



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

“Efecto de la unión de aptámeros de DNA dirigidos al Factor de Iniciación 2 (IF2) durante la traducción bacteriana en *Escherichia coli*”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTORA: Tello Yparraguirre, Lesia Noelia
(ORCID: 0000-0003-0871-4297)

ASESORES: Cruz Neyra, Lidia Luz
(ORCID: 0000-0003-3902-4280)

Milón Mayer, Pohl Luis (externo)
(ORCID: 0000-0001-6679-5473)

Lima, Perú
2023

Metadatos Complementarios

Datos de autor(a):

Tello Yparraguirre, Lesia Noelia

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 76245410

Datos del(a) Asesor(a):

Cruz Neyra, Lidia Luz

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 08406252

Datos de los Miembros del Jurado:

PRESIDENTE: Gonzales Molfino, Hugo Mauricio

DNI: 10252143

ORCID: 0000-0003-4320-2078

MIEMBRO: Guerra Santa Cruz, Alcides

DNI: 28260663

ORCID: 0000-0002-5130-8190

MIEMBRO: Pineda Chavarria, Roberto Christian

DNI: 10308965

ORCID: 0000-0001-9388-1342

Datos de la investigación:

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.07

Código del Programa: 511206

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Lesia Noelia Tello Yparaguire, con código de estudiante N° 201610803, con (DNI o Carné de Extranjería¹) N° 76245410, con domicilio en Calle Loma de Campanillas 150, distrito SURCO, provincia y departamento de 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: "Efecto de la unión de aptámeros de DNA dirigidos al factor de Iniciación 2 (IF2) durante la traducción bacteriana en Escherichia coli"


es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Lidia Luz Cruz Neura, 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 13 % 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, 07 de MAYO de 2023


Lesia Noelia Tello Yparaguire
(Nombre completo)

(DNI o Carné de Extranjería
N°) 76245410


Mg. Mario Martín Pauta Gálvez
Jefe Unidad Grados y Títulos
FCB

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

Efecto de la unión de aptámeros de DNA dirigidos al Factor de Iniciación 2 (IF2) durante la traducción bacteriana en Escherichia coli

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	4%
2	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1%
3	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
4	patents.google.com Fuente de Internet	<1%
5	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	Maria Meyer, Paul Schweiger, Uwe Deppenmeier. "Succinic semialdehyde reductase Gox1801 from Gluconobacter oxydans in comparison to other succinic semialdehyde-reducing enzymes", Applied Microbiology and Biotechnology, 2014 Publicación	<1%

7	ebuah.uah.es Fuente de Internet	<1 %
8	livros01.livrosgratis.com.br Fuente de Internet	<1 %
9	www.tdx.cat Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	www.aau.dk Fuente de Internet	<1 %
12	www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet	<1 %
13	bibliotecadigital.exactas.uba.ar Fuente de Internet	<1 %
14	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
15	riaa.uaem.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
16	upc.aws.openrepository.com Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.unican.es Fuente de Internet	<1 %

19	zaguan.unizar.es Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to Medizinischen Universität Wien Trabajo del estudiante	<1 %
21	rehip.unr.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
22	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
23	"Antibiotic Drug Resistance", Wiley, 2019 Publicación	<1 %
24	docksci.com Fuente de Internet	<1 %
25	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
26	www.monografias.com Fuente de Internet	<1 %
27	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1 %
28	prod--journal.elifesciences.org Fuente de Internet	<1 %
29	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
30	riaa.uaem.mx Fuente de Internet	<1 %

31	"Estructuras de RNA y su impacto sobre el inicio de la traducción del mRNA genómico de HIV-1 y del SmRNA de ANDV", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2019 Publicación	<1 %
32	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1 %
33	Hassan Zafar, Ahmed H. Hassan, Gabriel Demo. "Translation machinery captured in motion", WIREs RNA, 2023 Publicación	<1 %
34	Sánchez Osuna, Miquel. "Origen y evolución de los genes que confieren resistencia clínica a sulfamidas y a trimetoprim", 2020, 2020 Fuente de Internet	<1 %
35	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1 %
36	tesisenred.net Fuente de Internet	<1 %
37	www.springerprofessional.de Fuente de Internet	<1 %
38	riunet.upv.es Fuente de Internet	<1 %
39	Milon, P.. "Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation", Molecular Cell,	<1 %

20080620

Publicación

40

buleria.unileon.es

Fuente de Internet

<1 %

41

d-nb.info

Fuente de Internet

<1 %

42

link.springer.com

Fuente de Internet

<1 %

43

psasir.upm.edu.my

Fuente de Internet

<1 %

44

Submitted to Desarrollo Educativo S.A.
Instituto Toulouse Lautrec

Trabajo del estudiante

<1 %

45

Estrella Rubio Solsona. "ESTUDIO DE LA
PROTEÍNA ANKK1 EN LA FIBRA MUSCULAR:
IMPLICACIONES EN DISTROFIAS
MUSCULARES.", Universitat Politecnica de
Valencia, 2018

Publicación

<1 %

46

Michael Famulok, Jörg S. Hartig, Günter
Mayer. "Functional Aptamers and Aptazymes
in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy",
Chemical Reviews, 2007

Publicación

<1 %

47

espaciologopedico.com

Fuente de Internet

<1 %

48	iacobus.usc.es Fuente de Internet	<1 %
49	onlinelibrary.wiley.com Fuente de Internet	<1 %
50	repositorio-aberto.up.pt Fuente de Internet	<1 %
51	www.encolombia.com Fuente de Internet	<1 %
52	1library.co Fuente de Internet	<1 %
53	Claudio O. Gualerzi, Anna Maria Giuliadori. "Translation Initiation in Bacteria: Factors and Mechanisms", Elsevier BV, 2021 Publicación	<1 %
54	SEYED MEHDI BANI HASHEMIAN. "RESPUESTA DE DISTINTOS GENOTIPOS DE CÍTRICOS Y GÉNEROS AFINES A LA INFECCIÓN CON VIROIDES", Universitat Politecnica de Valencia, 2009 Publicación	<1 %
55	bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443 Fuente de Internet	<1 %
56	docplayer.com.br Fuente de Internet	<1 %
57	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %

<1 %

58 **doku.pub**
Fuente de Internet

<1 %

59 **dx.doi.org**
Fuente de Internet

<1 %

60 **ecodes.org**
Fuente de Internet

<1 %

61 **eudict.com**
Fuente de Internet

<1 %

62 **opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de**
Fuente de Internet

<1 %

63 **othes.univie.ac.at**
Fuente de Internet

<1 %

64 **pesquisa.bvsalud.org**
Fuente de Internet

<1 %

65 **repositorio.uladech.edu.pe**
Fuente de Internet

<1 %

66 **repositorio.unprg.edu.pe**
Fuente de Internet

<1 %

67 **revistas.usat.edu.pe**
Fuente de Internet

<1 %

68 **wiki2.org**
Fuente de Internet

<1 %

69	www.arca.fiocruz.br Fuente de Internet	<1 %
70	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
71	www.piercenet.com Fuente de Internet	<1 %
72	www.teldat.com Fuente de Internet	<1 %
73	"Alteración del período circadiano del reloj proteico KaiABC mediante diseño racional del estado de transición de replegamiento de la proteína metamórfica KaiB", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2023 Publicación	<1 %
74	"Inter-American Yearbook on Human Rights / Anuario Interamericano de Derechos Humanos, Volume 33 (2017)", Brill, 2018 Publicación	<1 %
75	Chao Zhu, Ge Yang, Murtaza Ghulam, Linsen Li, Feng Qu. "Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers", Biotechnology Advances, 2019 Publicación	<1 %
76	Daniel J. Schneider, Sean A. Lynch, Amy D. Gelinas, Rachel M. Ostroff et al. "SOMAmer	<1 %

reagents and the SomaScan platform: Chemically modified aptamers and their applications in therapeutics, diagnostics, and proteomics", Elsevier BV, 2022

Publicación

77

Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con *Pleurotus ostreatus*", Universitat Politecnica de Valencia, 2023

Publicación

<1 %

78

Mark G. Rippon, Alan A. Rogers, Karen Ousey. "Estrategias de protección antimicrobiana en el cuidado de heridas: evidencia para el uso de apósitos recubiertos con DACC", Journal of Wound Care, 2021

Publicación

<1 %

79

Paola Londei. "Translation Initiation Models in Prokaryotes and Eukaryotes", Wiley, 2015

Publicación

<1 %

80

Vicente Pascual Ibiza Gimeno. "Nuevas herramientas en la lucha contra las virosis del pimiento", 'Universitat Politecnica de Valencia', 2015

Fuente de Internet

<1 %

81

Vilius Malunavicius, Gytis Druteika, Mikas Sadauskas, Ausra Veteikyte et al. "Usage of GD-95 and GD-66 lipases as fusion partners leading to improved chimeric enzyme

<1 %

LipGD95-GD66", International Journal of Biological Macromolecules, 2018

Publicación

82	acikbilim.yok.gov.tr Fuente de Internet	<1 %
83	elifesciences.org Fuente de Internet	<1 %
84	oa.upm.es Fuente de Internet	<1 %
85	qdoc.tips Fuente de Internet	<1 %
86	repositorio.usmp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
87	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
88	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1 %
89	www.jove.com Fuente de Internet	<1 %
90	www.rsc.org Fuente de Internet	<1 %
91	www.sinergiaanimal.org Fuente de Internet	<1 %
92	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1 %

93 Philipp S. Orekhov, Ekaterina G. Kholina, Marine E. Bozdaganyan, Alexey M. Nesterenko et al. "Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations", The Journal of Physical Chemistry B, 2018

Publicación

<1%

94 [dokumen.pub](#)

Fuente de Internet

<1%

95 [elrincondelcalmecac.wordpress.com](#)

Fuente de Internet

<1%

96 BERNARDO CUENCA BONO. "Identificación y caracterización de elementos reguladores de la expresión de SUS1 y nuevas funciones celulares para la proteína Sus1 en Saccharomyces cerevisiae", Universitat Politecnica de Valencia, 2016

Publicación

<1%

97 Ilkin Yapici, E. Han Dao, Shun Yokoi, Ebru Destan et al. "4D Crystallography Captures Transient IF1-Ribosome Dynamics in Translation Initiation", Cold Spring Harbor Laboratory, 2023

Publicación

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

*A mis papás,
por apoyarme durante toda mi carrera,
por velar por mi salud y comodidad,
por auspiciar mis viajes académicos
y encargarse de mi bendición cuando
me pasaba 12 horas en laboratorio.*

*A monona, mi bendición,
por tanto amor.*

**“Todos los que nos dedicamos a ciencias básicas tenemos un tanto de locos y
otro tanto de nerds”**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pohl Milón Mayer, por haberme dado la oportunidad de aprender de su ciencia directamente de él. Gracias por el apoyo y por la paciencia, por no rendirse cuando me pregunta cosas y por esperar la respuesta correcta hasta que se exprima mi última neurona. Por no solo ser mi mentor, sino también por la amistad y los agradables y divertidos momentos dentro y fuera del laboratorio. Y gracias también por hacer de su laboratorio un lugar al que dan ganas de ir todos los días.

A la MSc. Ana Elena Sanchez Castro, por la guía, el apoyo y la amistad que me brindó en la realización de esta tesis. Por contestar mis preguntas en apuros. Por comprender mi ansiedad y por todos los cheems que siempre me sacaron sonrisas.

A Gabriel Mendoza Rojas por ser mi gran compañero y amigo del lab, por enseñarme con paciencia las cosas y dónde tenía que buscar, por sus consejos y todas las veces que me hizo reír con “chicho” junto con Mario.

A Mario por acompañarme siempre de regreso en bici, esperarme y hasta empujarme si era necesario. Por todas las veces que nos acompañamos purificando proteínas y por mantener la amistad de años.

A Katherin Peñaranda, José Alberto Nakamoto, Roberto Alcántara, Vanessa Sarabia, Victoria Poma, por todos los consejos y lo que me enseñaron en algún momento. Por la amistad y por siempre estar. Y también a los demás integrantes del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación, todos, por hacer ese espacio tan agradable y ameno.

A la Dra. Lidia Cruz por asesorarme, revisar, corregir y ayudarme rápidamente con los documentos necesarios para los trámites diversos. Por ser una querida profesora y por haberme ayudado incontables veces durante mi carrera en la URP.

A mis profesores miembros jurados de esta tesis, por comprender, hacerse un tiempo y ayudarme con la revisión de mi tesis en tiempo record. Valoro mucho su tiempo, las correcciones y críticas constructivas.

A mis amigos de la URP, por tantas risas -y llantos- y todas esas trasnochadas de estudios.

A mis amigos molineros, por no dejarme ir, por apoyarme y por mantenerme en sus corazones siempre. Son los mejores amigos.

