 30S Ribosomal Subunit: A Lesson from Nature to Find and Develop New Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(24), 2080–2096.
<https://doi.org/10.2174/1568026618666181025092546>
- Gould, I. M., & Bal, A. M. (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*, 4(2), 185–191.
<https://doi.org/10.4161/viru.22507>
- Goyal, A., Belardinelli, R., & Rodnina, M. v. (2017). Non-canonical Binding Site for Bacterial Initiation Factor 3 on the Large Ribosomal Subunit. *Cell Reports*, 20(13), 3113–3122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.012>
- Grabowska, A. D. (2021). Translation of a Leaderless Reporter Is Robust During Exponential Growth and Well Sustained During Stress Conditions in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746320>

- Gualerzi, C. O., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, C., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J., & Pon, C. L. (2001). Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 66, 363–376. <https://doi.org/10.1101/sqb.2001.66.363>
- Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (2015). Initiation of mRNA translation in bacteria: Structural and dynamic aspects. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 22, pp. 4341–4367). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2010-3>
- Hatzopoulos, G. N., & Mueller-Dieckmann, J. (2007). Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of initiation factor 1 from Mycobacterium tuberculosis. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), 183–186. <https://doi.org/10.1107/S174430910700437X>
- Hatzopoulos, G. N., & Mueller-Dieckmann, J. (2010). Structure of translation initiation factor 1 from Mycobacterium tuberculosis and inferred binding to the 30S ribosomal subunit. *FEBS Letters*, 584(5), 1011–1015. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.051>
- Hentschel, J., Burnside, C., Mignot, I., Leibundgut, M., Boehringer, D., & Ban, N. (2017). The Complete Structure of the Mycobacterium smegmatis 70S Ribosome. *Cell Reports*, 20(1), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.029>
- Hussain, T., Llácer, J. L., Wimberly, B. T., Kieft, J. S., & Ramakrishnan, V. (2016). Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation. *Cell*, 167(1), 133–144.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.074>
- Huter, P., Graf, M., & Wilson, D. N. (2021). *Ribozymes: The Ribosome and Protein Synthesis* (S. Muller, B. Masquida, & W. Winkler, Eds.; First ed.). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527814527.ch8>
- IACG. (2019). *No time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections*. <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>

- Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., & Müller, S. (2016). Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR. *Microbial Cell Factories*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0610-8>
- Julián, P., Milon, P., Agirrezabala, X., Lasso, G., Gil, D., Rodnina, M. V., & Valle, M. (2011). The cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001095>
- Kaberdina, A. C., Szaflarski, W., Nierhaus, K. H., & Moll, I. (2009). An Unexpected Type of Ribosomes Induced by Kasugamycin: A Look into Ancestral Times of Protein Synthesis? *Molecular Cell*, *33*(2), 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.014>
- Karp, G., Iwasa, J., & Marshall, W. (2016). Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. In *Wiley*. <https://www.wiley.com/en-us/Karp%27s+Cell+and+Molecular+Biology%3A+Concepts+and+Experiments%2C+8th+Edition-p-9781118883846>
- Karp, P. D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C. A., Latendresse, M., Kothari, A., Keseler, I. M., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, Q., Ong, W. K., Paley, S. M., & Subhraveti, P. (2018). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J., Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077>
- Kumar, N., Sharma, S., & Kaushal, P. S. (2021). Protein synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* as a potential target for therapeutic interventions. *Molecular Aspects of Medicine*, *81*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101002>
- Kyrpides, N. C., & Woese, C. R. (1998). *Universally conserved translation initiation factors* (Vol. 95). www.tigr.org.

- Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 101–123. <https://doi.org/10.1128/mnbr.69.1.101-123.2005>
- Leiva, L. E., & Katz, A. (2022). Regulation of Leaderless mRNA Translation in Bacteria. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040723>
- Li, Y., Sharma, M. R., Koripella, R. K., Yang, Y., Kaushal, P. S., Lin, Q., Wade, J. T., Gray, T. A., Derbyshire, K. M., Agrawal, R. K., & Ojha, A. K. (2018). Zinc depletion induces ribosome hibernation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(32), 8191–8196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804555115>
- Londei, P. (2005). Evolution of translational initiation: New insights from the archaea. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 29, Issue 2, pp. 185–200). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.10.002>
- Lönnroth, I., & Ridell, M. (1985). Analyses of ribosomal proteins from mycobacteria with particular reference to the β antigen. *FEMS Microbiology Letters*, 27(2), 203–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00668.x>
- Mabhula, A., & Singh, V. (2019). Drug-resistance in: Mycobacterium tuberculosis: Where we stand. In *MedChemComm* (Vol. 10, Issue 8, pp. 1342–1360). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9md00057g>
- Macdougall, D. D., & Gonzalez, R. L. (2015). Translation initiation factor 3 regulates switching between different modes of ribosomal subunit joining. *Journal of Molecular Biology*, 427(9), 1801–1818. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.024>
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A., & Koonin, E. v. (2001). *Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins.* <http://genomebiology.com/2001/2/9/research/0033.1>
- Marshall, R. A., Aitken, C. E., & Puglisi, J. D. (2009). GTP Hydrolysis by IF2 Guides Progression of the Ribosome into Elongation. *Molecular Cell*, 35(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.008>

- Milon, P., Carotti, M., Konevega, A. L., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V., & Gualerzi, C. O. (2010). The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Reports*, *11*(4), 312–316. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.12>
- Milon, P., Konevega, A. L., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. V. (2008). Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation. *Molecular Cell*, *30*(6), 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.014>
- Milon, P., Konevega, A. L., Peske, F., Fabbretti, A., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. v. (2007). Transient Kinetics , Fluorescence , and FRET in Studies of Initiation of Translation in Bacteria. In *Translation Initiation: Reconstituted Systems and Biophysical Methods* (First Edit, Vol. 430, Issue 07). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)30001-3)
- Milón, P., Maracci, C., Filonava, L., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. V. (2012). Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(6), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2285>
- Milón, P., & Rodnina, M. V. (2012). Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *47*(4), 334–348. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.678284>
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., la Teana, A., Rodnina, M., Pon, C., Boelens, R., & Gualerzi, C. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(38), 13962–13967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606384103>
- MINSA. (2018). *Boletín epidemiológico del Perú: Volumen 27 - SE 07*. <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/07.pdf>
- Mishra, S., Ahmed, T., Tyagi, A., Shi, J., & Bhushan, S. (2018). Structures of Mycobacterium smegmatis 70S ribosomes in complex with HPF, tmRNA, and P-tRNA. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31850-3>
- Molecular Probes. (2006). *Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit (A30006)*.

- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C. O., & Bläsi, U. (2002). Leaderless mRNAs in bacteria: Surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Molecular Microbiology*, 43(1), 239–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02739.x>
- Moll, I., Hirokawa, G., Kiel, M. C., Kaji, A., & Bläsi, U. (2004). Translation initiation with 70S ribosomes: An alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 32(11), 3354–3363. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh663>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Musa Wilson, D. (2020). *Assembly of functional centers in the ribosomal 60S subunit*. Carnegie Mellon University.
- Nakamoto, J. A. (2019). *Cambios conformacionales del factor de iniciación IF3 en el ribosoma durante el inicio de la traducción* [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/8946>
- Nakamoto, J. A., Evangelista, W., Vinogradova, D. S., Konevega, A. L., Spurio, R., Fabbretti, A., & Milón, P. (2021). The dynamic cycle of bacterial translation initiation factor IF3. *Nucleic Acids Research*, 49(12), 6958–6970. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab522>
- OMS. (2017). Global Investments in Tuberculosis Research and Development: Past, Present, and Future. In *World Health Organization*. http://www.who.int/tb/publications/2017/Global_Investments_in_Tuberculosis_Research_Investment/en/#.W1bBQGYrvo.mendeley%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259412/9789241513326-eng.pdf?sequence=1
- OMS. (2019). *Global tuberculosis report 2019*.
- OMS. (2020). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4, Treatment: drug-resistant tuberculosis treatment*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048>