A Gian, por todo el amor, el apoyo, la barra, la amistad, por venir a verme cuando estaba cansada y por la buena cara que siempre pones a todo. Por regalarme tanto bien a mi vida, y por llevarme siempre de la mano a todos lados.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	8
1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
1.4 OBJETIVOS.....	12
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Aptámeros.....	14
2.2 Iniciación de la traducción.....	19
2.3 Factor de Iniciación 2 (IF2).....	21
III. ANTECEDENTES.....	23
3.1 Factor de Iniciación 2 en la iniciación de la traducción.....	23
3.2 Aptámeros para el Factor de Iniciación 2.....	24
3.3 Métodos basados en FRET usando el Stopped-Flow.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Lugar de ejecución.....	29
5.2 Tipo y diseño de investigación.....	29
5.3 Variables.....	29
5.4 Operacionalización de las variables.....	29
5.5 Procedimiento.....	30
5.5.1 Predicción de la estructura 3D del Apt ³¹¹ y del complejo IF2·Apt ³¹¹	30
5.5.1.1 Predicción de la estructura 3D del Apt ³¹¹	30
5.5.1.2 Predicción de la interacción 3D entre el Apt ³¹¹ e IF2.....	31
5.5.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes IF2 α	32

5.5.2.1	Expresión analítica	32
5.5.2.2	Expresión preparativa	34
5.5.2.3	Purificación de proteína IF2 α	35
5.5.3	Expresión y purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}	36
5.5.3.1	Expresión analítica de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}	36
5.5.3.2	Expresión preparativa de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}	38
5.5.3.3	Purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}	39
5.5.4	Marcación fluorescente de IF2 γ_{G810C}	42
5.5.5	Marcación fluorescente de IF3 $E166C$	43
5.5.6	Ensayos de cinética por FRET.....	44
VI.	RESULTADOS	47
6.1	Expresión y purificación de IF2 α	47
6.2	Efecto del Apt 311 respecto de la llegada del tRNA $_i$ al 30S PIC	48
6.3	Modelamiento del Apt 311 y Docking molecular entre IF2 y el Apt 311	49
6.4	Expresión y purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}	50
6.5	Marcación fluorescente de IF2 γ_{G810C} e IF3 $E166C$	53
6.6	Caracterización de la señal FRET IF2 γ_Q -IF3 C_D	54
6.7	El Apt 311 no afecta la unión de IF2 al complejo 30S·IFs	56
6.8	Formación del 30S IC en función del Apt 311	56
6.9	Formación del 70S IC en función de Apt 311	57
VII.	DISCUSIÓN	60
VIII.	CONCLUSIONES	65
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
X.	ANEXOS.....	81

ABREVIACIONES

aSD – Secuencia anti Shine-Dalgarno
DNA – Ácido desoxirribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
mRNA – ARN mensajero
mRNA^(AUG) – ARN mensajero con codón de iniciación AUG
BPY – BODIPY
BSA – Albúmina de suero bovino
CTD – Dominio C terminal
CV – Volúmenes de columna
cryo-EM – Criomicroscopía electrónica
DMSO – Dimetilsulfóxido
EC – Complejo competente de Elongación
flu – Fluoresceína
FRET – Transferencia de energía de resonancia de Förster
HEPES – ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-iletanosulfónico
IC – Complejo de Iniciación
IFs – Factores de Iniciación
IPTG – isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
 k_{app} – Constante aparente
 k_{-1} – Constante microscópica de disociación
LB – Lysogeny Broth
M – Molar
NTD – Dominio N terminal
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
OD – Densidad óptica
ORF – Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
PIC – Pre-Complejo de Iniciación
RPM – Revoluciones por minuto
SB – Sample Buffer
SD – Secuencia Shine-Dalgarno
SDS – Dodecilsulfato de sodio
SNPs – Polimorfismos de nucleótido único (Single nucleotide polymorphisms)
sm-FRET – Single molecule FRET
TCEP – Tris(2-carboxyethyl)phosphine
tRNAi – fMet-tRNA^{fMet}
u.a. – unidades arbitrarias
vs. – versus
wt – wild-type (salvaje)

RESUMEN

La creciente propagación de bacterias multidrogo resistentes ha repercutido en la crisis global de resistencia a antibióticos que enfrentamos hoy en día. Es imperativo el desarrollo de fármacos con novedosos blancos que puedan burlar los sistemas de evasión a antibióticos adquiridos. Los aptámeros, como alternativa para evitar la propagación bacteriana, son secuencias cortas de ácidos nucleicos de una sola hebra seleccionados por su alta afinidad a moléculas diana específicas, a las que se unen adoptando una conformación tridimensional. Estos tienen un alto potencial farmacológico al usarlos como moléculas inhibitoras de otras implicadas en procesos vitales. IF2 es una proteína multidomínios que juega un rol esencial en la iniciación de la traducción bacteriana: recluta al tRNA de iniciación a través del dominio C2, promueve el emparejamiento de bases codón-anticodón y la asociación de la subunidad 50S al complejo 30S IC, hidroliza GTP mediante el dominio G2 y permite la maduración del 70S IC en 70S EC. Se han identificado previamente aptámeros dirigidos a IF2 planteando bloquear sus funciones en el marco de la síntesis proteica. En el presente trabajo, se seleccionó al aptámero 311 (Apt³¹¹) para evaluar las posibles perturbaciones que causa en IF2 con respecto a la iniciación de la traducción mediante parámetros cinéticos usando el sistema FRET *in vitro* y aproximaciones *in silico*. Los resultados demostraron que el Apt³¹¹ perturba el reclutamiento del tRNA_i de IF2 y su posterior acomodación en el sitio P de la subunidad ribosomal 30S durante la formación del complejo 30S IC. Asimismo, el Apt³¹¹ impide la asociación de la subunidad 50S y, por ende, la formación del complejo 70S IC. En efecto, el Apt³¹¹ es una molécula con potencial antibiótico que inhibe las funciones fundamentales de IF2 en la iniciación de la traducción probablemente debido a su unión a nivel de los dominios C1 y G3 de IF2, impidiendo la comunicación alostérica entre los dominios G2 y C2.

Palabras clave: Aptámeros, cinética rápida, FRET, IF2, ribosoma, traducción bacteriana.

ABSTRACT

The increasing spread of multidrug-resistant bacteria has had an impact on the global antibiotic resistance crisis we face today. The development of drugs with novel targets that can circumvent acquired antibiotic evasion systems is imperative. Aptamers, as an alternative to prevent bacterial spread, are short single-stranded nucleic acid sequences selected for their high affinity to specific target molecules, to which they bind in a three-dimensional conformation. These have a high pharmacological potential when used as inhibitory molecules of others involved in vital processes. IF2 is a multidomain protein that plays an essential role in bacterial translation initiation: it recruits the initiation tRNA through the C2 domain, promotes codon-anticodon base pairing and the association of the 50S subunit to the 30S IC complex, hydrolyzes GTP via the G2 domain and allows maturation of the 70S IC into the 70S EC. Suitable targets directed at IF2 have previously been identified, proposing to block its functions in the context of protein synthesis. In the present work, aptamer 311 (Apt³¹¹) was selected to evaluate the possible perturbations it causes in IF2 with respect to translation initiation by kinetic parameters using the *in vitro* FRET system and *in silico* approaches. The results demonstrated that Apt³¹¹ perturbs the recruitment of IF2 tRNA_i and its subsequent accommodation in the P-site of the 30S ribosomal subunit during the formation of the 30S IC complex. Likewise, Apt³¹¹ prevents the association of the 50S subunit and, therefore, the formation of the 70S IC complex. Indeed, Apt³¹¹ is a molecule with antibiotic potential that inhibits the fundamental functions of IF2 in the initiation of translation, probably due to its binding to the C1 and G3 domains of IF2, preventing allosteric communication between the G2 and C2 domains.

Key words: Aptamers, bacterial translation, FRET, IF2, rapid kinetics, ribosome.

I. INTRODUCCIÓN

La síntesis de proteínas es un proceso de decodificación donde se transcribe la información almacenada en un gen y se traduce para obtener su respectiva proteína. La traducción consta de cuatro fases que conforman un mecanismo cíclico: La **fase de iniciación** comprende el ensamblaje de la maquinaria de traducción con la unión del primer aminoácido (fMet en procariotas) al complejo. Luego, se desarrolla la cadena polipeptídica mediante la incorporación de aminoácidos durante la **fase de elongación**. Cuando el ribosoma reconoce el codón de *stop*, se libera la proteína en la **fase de terminación**. Finalmente, se reacomodan los factores involucrados durante la **fase de reciclaje** para comenzar otro ciclo.

La correcta formación de los complejos de iniciación en la fase de iniciación es vital para el desarrollo y procesamiento de la maquinaria que concluye con la síntesis de proteínas. Particularmente, el Factor de Iniciación 2 (IF2) es una molécula clave en la fase de iniciación pues recluta al tRNA de iniciación (tRNA_i), promueve el emparejamiento de bases codón-anticodón y tiene actividad GTPasa que permite la maduración del Complejo de Iniciación (IC) 70S al Complejo competente de Elongación (EC) 70S, dando inicio a la fase de elongación. Dada la importancia de este factor en la fase de iniciación, se plantea que IF2 sería un potencial objetivo para tratamientos antimicrobianos.

Existen numerosos antibióticos que tienen como objetivo la traducción bacteriana, cuya diana es, en su mayoría, la fase de elongación. Sin embargo, existen muy pocos que afectan directamente a la fase de iniciación. En una coyuntura actual en la que la resistencia a antibióticos es un problema global al cual hay que hacer frente, se debe promover la síntesis de nuevos antibióticos que tengan blancos novedosos.

De esta manera, el presente estudio plantea la identificación de nuevas moléculas con capacidad para inhibir procesos moleculares esenciales para las bacterias, enfocándose estratégicamente en el uso de aptámeros de DNA con alta afinidad hacia el factor fundamental IF2. Este proceso alteraría la correcta formación de los Complejos de Iniciación, reacción esencial que da comienzo a la síntesis de proteínas, y proporcionaría los ensayos preliminares respecto del surgimiento de potenciales antibióticos.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antibióticos son compuestos naturales, sintéticos o semi-sintéticos que, interfiriendo con procesos biológicos esenciales de las bacterias, disminuyen o impiden su proliferación (Giuliodori *et al.*, 2018) y, por tanto, son comúnmente usados en el tratamiento y prevención de infecciones (Sultan *et al.*, 2018). Estos han transformado la medicina y salvado millones de vidas desde la introducción de la penicilina en 1940 (Lobanovska & Pilla, 2017). Inicialmente, la aparición de nuevos

patógenos no era un asunto de preocupación porque se mantuvo una constante investigación por antibióticos durante su “Era Dorada”. Es así que el desarrollo de nuevas drogas decreció a partir de 1960. Todas las clases de antibióticos hoy en día recetados fueron producidos durante esta etapa (revisado en McPhillie *et al.*, 2015). Ello, junto con un incremento masivo de consumo de antibióticos, no solo en el sector salud sino también en la agricultura, ganadería y acuicultura, ha llevado a la crisis de resistencia a antibióticos que enfrentamos hoy en día (Windels *et al.*, 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó la resistencia antimicrobiana como una de las mayores amenazas para la salud global (World Health Organization, 2019). Cada año, se estima que las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos resultan en más de 33.000 y 35.000 muertes en Europa y Estados Unidos, respectivamente (Cassini *et al.*, 2019; CDC, 2019). Una revisión encargada por el gobierno del Reino Unido (O’Neill, 2014) estimó que las muertes por resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial podrían aumentar de aproximadamente 700.000 muertes al año a cerca de 10 millones de muertes al año para 2050.

Las bacterias han desarrollado mecanismos moleculares de resistencia que contrarrestan al fármaco a lo largo de su trayectoria, dividiéndose en 4 líneas de defensa: i) exclusión espacial por permeabilidad selectiva o bombas de eflujo; ii) modificación del fármaco, que previene la acumulación de este al atacarlo químicamente por reacciones de sustitución o hidrólisis (degradación); iii) modificación del objetivo, por sustitución de residuos, unión a un factor protector, o

cambio en la abundancia del objetivo (nivel de expresión); y iv) bypass metabólico, que evita la reacción química tóxica produciendo targets alternativos de baja afinidad (derivación) (Kapoor *et al.*, 2017; Yelin & Kishony, 2018). Estos mecanismos están codificados por cambios que podrían darse a escala genotípica, como mutaciones puntuales (SNPs) aguas arriba o dentro de los genes (ORF); a escala genómica, proporcionando cambios estructurales como la introducción de un promotor o casetes de genes; o a una escala superior al genoma como la transferencia horizontal de genes adquiriéndolos como plásmidos o integrándolos en el genoma por recombinación (Sultan *et al.*, 2018; Yelin & Kishony, 2018).

Los mecanismos microbianos de adaptación y resistencia a antibióticos superan rápidamente el largo y costoso proceso que implica la búsqueda de nuevas drogas hasta su comercialización, por lo que las industrias biotecnológicas y farmacéuticas han detenido o limitado considerablemente las inversiones para descubrir y desarrollar nuevos fármacos (Fernandes & Martens, 2017; Giuliadori *et al.*, 2018). A saber, cuesta entre 800 millones y 1 billón de dólares llevar una nueva droga al mercado y, en promedio, tarda más de 10 años en ingresar a la clínica (Lobanovska & Pilla, 2017). Asimismo, entre los principales 102 antibióticos autorizados para uso clínico entre 1943 y 2018, solo catorce han sido aprobados para uso comercial en los últimos 20 años (Giuliadori *et al.*, 2018).

Por lo tanto, sólo la investigación subvencionada públicamente podría satisfacer la necesidad de nuevos antibióticos (Fabbretti *et al.*, 2011). Considerando esto, es

necesario el compromiso y participación de los gobiernos en priorizar la investigación y desarrollo de tratamientos antibióticos nuevos y eficaces.

Los antibióticos se pueden clasificar según su mecanismo de acción en aquellos que tienen como blanco a: la síntesis de la pared celular, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis proteica y membrana celular (Kapoor *et al.*, 2017). La mayoría de los antibióticos de proveniencia natural y de importancia clínica se dirigen a la maquinaria traduccional, siendo la fase de elongación el blanco habitual (Giuliodori *et al.*, 2018). Muy pocos fármacos se dirigen a la fase de iniciación, a pesar de que provee un amplio espectro específico para bacterias por ser el paso menos conservado entre Procariotas y Eucariotas (Myasnikov *et al.*, 2009). Sin embargo, todavía ninguno de estos compuestos ha sido aprobado clínicamente (Wilson, 2014).

En el presente proyecto se plantea obtener una nueva clase de inhibidores de la proliferación bacteriana usando aptámeros, moléculas de DNA previamente seleccionadas por su afinidad a IF2, proteína clave en el proceso de iniciación de la traducción.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿De qué manera la unión del aptámero (Apt³¹¹) de DNA dirigido al Factor proteico IF2 altera la función de la fase de iniciación de la síntesis proteica en *Escherichia coli*?

1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La alarmante y rápida propagación mundial de patógenos multidrogo resistentes ha repercutido en un aumento de la morbilidad, mortalidad, la prolongación de hospitalización e incremento de costes sanitarios, respecto de la salud humana, así como en la salud animal y medioambiental, necesitándose esfuerzos conjuntos para su contención (Medina & Pieper, 2016; Quiñones D, 2017). Para abordar esto, la OMS estableció un plan de acción global que incluía: fortalecer la investigación y aumentar la inversión de nuevos fármacos mediante el desarrollo sostenible, dentro de sus cinco objetivos estratégicos (World Health Organization, 2015) a los que se ha adherido también el Perú poniendo en marcha el “Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017-2021” (DIGEMID. Ministerio de Salud, 2017).

En este contexto, el presente trabajo pretende contribuir a la lucha contra la crisis global de resistencia a antibióticos mediante la evaluación de novedosas moléculas sintéticas que sean potenciales fármacos inhibitorios de factores vitales y aún no explotados.

Casi todas las clases de antibióticos desarrollados hasta la fecha provienen de fuentes naturales (McPhillie *et al.*, 2015). Para asegurar la producción de fármacos de uso clínico, las empresas farmacéuticas y biotecnológicas han acudido a la

modificación química de antibióticos ya existentes para mejorar su función. Sin embargo, se ha observado que en vez de proveer mejoras sustanciales, han contribuido significativamente a la aparición de resistencias a la clase química de aquellos compuestos (Giuliodori *et al.*, 2018). Además, la obtención de fármacos de proveniencia natural ha presentado dificultades desde su purificación hasta la producción a gran escala por ser un lento, largo y costoso proceso. En consecuencia, desde el desarrollo de metodologías pertenecientes a la Biología y Química Combinatorial, muchas empresas han optado por la vía sintética, pues su obtención es mucho más sencilla y económica (McPhillie *et al.*, 2015; Silver, 2011).

La síntesis de proteínas parece ser el objetivo más viable para la identificación y/o diseño de nuevos fármacos debido a su carácter esencial para la vida en todos los reinos. Más del 60% de los antibióticos naturales de importancia clínica se dirigen al ribosoma, durante la maquinaria traduccional (Giuliodori *et al.*, 2018). La mayoría de estos compuestos tienen como diana la fase de Elongación (Wilson, 2014). Se conocen muy pocos inhibidores de la Iniciación de la traducción a pesar de su potencial como target específico de antibióticos, ya que es la fase que más difiere entre Procariotas y Eucariotas (Brandi *et al.*, 2008). Dicha propiedad provee sólidas bases para desarrollar fármacos inocuos para los pacientes. Además, aún no se conoce ningún mecanismo de resistencia para antibióticos específicos del paso de iniciación de la traducción (Giuliodori *et al.*, 2018). Inclusive, se sabe que la regulación de la traducción ocurre principalmente en la fase de iniciación, pues esta limita la velocidad del proceso cíclico (C. Gualerzi & Pon, 1990; Laursen *et al.*, 2005).

Asimismo, a la fecha no se conocen inhibidores de las moléculas necesarias para iniciar la traducción, los Factores de Iniciación IF1, IF2 e IF3. Estos se unen a la subunidad 30S del ribosoma asegurando la fidelidad del proceso (Arenz & Wilson, 2016). De particular interés, IF2 es una GTPasa que recluta el tRNAi y promueve el emparejamiento de bases codón-anticodón, asegurando la formación del Complejo de Iniciación (IC) (Milon *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta proteína fundamental podría ser un blanco promisorio para el desarrollo de fármacos.

Como potenciales inhibidores de este proceso, se propone el uso de aptámeros. Estas son moléculas de DNA o RNA de una sola cadena que obtienen una conformación tridimensional y se unen por alta afinidad a moléculas target específicas, de manera similar a la unión de anticuerpos con proteínas (Bayat *et al.*, 2018; Nimjee *et al.*, 2017). Los aptámeros ofrecen numerosas ventajas para su uso terapéutico o de diagnóstico como su corto tamaño, fácil penetración, alta estabilidad térmica, baja inmunogenicidad, obtención simple y reducido costo de producción; además, pueden modificarse químicamente para optimizar su perfil farmacocinético (Adachi & Nakamura, 2019; Bayat *et al.*, 2018). Así pues, se ha estudiado en el tratamiento de desórdenes visuales, afecciones vasculares, trombosis, cáncer e infecciones bacterianas; habiendo a la fecha un aptámero (Macugen) aprobado para su uso clínico frente a la degeneración macular del ojo, y otros más que se encuentran en etapas de evaluación preclínicas y clínicas (Nimjee *et al.*, 2017; Zeninskaya *et al.*, 2016).

La estrategia de este proyecto radica en el uso del aptámero (Apt³¹¹) previamente seleccionado contra el factor esencial IF2, en aras de obtener un potencial antibiótico que aporte a la crisis de resistencia a antibióticos que actualmente enfrentamos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las posibles perturbaciones que causa el aptámero de DNA (Apt³¹¹) en las funciones del Factor IF2 de *Escherichia coli* en la fase de iniciación de la traducción.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Predecir la estructura tridimensional del aptámero Apt³¹¹ dirigido al Factor IF2 de *Escherichia coli*, proporcionado por el Laboratorio de Biomoléculas, mediante aproximaciones computacionales.

Predecir la interacción tridimensional del complejo IF2-aptámero, mediante aproximaciones computacionales.

Expresar y purificar el Factor de Iniciación 2 (IF2) de *Escherichia coli*

Marcar fluorescentemente la proteína IF2 γ_{G810C} .

Caracterizar de las señales FRET a observar.

Caracterizar el efecto de los complejos IF2-aptámero en la interacción de ligandos de los componentes de los complejos de pre-iniciación e iniciación 30S y 70S, mediante parámetros cinéticos *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aptámeros

Los aptámeros son secuencias cortas de ácidos nucleicos de una sola hebra (35-100 nucleótidos de DNA o RNA) y se generan mediante un proceso *in vitro* llamado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), basado en su capacidad de unión a múltiples targets debido a la conformación tridimensional que adoptan al plegarse (Bayat *et al.*, 2018; Famulok & Mayer, 2011).

La palabra aptamero viene del latín *aptus* que significa adapta y del griego *meros*, que significa parte de una región (Nimjee *et al.*, 2017). Los aptámeros se pueden unir a proteínas, péptidos, nucleótidos, lípidos, antibióticos, toxinas, nanopartículas e inclusive células, con gran afinidad y especificidad (Adachi & Nakamura, 2019; Ashrafuzzaman, 2014; Bayat *et al.*, 2018). Esta capacidad que tienen de actuar como ligandos de muchas moléculas (e incluso receptores de pequeñas moléculas) los ha hecho referirse a sí mismos como los “nuevos anticuerpos” o “anticuerpos químicos” (Bayat *et al.*, 2018; Darmostuk *et al.*, 2015; Famulok & Mayer, 2011), además, numerosos estudios han demostrado bastantes ventajas para el uso clínico y de investigación de aptámeros frente al de los anticuerpos. Respecto del tamaño, los aptámeros son significativamente más pequeños que los anticuerpos (8-25 frente a ~ 155 kDa de los anticuerpos de clase G), lo que en algunos casos facilita la penetración tisular (Hicke & Stephens, 2000).

Asimismo, se sabe que los anticuerpos tienen una vida útil limitada y son sensibles a la temperatura y a la desnaturalización, siendo este un proceso irreversible (Keefe *et al.*, 2010). En cambio, los aptámeros son estructuralmente estables en un amplio rango de temperaturas y condiciones de almacenamiento (Ashrafuzzaman, 2014). Pueden desnaturalizarse a temperaturas extremas, pero el proceso es reversible, de tal manera que en cuestión de minutos pueden regenerar su estructura terciaria única, y tienen una vida útil más larga (Ashrafuzzaman, 2014; Keefe *et al.*, 2010). Además, los aptámeros se pueden sintetizar químicamente y son altamente reproducibles en diferentes lotes, lo que no sucede con los trabajosos sistemas de producción de anticuerpos que son caros y requieren de animales o células; por tanto, es un proceso relativamente más sencillo, fiable y económico (Hicke & Stephens, 2000; Zeninskaya *et al.*, 2016). Adicionalmente, los aptámeros pueden presentar modificaciones químicas para modular su perfil farmacocinético. Esto le da ciertas ventajas, por ejemplo, el DNA y RNA es susceptible a nucleasas endógenas (Adachi & Nakamura, 2019; Nimjee *et al.*, 2017). Una modificación química en la estructura primaria de esos oligonucleótidos podría protegerlos de degradación dentro de la célula. Asimismo, también podrían brindarle mayor estabilidad y establecer nuevas interacciones con las moléculas target. Por ejemplo, los aptámeros son moléculas con carga negativa y, por tanto, sería muy difícil aislar aptámeros que se unan a proteínas cargadas negativamente. El agregar grupos funcionales a la secuencia nucleotídica como si fuesen cadenas laterales de aminoácidos, aumentan la diversidad química de los aptámeros y, por ende, su capacidad de unión a un mayor rango de moléculas (Adachi & Nakamura, 2019; Gold *et al.*, 2010; Rohloff *et al.*, 2014). Por el contrario, si se desea eliminar rápidamente los aptámeros del organismo, se desarrolló un

antídoto basado en el emparejamiento de bases de Watson-Crick impidiendo que inhiba su proteína diana (Rusconi *et al.*, 2004). Todas estas propiedades hacen de los aptámeros herramientas atractivas para su uso como agentes terapéuticos contra distintas enfermedades e incluso para diagnóstico.

Comparación entre aptámeros y anticuerpos.

Característica	Aptámeros	Anticuerpos
Especificidad y afinidad	Alto, pico a nanomolar	Alto, pico a nanomolar
Peso molecular	8-25 kDa	~ 155 kDa
Penetración de la barrera tisular	+++ , debido a menor tamaño	+
Inmunogenicidad	-	+++ , incluso con anticuerpos humanizados
Termoestabilidad	++	-
Potencial de modificación	Fácil, ilimitado	Difícil, limitado
Fabricación	Síntesis química	Sistemas de células de mamíferos
Variación entre lotes	Baja	Alta
Tiempo de producción	Horas	Días a meses
Costo de producción	\$	\$\$\$
Rango de dianas	Moléculas proteicas y no-proteicas	Limitado a proteínas inmunogénicas

Nota: Adaptado de Sun & Zu, 2015

Actualmente, se utilizan aptámeros en la biomedicina y nanotecnología como biosensores, biomarcadores de diagnóstico, plataformas de diagnóstico, fármacos y moléculas transportadoras de fármacos (Adachi & Nakamura, 2019; Ashrafuzzaman, 2014; Joseph *et al.*, 2019; Maasch *et al.*, 2008; Nimjee *et al.*, 2017; Yan & Levy, 2018; Zeninskaya *et al.*, 2016; Zhou & Rossi, 2017). Una de las direcciones más importantes en el desarrollo de los aptámeros es la creación de moléculas

terapéuticas. Inclusive, varios de ellos ya se encuentran en desarrollo clínico en etapas de ensayo de fase II o III; y, a la fecha, sólo un aptámero ya ha sido aprobado por la FDA para su uso comercial como fármaco (Nimjee *et al.*, 2017; Özalp *et al.*, 2013). Se trata de de pregaptanib (Macugen® de Pfizer, USA), una droga para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (Eugene *et al.*, 2006).