- OMS. (2021). *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
- OPS. (2021). Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. In *Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020*. Pan American Health Organization.
<https://doi.org/10.37774/9789275324479>
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Perona, F., & Timoteo Prado, A. (2017). *Producción del dominio c-terminal del factor de iniciación IF2 de Escherichia coli y Geobacillus stearothermophilus como blanco de posibles aptámeros* [Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas].
<http://hdl.handle.net/10757/622683>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82.
<https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Plackett, B. (2020). Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature*, 586, 50–52.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-02884-3>
- Projan, S. J. (2003). Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 5, pp. 427–430). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.003>
- Qin, D., & Fredrick, K. (2009). Control of translation initiation involves a factor-induced rearrangement of helix 44 of 16S ribosomal RNA. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06598.x>
- Rasmussen, R. A., Camarillo, J. M., Sosnowski, V., Cho, B.-K., Goo, Y. A., Lucks, J. B., & O'halloran, T. v. (2022). *Zur and Zinc Increase Expression of E. coli Ribosomal Protein L31 Through RNA-Mediated Repression of the Repressor L31p*.
<https://doi.org/10.1101/2022.05.27.493739>

- Risuleo, G., Gualerzi, C., & Pon, C. (1976). Specificity and Properties of the Destabilization, Induced by Initiation Factor IF- 3, of Ternary Complexes of the 30- S Ribosomal Subunit, Aminoacyl- tRNA and Polynucleotides. *European Journal of Biochemistry*, 67(2), 603–613. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10726.x>
- Sala, A., Bordes, P., & Genevaux, P. (2014). Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Toxins* (Vol. 6, Issue 3, pp. 1002–1020). <https://doi.org/10.3390/toxins6031002>
- Sánchez Castro, A. (2022). *Selección de aptámeros de ADN con unión al factor IF3 y su caracterización durante la fase de iniciación de la síntesis de proteínas en Escherichia coli* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/18576#:~:text=https%3A/hdl.handle.net/20.500.12672/18576>
- Sawyer, E. B., Grabowska, A. D., & Cortes, T. (2018). Survey and summary: Translational regulation in mycobacteria and its implications for pathogenicity. *Nucleic Acids Research*, 46(14), 6950–6961. <https://doi.org/10.1093/nar/gky574>
- Sawyer, E. B., Phelan, J. E., Clark, T. G., & Cortes, T. (2021). A snapshot of translation in *Mycobacterium tuberculosis* during exponential growth and nutrient starvation revealed by ribosome profiling. *Cell Reports*, 34(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108695>
- Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). *PyMol*. <http://www.pymol.org/pymol>
- Shao, Y., Harrison, E. M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H. Y., Rajakumar, K., & Deng, Z. (2011). TADB: A web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq908>
- Shasmal, M., & Sengupta, J. (2012). Structural diversity in bacterial ribosomes: *Mycobacterium* 70s ribosome structure reveals novel features. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031742>
- Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). *The 3'-Terminal Sequence of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites (terminal labeling/stepwise degradation/protein synthesis/suppression)* (Vol. 71, Issue 4). <https://www.pnas.org>

- Singh, J., Mishra, R. K., Ayyub, S. A., Hussain, T., & Varshney, U. (2022). The initiation factor 3 (IF3) residues interacting with initiator tRNA elbow modulate the fidelity of translation initiation and growth fitness in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *50*(20), 11712–11726. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1053>
- Smith, C., Canestrari, J. G., Wang, A. J., Champion, M. M., Derbyshire, K. M., Gray, T. A., & Wade, J. T. (2022). *Pervasive translation in Mycobacterium tuberculosis*. *11*, 73980. <https://doi.org/10.7554/eLife>
- Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 689–696). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>
- Sussman, J. K., Simons, E. L., & Simons, R. W. (1996). *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Molecular Microbiology*, *21*(2), 347–360.
- Tabira, Y., Ohara, N., Kitaura, H., Matsumoto, S., Naito,) M, & Yamada, T. (1998). The 16-kDa α -crystallin-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG is produced under conditions of oxygen deficiency and is associated with ribosomes. In *Res. Microbiol* (Vol. 149).
- Tedin, K., Moll, I., Grill, S., Resch, A., Graschopf, A., Gualerzi, C. O., & Bläsi, U. (1999). Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs. *Molecular Microbiology*, *31*(1), 67–77. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01147.x>
- Trauner, A., Loughheed, K. E. A., Bennett, M. H., Hingley-Wilson, S. M., & Williams, H. D. (2012). The dormancy regulator DosR controls ribosome stability in hypoxic mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(28), 24053–24063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364851>
- Udagawa, T., Shimizu, Y., & Ueda, T. (2004). Evidence for the Translation Initiation of Leaderless mRNAs by the Intact 70 S Ribosome without Its Dissociation into Subunits in Eubacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8539–8546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308784200>