Ejemplos de aptámeros en desarrollo clínico o aprobados. (Fuente: <http://www.clinicaltrials.gov>)

Aptámero	Enfermedad o condición	Target	Fase clínica	Referencia
ARC1905	Degeneración macular asociada a edad	Factor C5 del sistema de complemento	I	(Sundaram <i>et al.</i> , 2013)
E10030	Degeneración macular asociada a edad	Factor B de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B)	I, II, III	(Tolentino <i>et al.</i> , 2015)
EYE001	Degeneración macular causada por enfermedad de Hippel-Lindau	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	II,III	(Martin <i>et al.</i> , 2002)
REG1	Síndrome coronario agudo, Enfermedad de la arteria coronaria	Factor de coagulación IXa	I, II	(Rusconi <i>et al.</i> , 2002)
AS1411	Leucemia mieloide aguda	nucleolina	II	(Stuart <i>et al.</i> , 2009; Yazdian-Robati <i>et al.</i> , 2020)

NOX-E36	Enfermedades inflamatorias crónicas, Diabetes Mellitus tipo 2	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)	I, II	(Maasch <i>et al.</i> , 2008)
NOX-A12	Leucemia linfocítica crónica	Factor 1 derivado del estroma (SDF-1)	I, II	(Hoellenriegel <i>et al.</i> , 2014)
ARC1779	Enfermedad de von Willebrand, Púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)	Dominio A1 del factor von Willebrand (vWF)	II	(Jilma-Stohlawetz <i>et al.</i> , 2011)
BAX499	Hemofilia	Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)	I	(Parunov <i>et al.</i> , 2014)
NU172	Enfermedad del corazón	Trombina	II	(Troisi <i>et al.</i> , 2018)
BT200	Enfermedad de von Willebrand, Hemofilia A	Dominio A1 del factor von Willebrand (vWF)	II	(Kovacevic <i>et al.</i> , 2020)

Debido a la propagación de bacterias patógenas resistentes a fármacos medicinales y las dificultades a las que se enfrentan los desarrolladores de nuevos antibióticos basados en bibliotecas de naturaleza orgánica, se debe realizar una búsqueda constante de fármacos alternativos a partir de los cuales se puedan crear fármacos antibacterianos eficaces (Zeninskaya *et al.*, 2016). Los principales objetivos en los cuales se desarrollan aptámeros antibacterianos incluyen: 1) interrupción del metabolismo del patógeno; 2) estimulación de la respuesta inmune

de la células del huésped hacia un tipo específico de bacteria; 3) bloqueo de la actividad invasiva de los microorganismos en relación a las células huésped; 4) inhibición de la acción de toxinas y otros factores de virulencia (Özalp *et al.*, 2013). Al día de hoy, se han reportado más de 60 aptámeros antimicrobianos para diversos propósitos (Hamula *et al.*, 2011; Özalp *et al.*, 2013). Según la literatura revisada, aún no se registran aptámeros dirigidos a los factores de iniciación de la traducción bacteriana.

De esta manera, en el presente proyecto de tesis se plantea utilizar aptámeros de DNA específicos para el factor IF2. Estos aptámeros podrían modificar las funciones de IF2 que son esenciales para la fase de iniciación de la síntesis proteica y sería el primer paso de estudio para la obtención de un potencial antibiótico.

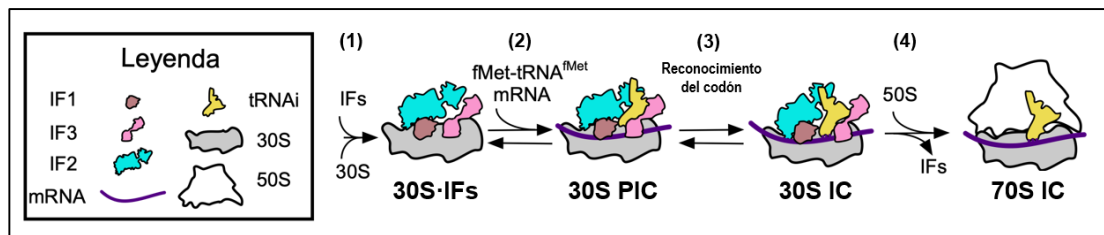
2.2 Iniciación de la traducción

La expresión de los genes es un proceso vital que conlleva a la síntesis de proteínas. Comienza con la transcripción del DNA de un gen en una sola cadena complementaria de ARN mensajero (mRNA) y prosigue con la traducción de dicha secuencia codificante mediante la incorporación de aminoácidos; finalizando con la proteína respectiva plegada e inclusive, algunas veces, modificada (Londei, 2015).

Tanto en organismos procariontes como eucariotes, la traducción comprende 4 fases: iniciación, elongación, terminación y reciclaje. Sin embargo, en procariontes es

un proceso menos complejo y con un número más reducido de moléculas implicadas (Kozak, 1999; Rodnina, 2018).

El contexto de este proyecto se sitúa en la fase de iniciación de la traducción bacteriana. En la que se orquestan una serie de pasos en donde están involucrados las subunidades 30S y 50S del ribosoma, los 3 factores de iniciación (IFs), el ARN mensajero (mRNA) y el ARN de transferencia de iniciación cargando formil metionina (fMet-tRNA^{fMet} o tRNAⁱ), en un proceso dependiente de GTP y, mediante el cual, todos protagonizan la formación de fases o complejos intermedios.



Esquema de las fases más importantes de la iniciación de la traducción bacteriana.
Formación del complejo 30S-IFs: (1) Asociación de los IFs en la subunidad 30S. *Formación del 30S PIC:* (2) Asociación del mRNA (despliegue y escaneo del mRNA, interacción estable de la interacción SD-aSD, re-arreglos de la subunidad 30S) y reclutamiento del fMet-tRNA^{fMet} (tRNAⁱ). *Formación del 30S IC:* (3) Reconocimiento del codón de inicio por el tRNAⁱ. *Formación del 70S IC:* (4) Asociación de la subunidad 50S y disociación de los IFs.

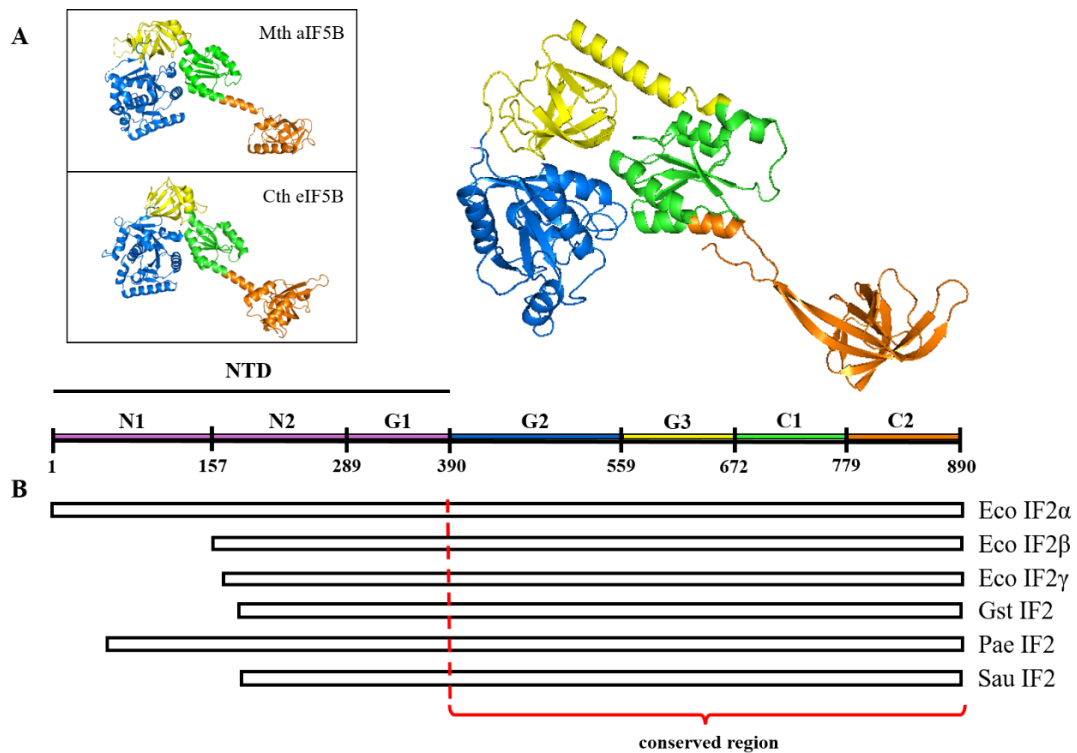
Cuando llega la subunidad 30S, a ella se unen el mRNA y los IFs junto con el tRNAⁱ (en el sitio P del 30S) formando el complejo de PRE-iniciación 30S (30S PIC). Una vez que se emparejan las bases del codón y anticodón de iniciación, se forma el complejo de iniciación 30S (30S IC). Luego llega la subunidad 50S formando el complejo de PRE-iniciación 70S (70S PIC) y es recién cuando IF2 que tiene actividad GTPasa, hidroliza el GTP, los IFs se disocian y se forma el complejo

de iniciación 70S (70S IC), el cual madurará en el complejo competente de elongación 70S (70S EC) al liberarse IF2 (Milón & Rodnina, 2012).

2.3 Factor de Iniciación 2 (IF2)

IF2 es la molécula más grande de los Factores de Iniciación. Está codificado por el gen *infB* que se encuentra en el operón policistrónico *nusA*. Existen 3 isoformas del factor llamadas IF2 α de 97.3 kDa, IF2 β de 79.7 kDa e IF2 γ de 78.8 kDa (según otra nomenclatura también se les llama IF2-1, IF2-2 e IF2-3) (Laursen *et al.*, 2005). Estas isoformas son sintetizadas por tres codones de inicio independientes (AUG-1, GUG-158 y AUG-165) dentro del mismo marco de lectura (traducción en tándem) (Nyengaard *et al.*, 1991), y se requiere de la presencia de todas para el crecimiento óptimo de *E. coli*, pues se ha demostrado que en estas condiciones las isoformas más pequeñas están cerca del nivel de IF2 α (Sacerdot *et al.*, 1992).

IF2 consiste de tres segmentos característicos: una región N-terminal notablemente variable entre especies, y los segmentos central y C-terminal bastante conservados, mostrando un alto grado de homología no solo entre bacterias, sino también en sus homólogos aIF5B y eIF5B, pertenecientes a arqueobacterias y eucariotas respectivamente (Laursen *et al.*, 2005; Roll-Mecak *et al.*, 2000). Se han designado varias denominaciones a los dominios que lo conforman según preferencias por los distintos grupos de estudio (Gualerzi *et al.*, 1991; Mortensen *et al.*, 1998; Roll-Mecak *et al.*, 2000). En este estudio se utilizará la nomenclatura sugerida por Gualerzi. *et al.*



Estructura primaria y diagrama de cintas de IF2. (A) Representación esquemática de la estructura primaria de IF2 de *E. coli*, indicando los dominios en diferentes colores y sus tamaños respectivos. Se muestra el diagrama de cintas de la estructura de IF2 de *E. coli* (código PDB 6O7K) manteniendo los mismos colores de la estructura primaria. A la izquierda se presentan sus homólogos Arquea y Eucariota: aIF5B (PDB: 1G7T) y eIF5B (PDB: 4N3N). (B) Comparación del tamaño de la estructura primaria de IF2 de *E. coli* (isoformas α , β , γ) y de otras bacterias seleccionadas. Se observa variación en la región NTD y una región CTD altamente conservada. Abreviaciones: Eco, *Escherichia coli*; Gst, *Geobacillus stearothermophilus*; Pae, *Pseudomonas aeruginosa*; Sau, *Staphylococcus aureus*; Mth, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; Cth, *Chaetomium thermophilum*.

Nomenclatura de los dominios que conforman IF2.

Nomenclatura	año	Designación de los dominios						
		-	dI	dII	dIII	dIV		
Roll-Mecak	2000							
Gualerzi	1991	N1	N2	G1	G2	G3	C1	C2
Mortensen	1998	I	II	III	IV	V	VI-1	VI-2
Unión a			30S		GTP	30S		tRNA
Aminoácidos		1	158	290	390	559	672	779
		-	-	-	-	-	-	-
		157	289	389	558	671	778	890

III. ANTECEDENTES

3.1 Factor de Iniciación 2 en la iniciación de la traducción

IF2 tiene varias funciones en el marco de la traducción bacteriana: recluta el tRNA_i, promueve el emparejamiento de bases codón-anticodón entre el mRNA y el tRNA_i, facilita la unión de la subunidad 50S al 30S IC (dependiente de tRNA_i), tiene actividad GTPasa y permite la maduración del 70S IC en 70S EC (Gualerzi *et al.*, 2010; Milon *et al.*, 2010; Milón & Rodnina, 2012). Se han realizado múltiples estudios acerca de la estructura, dinámica y función específicas de los dominios que conforman IF2. Sin embargo, esta materia de estudio todavía no está completamente resuelta.

Se sabe que el dominio N no interactúa mucho con otras regiones de IF2, siendo una estructura independiente y bastante flexible en la zona que se conecta con el siguiente segmento C-terminal (Laursen *et al.*, 2004). Sin embargo, se demostró que IF2 se ancla fuertemente a la subunidad 30S del ribosoma a través del dominio N2, permitiendo su unión incluso en ausencia de IF1, GTP y tRNA_i (Caserta *et al.*, 2006). Al ser una región de secuencia y tamaño tan variable, se sugiere que probablemente esta zona tenga alguna función reguladora específica de la especie, pero no relacionada a la traducción, pues se ha probado que deleciones del dominio N no interfieren con las funciones centrales de IF2 en la traducción, lo que sí ocurre con deleciones internas (Caserta *et al.*, 2006; Gualerzi & Pon, 1990).

La región central G es la más conservada. G2 contiene todos los elementos estructurales responsables de la unión de los nucleótidos de guanina y la hidrólisis de GTP (Gualerzi & Pon, 2015). G3 se une a la subunidad 30S del ribosoma, aunque con baja afinidad (Caserta *et al.*, 2006; Julián *et al.*, 2011). No se ha esclarecido aún alguna función concreta para el dominio G3, pero se ha demostrado que existe una comunicación armónica con el dominio G2 y serían responsables de interacciones funcionales alostéricas permitiendo rearrreglos actuando como una bisagra durante la transición 30S IC a 70S IC y, por tanto, también de la unión de IF2 con la subunidad 50S del ribosoma (Caserta *et al.*, 2010; C. Gualerzi & Pon, 2015; Milon *et al.*, 2006).

La región C-terminal está constituida por 2 dominios. Hasta la fecha no se le ha atribuido alguna función específica a C1, pero recientemente se ha hallado que la unión específica de GTP al dominio G2 está comunicada alostéricamente al dominio C1, resultando en un reposicionamiento del dominio C2 más cercano al sitio P de la subunidad menor del ribosoma, sugiriendo que este dominio puede ser objetivo del desarrollo de nuevos antibióticos (Caban *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que C2 contiene el completo sitio activo de IF2 responsable del reconocimiento y unión del tRNA_i (Spurio *et al.*, 2000).

3.2 Aptámeros para el Factor de Iniciación 2

Según la literatura revisada, actualmente aún no se tienen aptámeros dirigidos a IF2. Sin embargo, estudios recientes incluyeron en su metodología la selección de aptámeros para IF2, tanto para la molécula completa IF2 α , como para el dominio C2 de IF2 (resultados no publicados del Laboratorio de Biomoléculas). Brevemente, Se usó la tecnología SELEX (Stoltenburg *et al.*, 2007) para seleccionar las secuencias de nucleótidos a partir de una biblioteca aleatoria de aproximadamente 10^{16} secuencias de DNA de cadena simple. Esta metodología está constituida por un proceso seriado de lavados que se realizó hacia beads magnéticos que contenían a la proteína target IF2 α o a su dominio C2 previamente incubados con la biblioteca de secuencias de DNA, hasta quedarse con las secuencias más fuertemente unidas a IF2. Luego, estas se eluyeron, amplificaron y secuenciaron. Posteriormente, se realizaron ensayos de Pull-down con estas secuencias candidatos a aptámeros. Se marcaron fluorescentemente y se incubaron con la proteína target IF2 inmovilizada en beads magnéticos, permitiendo saber qué tan cualitativamente afines eran las secuencias seleccionadas a IF2 a través de la lectura de fluorescencia. Se finalizó con una selección cuantitativa usando Termoforesis a Microescala (MST), la cual permitió obtener la constante de disociación de los aptámeros con respecto a IF2.

3.3 Métodos basados en FRET usando el Stopped-Flow

Estudios recientes han usado el sistema FRET mediante el aparato Stopped-Flow para evaluar las cinéticas de moléculas en la formación de complejos en tiempo real, así como también de posibles modificaciones intramoleculares durante la interacción de estas.

El laboratorio de Biomoléculas desarrolló un sistema FRET intramolecular entre los dominios C y N-terminal (llevando la molécula quencher y fluoróforo, respectivamente) de la molécula flexible IF3 (IF3_{DL}) para monitorear en tiempo real las perturbaciones que los antibióticos aminoglucósidos estreptomicina y kanamicina generan en los sitios de unión de IF3 a la plataforma de la subunidad 30S del ribosoma (Chulluncuy *et al.*, 2016). Al probar los límites de detección de la señal de IF3_{DL} comprobaron que IF3 se posiciona en la plataforma del 30S, obteniendo una conformación extendida de sus dominios que desencadenó un aumento de fluorescencia con un comportamiento bifásico: el primero bastante rápido ($k_{app1} = 16 \pm 1 \text{ s}^{-1}$), asociado al encuentro inicial de ambas moléculas (IF3_{DL}·30S); seguido de un cambio conformacional del factor ($k_{app1} = 2 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$). También obtuvieron que, al agregar IF1 al complejo IF3_{DL}·30S, la fluorescencia disminuía, siendo así que los dominios de IF3 se cerraban en un periodo 75 veces más lento ($k_{app} = 0.26 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$) que lo que ocurría en la reacción anterior, significando la reacomodación de uno de los dominios de IF3 en la plataforma del 30S. Todos estos resultados de caracterización de la señal IF3_{DL} estuvieron acorde con estudios previos de cinética rápida respecto de la formación de complejos y pre-complejos de la iniciación de la traducción (Elvekrog & Gonzalez, 2013; Milon *et al.*, 2007, 2010; Milón *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados de agregar estreptomicina y kanamicina al complejo IF1·IF3_{DL}·30S demostraron que la presencia de estos aminoglucósidos revertía el efecto conformacional de IF3 producido por IF1 al llegar al complejo, obteniendo una estructura abierta de los dominios de IF3 (Chulluncuy *et al.*, 2016).

Posteriormente, se usó la misma molécula señal IF3_{DL} para evaluar cómo las tetraciclinas podrían inhibir el proceso de iniciación de la traducción bacteriana,

descubriendo una vía alterna al conocido mecanismo inhibitorio de estas en la fase de elongación en el que las tetraciclinas impiden la unión de los tRNA de elongación al ribosoma (Barrenechea *et al.*, 2021). Indicaron que las tetraciclinas perturban el correcto comportamiento de IF3 en el ribosoma 30S de forma alostérica, retrasan la unión de la subunidad 50S al 30S IC e incluso retienen a IF1 durante la formación del 70S IC, ralentizando la continuación a la fase de elongación.

Este tipo de métodos también permitió ilustrar el ciclo completo de IF3 en la iniciación de la traducción, estudiando su comportamiento conformacional durante la adición de cada ligando involucrado en la formación de un nuevo complejo o pre-complejo de iniciación e, incluso, comprobando la formación de péptidos producto de la fase de elongación (Nakamoto *et al.*, 2021). Demostraron que IF1 e IF2 promueven una conformación compacta de IF3 y que su dominio C-terminal (IF3C) se mueve hacia el sitio P del 30S, mientras que crea un bolsillo en el dominio N-terminal (IF3N) para aceptar al tRNA_i. Una vez unido, IF3N se reacomoda hacia la plataforma y, cuando ocurre la decodificación del codón del mRNA, IF3C se desplaza lejos del sitio P. Finalmente, observaron que los dominios de IF3 se acercan antes de disociarse del 70S IC.

Asimismo, estas técnicas también han permitido medir la cinética de las interacciones aptámero-proteína en un Stopped-Flow, planteando el uso de aptámeros de DNA como sensores para la detección de *Plasmodium falciparum* mediante su unión al biomarcador HMGB1 (Joseph *et al.*, 2019). Al marcar la proteína HMGB1 y su análoga humana con un quencher, y los aptámeros con una pequeña sonda (fluoresceína) complementaria a su secuencia; obtuvieron la rapidez

con la que se unieron los aptámeros a su molécula blanco y comprobaron su especificidad al no unirse a la proteína homóloga humana.

Otro estudio evaluó el efecto del bloqueo específico de IF3N en la iniciación de la traducción usando aptámeros afines a este dominio mediante la observación de la señal producida por IF3_{DL} (Sánchez, 2022). Señalaron que el aptámero provoca la reacomodación de los dos dominios de IF3, indicando que IF3C detecta cambios estructurales en IF3N. Además, el complejo aptámero-IF3N perturbó los movimientos de IF3 dependientes de IF2, mRNA y tRNA_i, retrasando el inicio de la traducción. Por otra parte, el uso de aptámeros dirigidos a moléculas marcadas que permiten su observación en tiempo real mediante sistemas FRET, aportan una novedosa herramienta para estudiar la función específica de dominios de proteínas que conforman complejos multiligando en diversos procesos biológicos (Sánchez, 2022).

IV. HIPÓTESIS

La unión del aptámero de DNA (Apt³¹¹) dirigido al Factor de Iniciación 2 (IF2) de *Escherichia coli* perturba su función en la fase de iniciación de la síntesis proteica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biofísica Aplicada, del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC); y se redactó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (URP).

5.2 Tipo y diseño de investigación

Tipo y diseño de investigación experimental *in vitro* e *in silico*.

5.3 Variables

Variable independiente: Aptámero de DNA dirigido al factor IF2.

Variable dependiente: Parámetros cinéticos de las reacciones dependientes de IF2 durante la iniciación de la síntesis de proteínas en presencia del aptámero (Apt³¹¹) de DNA.

5.4 Operacionalización de las variables

Variables	Definición de la variable	Indicadores	Escala de Medición	Instrumento
Aptámero de DNA dirigido al factor IF2	Oligonucleótido caracterizados por su afinidad a IF2.	Docking score	Cuantitativa continua de razón numérica en escala de valor	Docking molecular a través de software MOE
Parámetros cinéticos de las reacciones dependientes de IF2 durante la iniciación de la síntesis de proteínas en presencia del aptámero (Apt ³¹¹) de DNA	Ensamblaje y progresión del complejo ribosomal de iniciación de la traducción del mRNA	Variación de fluorescencia del fluoróforo donador resultante del acercamiento o alejamiento de los fluoróforos en el tiempo.	Cuantitativa continua de intervalo (0.01 – 200 s)	Espectrometría de fluorescencia para medir Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) combinada con mediciones de flujo detenido usando el <i>Stopped-Flow</i>

5.5 Procedimiento

5.5.1 Predicción de la estructura 3D del Apt³¹¹ y del complejo IF2·Apt³¹¹

5.5.1.1 Predicción de la estructura 3D del Apt³¹¹

Los aptámeros dirigidos a IF2 fueron previamente seleccionados (ver *Antecedentes*) y donados por el Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud de la UPC. Entre los aptámeros seleccionados para IF2 (Apt³¹¹, Apt³¹², Apt³¹³, Apt³¹⁴, para IF2 α ; y Apt⁷¹¹, Apt⁷¹⁴, Apt⁷¹⁵, Apt⁷²¹, para el dominio C2 de IF2) se escogió el aptámero 311 (Apt³¹¹) para este proyecto de investigación por haber obtenido los mejores resultados de afinidad cualitativa y cuantitativamente.

El modelado del Apt³¹¹ se desarrolló siguiendo lo descrito por Jeddi & Saiz (2017). Se cambiaron las modificaciones químicas por timidinas y se introdujo la secuencia en el servidor RNAfold para predecir las estructuras secundarias del Apt³¹¹ como secuencia de RNA. La estructura 2D en formato Vienna obtenida se introdujo en el servidor RNA Composer para el modelado 3D de la misma, escogiendo las siguientes condiciones del buffer: NaCl 140 mM, Mg 1 mM, a 25 °C. Al obtenerse la estructura 3D en formato PDB, se abrió el archivo en el software Molecular Operation Environment (MOE; Chemical Computing Group Inc.) y se revirtió la estructura de RNA a DNA. Se cambiaron los uracilos por timinas y se modificaron los nucleótidos que correspondían manualmente. Luego, se protonó a 0.1 mol/L sal, 310 K y pH 7.4; y, finalmente, se minimizó para aliviar tensiones posibles producidas por todas las modificaciones hechas.