- United Nations Environment Programme. (2023). *Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. <https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action>
- Vimberg, V., Tats, A., Remm, M., & Tenson, T. (2007). Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-100>
- Walsh, C. T., & Wencewicz, T. A. (2014). Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. *Journal of Antibiotics*, 67(1), 7–22. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.49>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*.
- WHO. (2020). *WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4, Treatment: Drug-resistant tuberculosis treatment*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240006997>
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2010). *Prescott's Microbiology*.
- Wilson, D. N. (2009). The A-Z of bacterial translation inhibitors. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 44, Issue 6, pp. 393–433). <https://doi.org/10.3109/10409230903307311>
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 35–48). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wu, L., Huang, C., Emery, B. P., Sedgwick, A. C., Bull, S. D., He, X. P., Tian, H., Yoon, J., Sessler, J. L., & James, T. D. (2020). Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 49, Issue 15, pp. 5110–5139). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9cs00318e>

Yang, K., Chang, J. Y., Cui, Z., Li, X., Meng, R., Duan, L., Thongchol, J., Jakana, J., Huwe, C. M., Sacchetti, J. C., & Zhang, J. (2017). Structural insights into species-specific features of the ribosome from the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 45(18), 10884–10894. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx785>

10 CRONOGRAMA

Etapa	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4				Mes 5				Mes 6				
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Revisión Bibliográfica	x	x	x																						
Redacción Protocolo			x	x	x																				
Estudio <i>in silico</i>																									
Comparación de secuencias de aminoácidos				x	x																				
Comparación de estructuras tridimensionales					x	x																			
Transformación							x	x																	
Producción Proteína																									
Inducción Analítica									x	x	x	x													
Inducción Preparativa													x	x											
Purificación Proteína															x	x	x								
Marcado Fluorescente																	x	x	x						
Mediciones en flujo-detenido																			x	x					
Redacción informe																						x	x	x	x

11 PRESUPUESTO

	Material	Costo (soles)
Los	Materiales de plástico y de vidrio (Tubos de ensayo, placas Petri, pipetas, matraces, eppendorfs, etc.)	S/. 3 000.00
	Reactivos y soluciones (Buffers, antibiótico, IPTG, TCEP, maleimido, fluoróforos, mercaptoetanol, etc.)	S/. 5 000.00
	Material Biológico (Plásmido <i>infA</i> , plásmido <i>infC</i> , enzimas, nucleótidos, aminoácidos, etc.)	S/. 2 500
	Medios de cultivo (SOC, LB)	S/. 1 000
	Columna de purificación	S/. 2 500
	Equipos y mantenimiento (Termociclador, equipo de electroforesis, incubadora, centrifugadora, sonicador, etc.) *Todos los equipos ya existen en el laboratorio	S/. 50 000*
	TOTAL	S/. 64 000

costos serán solventados por el Laboratorio de Biomolecular de Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Lima, Perú.

12 ANEXOS

<i>Proteína</i>	<i>Pellet</i>	<i>Medio LB</i>	<i>Pellet total</i>
<i>Mtb-IF1</i>	1.96 g	0.5 L	3.82 g
	1.86 g	0.5 L	
<i>Mtb-IF1_{D5C}</i>	3.49 g	1 L	6.77 g
	3.28 g	1 L	
<i>Mtb-IF3</i>	1.50 g	0.5 L	3.20 g
	1.70 g	0.5 L	
<i>Mtb-IF3_{D157C}</i>	2.40 g	0.5 L	4.40 g
	2.00 g	0.5 L	

Tabla 4: Gramos de pellet celular (peso mojado) producidos a partir de 1-2 L de medio LB. Los gramos de pellet celular resaltados en negrito son los que se usaron para la posterior purificación de las proteínas.