5.5.1.2 Predicción de la interacción 3D entre el Apt³¹¹ e IF2

Usando el software MOE, se abrió el mismo archivo PDB obtenido del modelado del ligando Apt³¹¹, y sobre el mismo se abrió el archivo PDB del receptor IF2 (sólo disponible en su isoforma γ) previamente obtenido del servidor Protein Data Bank (código 6O7K) y separado del complejo de iniciación usando PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC). Se protonaron ambas moléculas a las mismas condiciones: 0.1 mol/L sal, 310 K y pH 7.4; y se procedió a hacer el Docking Molecular para la obtención de las posibles interacciones 3D entre el Apt³¹¹ e IF2.

5.5.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes IF2 α

5.5.2.1 Expresión analítica

En una placa de agar LB (50 μ g/ml Kanamicina) se sembró una cepa de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET24a que contiene el gen *InfB* (proteína IF2 α) con una cola de histidinas en el extremo N terminal, obtenidas de un cultivo stock de glicerol criopreservado. A partir de una colonia obtenida, se destinó una mitad a resembrarla en otra placa LB y la otra mitad se incubó en medio líquido LB (50 μ g/ml Kanamicina) en agitación constante de 150 RPM por 16 horas a 37 °C. Luego, se midió la densidad óptica (OD) de este cultivo por absorbancia a 600 nm y se calculó el volumen necesario para resembrar este cultivo en otro caldo LB fresco y hacer una segunda incubación bajo las mismas condiciones con un OD_{600nm} inicial de 0.05. Se hizo un seguimiento hasta obtener un OD_{600nm} de 0.8, indicando que el cultivo se encuentre en la fase exponencial o

logarítmica de crecimiento celular. El plásmido utilizado contiene el sistema promotor T7 y el operón lac, por tanto, una vez llegado al OD_{600nm} de 0.8, se indujo la expresión de la proteína deseada utilizando isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM. Se midió el OD_{600nm} cada hora después de la inducción por 4 horas y se tomaron muestras de 200 µl para su posterior corrida en gel de poliacrilamida.

Para verificar la expresión se corrió un gel por SDS-PAGE con las muestras recolectadas a cada hora después de la inducción. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 RPM, luego, se retiró el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar el pellet de células y, finalmente, se resuspendió el pellet de células en Sample Buffer 1X (SDS 10%, Glicerol 30%, Tris-HCl 250 mM pH 6.8, Azul de Bromofenol 0.02%, β-Mercaptoetanol 5%) en un volumen calculado mediante la siguiente fórmula:

$$V_{SB(1X)} = \frac{OD_{600nm} * volumen\ retirado}{2}$$

Donde el OD_{600nm} es diferente en cada tiempo y el volumen retirado es aproximadamente 200 µl de sobrenadante.

Las muestras se calentaron a 95 °C por 7 minutos y fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 7.5% para correr a 100 V por 15 minutos y, luego, a 200 V por 40 minutos.

Finalmente, el gel fue teñido en Staining Solution (Azul de Coomassie R350 0.01% (p/v), Etanol 20%, Ácido acético glacial 10%) por 20 minutos en agitación constante y posteriormente desteñido en Distaining Solution (Etanol 20%, Ácido

acético glacial 10%) en agitación constante, hasta obtener los resultados del gel con una resolución nítida y clara. Según estos resultados, se decidió hacer una expresión a mayor escala comenzando la recolección de células a la segunda hora post inducción con IPTG.

5.5.2.2 Expresión preparativa

De la placa de agar LB (50 µg/ml Kanamicina) resembrada con la colonia de *E. coli* BL21 transformada que se usó para la expresión analítica, se escogió una colonia para incubarla en medio líquido LB (50 µg/ml Kanamicina) en agitación constante de 150 RPM por 16 horas a 37 °C. Luego, se midió la densidad óptica (OD) de este cultivo por absorbancia a 600 nm y se calculó el volumen necesario para resembrar este cultivo en 1.8 L de caldo LB y hacer una segunda incubación bajo las mismas condiciones con un OD_{600nm} inicial de 0.05. Se hizo un seguimiento hasta obtener un OD_{600nm} de 0.8. Una vez alcanzado esto, se guardó una muestra de 200 µl del cultivo y se indujo la expresión con IPTG 1mM. Se midió el OD_{600nm} cada hora después de la inducción por 2 horas y se tomaron muestras de 200 µl para verificar la expresión mediante SDS-PAGE según se explicó en el inciso anterior.

A partir de la segunda hora de inducción, se procedió a realizar la recolección de células centrifugando el cultivo inducido a 5000 RPM por 5 minutos y trabajando siempre en frío (4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en Buffer HAKM₇ (HEPES 50 mM, NaCl 500 mM, MgCl₂ 7 mM, β-mercaptoetanol

6 mM, pH 7.4). Luego, se centrifugó una vez más a 5000 RPM por 10 minutos (4 °C) y se descartó el sobrenadante. Se pesó el pellet de células y se le agregó 3 ml de Buffer Pre-Lisis (HAKM₇ + Cóctel Inhibidor de Proteasas cComplete™, Roche) por cada gramo de pellet. Finalmente, se adicionó lisozima (100 µg/ml) y se guardó a -80°C.

5.5.2.3 Purificación de proteína IF2 α

Se descongeló la solución de células colocándola en hielo para proceder con el lisado de las células mediante el método freeze-thaw, que involucró dos ciclos de congelar (-80 °C) y descongelar (4 °C). En la última descongelación se le adicionó DNasa I (40 µg/ml) a la solución. A continuación, se centrifugó el lisado a 9000 RPM por 45 minutos a 4 °C. Acto seguido, se retiró el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0,45 µm. Los siguientes pasos se trabajaron en su totalidad a 4 °C.

El filtrado se inyectó lentamente en una columna de cromatografía por afinidad HisTrap™ FF Crude (Cytiva) de 5 ml de volumen de columna (CV) que contiene Níquel inmovilizado, pre-equilibrada con His-binding Buffer (HEPES 20 mM, NaCl 700 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.4). Luego, la columna se lavó con 5 CVs de Wash Buffer 1 (HEPES 20mM, NaCl 100 mM, Imidazol 10 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.4) y, luego se lavó con 5 CVs de Wash Buffer 2 (HEPES 20mM, NaCl 100 mM, Imidazol 50 mM, β -Mercaptoetanol 6mM, pH 7.4). Finalmente, se eluyó la proteína con Elution Buffer (HEPES 20 mM, NaCl

100 mM, Imidazol 300 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.4) en 20 fracciones de 1 ml y se guardaron las fracciones eluidas en hielo. Se escogieron las fracciones eluidas con mayor cantidad y pureza de proteína IF2 α a través del resultado de un gel donde se corrieron las muestras obtenidas de la cromatografía por SDS-PAGE (manteniendo las mismas condiciones anteriormente mencionadas), se concentraron usando filtros para centrifuga Amicon® Ultra 50K Da (Merck) y se dializaron en Buffer A (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) por 16 horas en un D-Tube™ Dialyzer Maxi 12-14 kDa (EMD Millipore).

La diálisis se pasó por una columna de intercambio iónico Capto™ Q (Cytiva) y se eluyó mediante una gradiente de buffer de alta sal, denominado Buffer B (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) en el sistema HPLC (Jasco). Se escogieron las fracciones que contenían a la proteína IF2 α separándolas en dos lotes, luego se dializaron en Storage Buffer (HEPES 50 mM, NH₄Cl 200 mM, Glicerol 10%, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) por 16 horas. Finalmente, la proteína dializada se cuantificó por Bradford y analizando el gel de poliacrilamida 10% por SDS-PAGE utilizando el software ImageJ (NIH), ambas cuantificaciones emplearon una curva patrón de BSA (**Figura 1**).

5.5.3 Expresión y purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}

5.5.3.1 Expresión analítica de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}

Se obtuvieron los plásmidos pProEX-HTb conteniendo copias clonadas de IF2 γ -wild type (IF2 γ_{wt}) e IF2 γ con una mutación en el dominio C2, posición G810C (IF2 γ_{G810C}), donados gentilmente por el Laboratorio del Dr. Gonzalez (Columbia University) (Caban *et al.*, 2017). Se transformaron los plásmidos en células *E. coli* BL21 usando el Kit de Transformación Mix & Go! (ZYMO Research). Las colonias resultantes se resembraron en placa de agar LB (Ampicilina 100 μ g/ml + Cloranfenicol 20 μ g/ml) y se comprobó la presencia del plásmido por PCR de colonia usando primers de la secuencia promotor y terminador del plásmido pProEX-HTb, así como también primers forward y reverse con la mutación sitio-dirigida G810C (**Tabla 2** y **3**) para asegurar la presencia del plásmido y el contenido de este.

Las colonias obtenidas se cultivaron en medio líquido LB (Ampicilina 100 μ g/ml + Cloranfenicol 20 μ g/ml) en agitación constante de 150 RPM por 16 horas a 37 °C. Luego, se midió la absorbancia a 600 nm del cultivo y se calculó el volumen necesario para resembrar este cultivo en otro caldo LB fresco y hacer una segunda incubación bajo las mismas condiciones con un OD_{600nm} inicial de 0.05. Se hizo un seguimiento hasta obtener un OD_{600nm} de 0.8 y se indujo la expresión de la proteína deseada utilizando IPTG 1mM. Se midió el OD_{600nm} cada hora después de la inducción por 4 horas y se tomaron muestras de 200 μ l para su posterior corrida en gel de poliacrilamida.

Para verificar la expresión se corrió un gel por SDS-PAGE con las muestras recolectadas a cada hora después de la inducción (**Figura 2**), según el protocolo mencionado en la sección de *Procedimientos 5.5.2.1*.

Según estos resultados, se decidió hacer una expresión a mayor escala comenzando la recolección de células a la segunda hora post inducción.

5.5.3.2 Expresión preparativa de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}

De la placa de agar LB resembrada con la colonia de *E. coli* BL21 transformada que se usó para la expresión analítica, se escogió una colonia para incubarla en medio líquido LB (Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ + Cloranfenicol 20 $\mu\text{g/ml}$) en agitación constante de 150 RPM por 16 horas a 37 °C. Luego, se midió la absorbancia a 600 nm y se calculó el volumen necesario para resembrar este cultivo en 2 L de caldo LB y hacer una segunda incubación bajo las mismas condiciones con un OD_{600nm} inicial de 0.05. Se hizo un seguimiento hasta obtener un OD_{600nm} de 0.8. Una vez alcanzado esto, se guardó una muestra de 200 μl del cultivo en hielo y se indujo la expresión con IPTG 1mM. Se midió el OD_{600nm} cada hora después de la inducción por 2 horas y se tomaron muestras de 200 μl para verificar la expresión mediante SDS-PAGE (**Figura 3**) según el protocolo mencionado en la sección de *Procedimientos 5.5.2.1*.

A partir de la segunda hora de inducción, se procedió a realizar la recolección de células centrifugando el cultivo inducido a 5000 RPM por 5 minutos y trabajando siempre en frío (4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en TF Buffer A (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3). Luego, se centrifugó una vez más a 5000 RPM por 10 minutos (4 °C) y se descartó el sobrenadante. Se pesó el pellet de células y

se le agregó 3 ml de TF Buffer A por cada gramo de pellet. A continuación, se adicionó lisozima (100 $\mu\text{g/ml}$) y PMSF (170 $\mu\text{g/ml}$); finalmente, se guardó a -80°C .

5.5.3.3 Purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}

Se descongeló la solución de células colocándola en hielo para proceder con el lisado de las células mediante el método freeze-thaw, que involucró tres ciclos de congelar (-80°C) y descongelar (4°C). En la última descongelación se le adicionó DNasa I (40 $\mu\text{g/ml}$) a la solución. A continuación, se centrifugó el lisado a 9500 RPM por 45 minutos a 4°C . Acto seguido, se retiró el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0,45 μm . Los siguientes pasos se trabajaron en su totalidad a 4°C .

El filtrado se introdujo lentamente en una columna de cromatografía por afinidad HisTrap™ FF Crude (Cytiva) de 5 ml de volumen de columna (CV) que contiene Níquel inmovilizado, pre-equilibrada con TF Buffer A. Luego, la columna se lavó con 2 CVs de TF Buffer A. Después, se lavó la columna con 5 CVs de TF Buffer B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 30 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3). A continuación, se lavó la columna con 5 CVs de TF Buffer C-2 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3). Finalmente, se eluyó la proteína con TF Buffer C-3 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 250 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3) en 20 fracciones de 1 ml y se guardaron en hielo. Se extrajeron muestras

de 20 μ l de cada fracción eluida y se les agregó 20 μ l de Sample Buffer 2X (SB 2X) para correrlas en un gel de poliacrilamida 10 o 7.5% por SDS PAGE (**Figura 4 y 5**, respectivamente). Según el resultado del gel, se escogieron las fracciones eluidas con mayor cantidad de proteína IF2 y se concentraron las fracciones usando filtros para centrífuga Amicon® Ultra 50K Da (Merck). Luego, se dializaron en IF2 γ Buffer IEX1 (Tris-HCl 40 mM, NaCl 30 mM, NH₄Cl 40 mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3) + Glicerol 10%, por 16 horas en un D-Tube™ Dialyzer Maxi 12-14 kDa (EMD Millipore).

Debido a que ambas proteínas clonadas en el plásmido contenían una cola de histidina + 5 aminoácidos aleatorios extra en el extremo N-terminal separados de la proteína IF2 γ por un sitio de corte para la proteasa TEV (Caban *et al.*, 2017), se expresó y purificó TEV según el protocolo detallado en Mendoza-Rojas *et al.* (2021), para purificar la proteína IF2 γ sin los aminoácidos añadidos. Se midió la concentración de las proteínas dializadas a través de su coeficiente de extinción 27.390 M⁻¹cm⁻¹ por absorbancia a 280 nm en el Nanodrop One (Thermo Scientific) y se guardó a -80 °C, dejando una muestra de 200 μ l para realizar ensayos analíticos de corte con la proteasa TEV.

Se realizó un primer ensayo analítico para hallar la relación Proteasa TEV:IF2 γ necesaria para cortar 0.25 μ g/ μ l de IF2 γ en el buffer de corte IF2 γ Buffer D (Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, Tritón X-100 0.1%, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3) por 12 horas a 4 °C (**Figura 6**), escogiendo trabajar con la relación 1:20. Luego, se realizó un segundo ensayo analítico para hallar el tiempo adecuado de corte para 0.25 μ g/ μ l de IF2 en la misma relación proteasa TEV:IF2 γ (1:20) a

4 °C (**Figura 7**). El ensayo sugirió realizar la reacción por más de 12 horas, teniendo una certeza de corte del 100% a las 24 horas. Finalmente, en un tercer ensayo analítico de corte con la proteasa TEV, se compararon diferentes concentraciones de IF2 γ en la misma relación 1:20 (**Figura 8**) a 4 °C. Los resultados demostraron que la proteasa TEV producida en el laboratorio tiene buena actividad en todo momento y sugieren utilizar mayores concentraciones de sustrato para disminuir el tiempo de reacción.

Se procedió con el ensayo de corte para IF2 γ con la proteasa TEV a mayor escala usando toda la proteína IF2 γ , previamente purificada (ambas: IF2 γ_{wt} , IF2 γ_{G810C}) con la primera columna, a una concentración de 0.5 mg/ml usando el mismo buffer de corte (IF2 γ Buffer D) y en relación 1:20 (proteasa TEV: IF2 γ) por 12 horas a 4 °C. La reacción de corte se cargó en una columna de intercambio catiónico HiTrapTM CaptoTM SP ImpRes (Cytiva) de 1 ml de volumen de columna (CV), pre-equilibrada con buffer de baja sal IF2 γ Buffer IEX1 (Tris-HCl 40 mM, NaCl 30 mM, NH₄Cl 40 mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3), mediante FPLC usando el equipo ÄKTATM Start Protein Purification System (Cytiva). Se lavó la columna con 20 ml de buffer de baja sal (IF2 γ Buffer IEX1) y se eluyó con buffer de alta sal IF2 γ Buffer IEX2 (Tris-HCl 40 mM, NaCl 750 mM, NH₄Cl 40 mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7.3) en un gradiente de 0% a 100% en 30 CV. Se colectaron fracciones de 1 ml trabajando siempre en frío (a 4°C) y se corrieron en un gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE (**Figura 9 y 10**). Se escogieron las fracciones que contenían a las proteínas IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C} considerando cantidad y pureza, y se concentraron usando los filtros para centrifuga Amicon® Ultra 50K Da (Merck). Luego, IF2 γ_{wt}

se dializó en Storage Buffer (Tris-HCl 25 mM, NH₄Cl 200 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) mientras que IF2γ_{G810C} se dializó en Labeling Buffer (Tris-HCl 20 mM, NH₄Cl 100 mM, glicerol 5%, pH 7.1), ambos por 16 horas en un D-Tube™ Dialyzer Maxi 12-14 kDa (EMD Millipore). Luego, se centrifugaron ambas proteínas dializadas a 9500 RPM por 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se cuantificó el sobrenadante de cada diálisis por Bradford empleando una curva patrón de BSA. Además, la proteína IF2γ_{wt} se cuantificó mediante análisis de gel de poliacrilamida (10%) por SDS-PAGE usando el software ImageJ (NIH) (**Figura 11**). Ambas proteínas purificadas se guardaron a -80 °C.

5.5.4 Marcación fluorescente de IF2γ_{G810C}

Se incubó IF2γ_{G810C} 30 μM con TCEP 300 μM a temperatura ambiente por 30 minutos para reducir completamente cualquier enlace disulfuro en IF2γ_{G810C}. Posteriormente, se añadió una solución de ATTO 540Q maleimide (ATTO-TEC) 10 mM (diluido en DMSO) hasta obtener una concentración final de 300 μM del mismo en la mezcla. A continuación, se mezcló bien la reacción y se incubó a 4 °C por 16 horas en completa oscuridad.

Luego, se diluyó la mezcla en buffer de baja sal, IF2γ Buffer IEX1, hasta alcanzar un volumen de 10 ml para detener la reacción de marcado por la presencia de β-mercaptoetanol en el buffer. La solución se cargó en una columna de intercambio iónico HiTrap™ Canto™ SP ImpRes (Cytiva) de 1 ml de volumen de columna (CV), pre-equilibrada con 5 CVs de buffer de baja sal (IF2γ Buffer IEX1),

trabajando siempre a oscuras y en frío (4 °C). Se lavó la columna cargada con 10 CVs de buffer de baja sal (IF2 γ Buffer IEX1) y se eluyó la proteína marcada usando buffer de alta sal (IF2 γ Buffer IEX2) hasta observar la completa elución de moléculas fluorescentes de la columna. Se colectaron muestras de 10 μ l del proceso de marcación antes, durante y después de la columna, mezcladas con 10 μ l de Sample Buffer 2X (SB 2X), para correrlas en un gel por SDS-PAGE (**Figura 12**); la muestra del eluido con mayor concentración de proteína se obtuvo mezclando 1 μ l de esta con 10 μ l de Sample Buffer 1X (SB 1X). Las fracciones eluidas que contenían a la proteína marcada con Quencher (Q) se dializaron inmediatamente en Storage Buffer a 4 °C por 16 horas.

Finalmente, la proteína IF2 γ _{G810C} marcada con quencher, ahora IF2 γ _Q, se cuantificó mediante Bradford y análisis de gel de poliacrilamida (10%) por SDS-PAGE usando el software ImageJ (NIH), ambos usando una curva patrón de BSA (**Figura 13**). Además, se midió la eficiencia de marcación por absorbancia en el Nanodrop One (Thermo Scientific) y, posteriormente, se guardó a -80°C.

5.5.5 Marcación fluorescente de IF3_{E166C}

Se incubó IF3_{E166C} 42 μ M con TCEP 210 μ M a 37 °C por 15 minutos en agitación constante (250 RPM). Posteriormente, se añadió una solución de Alexa FluorTM 488 C5-maleimide (Invitrogen) 20 mM (diluido en DMSO) hasta obtener una concentración final de 420 μ M del mismo en la mezcla. A continuación, se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 1 hora en un rotador.

Luego, se detuvo la reacción de marcación añadiendo buffer de baja sal IF3 Buffer BS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) a la mezcla hasta alcanzar un volumen de 10 ml, debido a la presencia de β -mercaptoetanol en el buffer. La solución se cargó en una columna de intercambio iónico HiTrap™ Cpto™ SP ImpRes (Cytiva) de 1 ml, pre-equilibrada con buffer de baja sal (IF3 Buffer BS), trabajando siempre a oscuras y en frío (4 °C). Se lavó la columna cargada con 10 ml de buffer de baja sal (IF3 Buffer BS) y se eluyó la proteína marcada usando buffer de alta sal IF3 Buffer AS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 1 M, β -mercaptoetanol 6 mM, pH 7.1) hasta observar la completa elución de moléculas fluorescentes de la columna. Se colectaron muestras de 10 μ l del proceso de marcación antes, durante y después de la columna, mezcladas con 10 μ l de Sample Buffer 2X, para correrlas en un gel por SDS-PAGE (**Figura 14**). Las fracciones eluidas que contenían a la proteína marcada con Alexa488 se dializaron inmediatamente en Storage Buffer a 4 °C por 16 horas.

Finalmente, la proteína fluorescente IF3_{E166C}, ahora IF3_{C_D}, se cuantificó mediante análisis de gel de poliacrilamida (15%) por SDS-PAGE usando el software ImageJ (NIH) y una curva patrón de BSA (**Figura 15**) y se guardó a -80 °C.

5.5.6 Ensayos de cinética por FRET

Para los ensayos de cinética se utilizaron todas las moléculas involucradas en los distintos complejos intermedios formados durante la fase de iniciación de la

traducción (Subunidades 30S y 50S del ribosoma, Factores de Iniciación IF1, IF2, IF3, mRNA^(AUG), tRNA_i (fMet-tRNA^{fMet}), GTP). Estas moléculas fueron donadas por el Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud de la UPC. Con respecto a las proteínas fluorescentes que componen cada par FRET, se usaron moléculas marcadas con un fluoróforo donador y un aceptor quencher según lo detalla la siguiente tabla:

Molécula	Descripción
IF3_{DL}	IF3 doblemente marcado (double-labeled). El fluoróforo donador (Alexa Fluor TM 488 C5-maleimide) se encuentra en el dominio N-terminal, en el aminoácido 65; y el fluoróforo aceptor (ATTO 540Q maleimide) en el dominio C-terminal, en la posición E166C.
IF3_{C_D}	IF3 marcado en el dominio C terminal con fluoróforo donador (Alexa Fluor TM 488 C5-maleimide), en la posición E166C (ver en Resultados).
IF2_{γQ}	IF2 marcado en el dominio C terminal con fluoróforo aceptor (ATTO 540Q maleimide), en la posición G810C (ver en Resultados).
IF1_D	IF1 marcado en la posición D5C con fluoróforo donador (Alexa Fluor TM 488 C5-maleimide).
BPY-tRNA_i	fMet-tRNA ^{fMet} marcado con fluoróforo donador BODIPY.
Apt³¹¹_{flu}	Aptámero 311 marcado con fluoresceína (flu).

Las mediciones de fluorescencia y cinética se hicieron a través del aparato Stopped-Flow SX20 (Applied Photophysics), el cual mezclaba rápidamente iguales volúmenes de cada solución reactante. La longitud de onda de excitación para los fluoróforos donadores (Alexa-488, BPY, Flu) fue de 470 nm, proporcionada por la fuente poder de luz LED (Applied Photophysics). La señal de emisión del donador se midió a través del fotomultiplicador pasando por un filtro óptico de paso largo con un corte de 515 nm. Todas las reacciones se desarrollaron en Buffer TAKM₇ (Tris-HCl 20 mM, NH₄Ac 70 mM, KCl 30 mM, MgCl₂ 7 mM, pH_{25°C} 7.4). Las subunidades 30S pasaron por un proceso de activación en Buffer TAKM₁₄₀

(TAKM₇ con MgCl₂ 140 mM) a 37 °C por 30 minutos. Las subunidades 30S y moléculas fluorescentes donadoras se prepararon en razón de 1:1 a 0.1 μM por jeringa. Las demás moléculas implicadas se usaron en razón de 3:1 respecto de la subunidad 30S, a excepción del GTP que se preparó en concentraciones iguales de 100 μM en cada jeringa. Los aptámeros se prepararon desnaturalizándolos a 95 °C por 5 minutos y luego se los dejó replegándose a temperatura ambiente por 15 minutos. Las soluciones reactantes que contenían aptámero se prepararon a concentración de 1 μM. Todas las soluciones reactantes se centrifugaron a 10000 RPM por 10 minutos a 21 °C antes de cargarlos al Stopped-Flow. Además, también se incluyó un ensayo de dispersión de luz (Light Scattering) medido por el mismo equipo Stopped-Flow, usando el monocromador a 430 nm y ningún filtro óptico. Se adquirieron 1000 puntos en cada medición de tiempo para todas las reacciones. Se registraron de 7 a 10 réplicas por reacción y, posteriormente, se promediaron. Los datos fueron analizados usando el software Prism 8.0 (Graphpad).

VI. RESULTADOS

6.1 Expresión y purificación de IF2 α

Para realizar los ensayos de cinética y evaluar el efecto del aptámero (Apt³¹¹) afín a IF2 en el contexto de la fase de iniciación de la traducción, se expresó la proteína IF2 α a partir del gen *infB* contenido en el plásmido pET24a en 1.8 L de cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con dicho plásmido. Las células del cultivo fueron recolectadas, obteniéndose un total de 4.1 g de células y posteriormente lisadas para poder purificar la proteína IF2 α mediante cromatografía, obteniendo dos lotes de proteína IF2 α . Ambos lotes se cuantificaron y analizaron en un gel de poliacrilamida 10% por SDS-PAGE (**Figura 1**). La comparación de las bandas correspondientes a la proteína IF2 α con el marcador proteico de pesos moleculares indicó que el peso molecular de la proteína expresada y purificada era el esperado con respecto a IF2 α (97 kDa). La proteína IF2 α se cuantificó por Bradford y por análisis de gel mediante el software ImageJ (NIH) utilizando una curva patrón de concentraciones conocidas de la proteína Albúmina de Suero Bovino (BSA) como referencia estándar. Se determinó una concentración de 40 μ M para el primer lote y de 101 μ M para el segundo. El análisis de gel también permitió determinar el grado de pureza de ambos lotes de proteína IF2 α , obteniéndose un 71% de pureza para el lote 1 y un 94% de pureza para el lote 2. Se decidió trabajar con el segundo lote de proteína IF2 α .

6.2 Efecto del Apt³¹¹ respecto de la llegada del tRNAi al 30S PIC

Como prueba inicial se realizó un ensayo preliminar con el Apt³¹¹ en el Pre-Complejo de Iniciación 30S escogiendo evaluar su efecto en la llegada del tRNAi, visto desde la molécula señal IF3_{DL} (**Figura 16A** y **Tabla 4**). Se utilizaron también los candidatos a aptámeros 715 y 721 (Apt⁷¹⁵, Apt⁷²¹) que previamente fueron seleccionados contra el dominio C2 de IF2, esperando también observar un efecto inhibitorio, pues el dominio C2 de IF2 tiene la función de reclutar el tRNAi.

Según el resultado del Stopped-Flow, se observó que el comportamiento normal de IF3 es extender sus dominios en el tiempo durante la unión del tRNAi (**Figura 16B**). Respecto de los Apt⁷¹⁵ y Apt⁷²¹ las curvas se mantuvieron con una tendencia similar a la curva control sin aptámero, lo que podría significar que dichos candidatos a aptámeros no se unen a IF2 o que la unión de estos aptámeros al CTD de IF2 no perturba el reclutamiento del tRNAi. Sin embargo, en presencia del Apt³¹¹ la curva de fluorescencia tuvo un comportamiento distinto comparado al control sin aptámero. Esta se mantuvo relativamente constante en el tiempo durante la unión del tRNAi, sin aumentar ni disminuir en su intensidad. Dicho comportamiento se interpreta en el sentido que IF3_{DL} mantiene su posición ante la presencia del tRNAi, indicando que este último no se une al complejo 30S PIC. En consecuencia, se formularon 3 hipótesis que explicarían este evento:

- i) Que el Apt³¹¹ estaría uniéndose al dominio C2 de IF2, interrumpiendo directamente el reclutamiento del tRNAi.

- ii) Que el Apt³¹¹ se une a otro dominio de IF2, pero afecta al dominio C2 alostéricamente induciendo un cambio conformacional en él.
- iii) Que el Apt³¹¹ impide la unión de IF2 a la subunidad 30S.

Por consiguiente, se propuso:

- i) Estudiar el posible sitio de unión del Apt³¹¹ en IF2 mediante Docking molecular.
- ii) Establecer un método de observación directa de IF2, marcada fluorescentemente para poder obtener señales FRET con otros componentes del complejo de iniciación 30S. Esto nos permitiría verificar en más detalle qué pasos del proceso de iniciación podría estar afectando el aptámero Apt³¹¹. Además, podría brindar una mejor visión de posibles cambios conformacionales en los subdominios de IF2 e incluso del correcto posicionamiento de IF2 en el complejo de iniciación.

6.3 Modelamiento del Apt³¹¹ y Docking molecular entre IF2 y el Apt³¹¹

Se observó que el plegamiento que toma el Apt³¹¹ consta de 3 stem loops, 1 zona no estructurada en los extremos 3 y 5' terminal y 3 pares de GCs (**Figura 17**). En general, la energía libre calculada a partir de las predicciones bidimensionales (-3.10 kcal/mol) indica que el aptámero es estable estructuralmente en un rango de temperaturas fisiológicas.

Las predicciones tridimensionales se usaron para estudiar la interacción con IF2 (PDB: 6O7K) mediante el software MOE (Chemical Computing Group Inc.) El resultado del Docking generó un ranking de las 100 mejores posiciones posibles del ligando (Apt³¹¹) en el receptor (IF2 γ), siendo el score más negativo aquel que expresaba la afinidad de unión más fuerte (**Figura 18** y **Tabla 1**). El análisis *in silico* sugiere que el Apt³¹¹ se une a IF2 entre los dominios G3 y C1.

6.4 Expresión y purificación de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C}

Para establecer un método de observación directa de IF2 obteniendo señales FRET con otros componentes del complejo de iniciación 30S, se expresó la proteína IF2 γ a partir del plásmido pProEX-HTb en su versión wild-type (IF2 γ_{wt}) y mutante (IF2 γ_{G810C} , teniendo la mutación en el dominio C2), en células de *E. coli* BL21 transformadas con dicho plásmido. Ambos plásmidos fueron donados gentilmente por el Laboratorio del Dr. Gonzalez, Columbia University. Primero se realizó una expresión de ambas versiones de IF2 γ a pequeña escala (analítica), usando 25 ml de medio de cultivo. El análisis de los geles por SDS-PAGE (**Figura 2**) confirmó la expresión del sistema, encontrándose las bandas de proteína correspondientes a IF2 γ entre las bandas de 85 y 100 kDa del marcador proteico de pesos moleculares. Cabe recalcar que ambas proteínas, cuyos genes estaban clonados en el plásmido, contenían una cola de histidina + 5 aminoácidos aleatorios extra en el extremo N-terminal separados de la proteína IF2 γ por un sitio de corte para la proteasa TEV (Caban *et al.*, 2017), por tanto, se esperaba que el peso de la proteína expresada fuese

mayor al peso real de IF2 γ , 78.8 kDa. Se observó también que a la primera hora post inducción apareció una banda gruesa que denotaba una fuerte expresión de la proteína. Sin embargo, esto no aumentaba en el tiempo después de la segunda hora post inducción, donde la banda alcanzaba su máximo grosor. En conclusión, el análisis de geles por SDS-PAGE de la expresión analítica indicó que efectivamente se expresa la proteína IF2 γ en ambas versiones (IF2 γ_{wt} y IF2 γ_{G810C}). En base a este resultado, se propuso realizar una expresión a escala grande (preparativa) con 2 L de medio de cultivo recolectando las células *E. coli* BL21 cultivadas hasta la segunda hora post inducción.

El análisis de gel por SDS-PAGE de la expresión preparativa de IF2 γ demostró que ambas versiones, wild-type y mutante, se expresaron correctamente hasta la segunda hora post-inducción (**Figura 3**). Las células del cultivo fueron recolectadas, obteniendo 6.38 g de pellet de células para IF2 γ_{wt} y 7.06 g para IF2 γ_{G810C} , y posteriormente lisadas para proceder con la purificación de ambas proteínas IF2 γ .

Ambas versiones de la proteína (IF2 γ_{wt} y IF2 γ_{G810C}) pasaron por una primera columna de cromatografía por afinidad que contiene Níquel inmovilizado para la unión de ambas proteínas IF2 γ a través de su cola de histidinas del extremo N-terminal. Las muestras de cada paso de la purificación que se corrieron en el gel mediante SDS-PAGE permitieron seguir el rastro de las proteínas expresadas durante el proceso, según las bandas generadas (**Figura 4 y 5**). Se observó la presencia de ambas proteínas (IF2 γ_{wt} y IF2 γ_{G810C}) de forma abundante desde el pellet hasta el filtrado del sobrenadante, acompañadas también de un gran número de proteínas solubles no deseadas. La presencia de ambas proteínas en el flow-through disminuyó

considerablemente, y las bandas correspondientes a los pasos de lavado también fueron decreciendo. Al eluir ambas proteínas de IF2 γ se obtuvo la mayor concentración de estas entre las fracciones 4 y 8, de 1 ml de volumen cada una.

Para eliminar la cola de histidinas de ambas proteínas (IF2 γ_{wt} y IF2 γ_{G810C}) se prepararon ensayos analíticos de corte con la proteasa TEV. Según el análisis de los geles (**Figura 6, 7 y 8**), se determinó el tratamiento proteasa TEV:IF2 γ en relación 1:20 usando altas concentraciones de sustrato (0.5 mg/ml) para disminuir el tiempo de reacción, establecido a 12 horas. Luego de la reacción de corte, ambas proteínas pasaron por una columna de intercambio catiónico. La comparación del tamaño de las bandas de las muestras del proceso corridas en el gel (**Figura 9 y 10**) con el marcador proteico de pesos moleculares demostró la presencia de las proteínas IF2 γ_{wt} y IF2 γ_{G810C} (78.8 kDa) sin la cola de histidinas ni los restantes aminoácidos añadidos. Finalmente, se cuantificó la proteína IF2 γ_{wt} por Bradford y por análisis de gel mediante el software ImageJ (NIH) utilizando una curva patrón de concentraciones conocidas de la proteína Albúmina de Suero Bovino (BSA) como referencia estándar. Para IF2 γ_{wt} se determinó una concentración final de 235 μ M con un grado de pureza del 85% (**Figura 11**) y se extrapoló que se obtuvo 1.9 mg de IF2 γ_{wt} por cada gramo de células recolectado. Con respecto a IF2 γ_{G810C} , se determinó una concentración de 147 μ M con un grado de pureza del 92% y se extrapoló que se obtuvo 3.03 mg de IF2 γ_{G810C} por cada gramo de células recolectado. Luego, se procedió a tratar a la proteína mutante IF2 γ_{G810C} con el protocolo de marcación fluorescente usando ATTO 540Q maleimide (ATTO-TEC) como fluoróforo quencher.

6.5 Marcación fluorescente de IF2 γ _{G810C} e IF3_{E166C}

Para obtener un método de observación directa desde IF2 durante las reacciones de formación de complejos de iniciación de la traducción, se propuso marcar fluorescentemente a la proteína IF2 γ a partir de una mutación en el dominio C2 (IF2 γ _{G810C}) con el fluoróforo aceptor o quencher ATTO 540Q maleimide (ATTO-TEC) y a su potencial par FRET IF3_{E166C} (proteína mutada donada por el laboratorio de Biomoléculas de la UPC) con el fluoróforo donador Alexa FluorTM 488 C5-maleimide (Invitrogen).

Se observó el correcto proceso de marcación fluorescente de las proteínas IF2 γ _{G810C} (78.8 kDa) e IF3_{E166C} (20.6 kDa) a partir de las muestras obtenidas corridas en un gel (**Figura 12** y **14**, respectivamente). En ambos casos, la mayor concentración de proteína marcada se obtuvo en el segundo volumen de elución (E2).

La proteína IF2 γ _{G810C} marcada con quencher, ahora IF2 γ _Q, se cuantificó mediante Bradford y análisis de gel de poliacrilamida por SDS-PAGE usando el software ImageJ (NIH), ambos usando una curva patrón de BSA (**Figura 13**). Adicionalmente, se midió la eficiencia de marcación por absorbancia en el Nanodrop One (Thermo Scientific). Se determinó que la proteína IF2 γ _Q se obtuvo con una concentración de 45 μ M, con un grado de pureza del 93%, una eficiencia de marcación del 91% y un rendimiento de marcación del 49%.

En cuanto a la proteína fluorescente IF3_{E166C}, ahora IF3_{CD}, se cuantificó mediante análisis de gel de poliacrilamida por SDS-PAGE usando el software ImageJ (NIH) y concentraciones conocidas de la proteína BSA como referencia estándar

(Figura 15). Según los análisis, se obtuvo una concentración de 121 μM de la proteína IF3_{C_D}, con una pureza del 99%, una eficiencia de marcación y rendimiento de marcación cercanos al 100%.

6.6 Caracterización de la señal FRET IF2 γ _Q-IF3_{C_D}

Para establecer y validar el sistema experimental, que permite el estudio de la cinética de reacciones mediante FRET en el Stopped-Flow, se decidió realizar la reacción de formación del complejo 30S·IFs evaluando la llegada de IF2 γ e IF3 al complejo pre-formado visto desde las moléculas señal IF2 γ _Q-IF3_{C_D} (Figura 19 y Tabla 5). Se añadió un control de señal donde el complejo se enfrentaba solamente a buffer (control versus buffer), el cual determina que la señal observada no se debe al factor de dilución. Además, se añadió un control de señal sin aceptor o quencher (control versus IF2 γ _{wt}), el cual determina si la señal observada es específica a la presencia del donador y aceptor; y un control sin la subunidad 30S del ribosoma, que descarta cualquier interacción directa e inespecífica entre IF2 γ _Q-IF3_{C_D}.

Se observó que cuando llega IF2 γ _Q al complejo, la curva de fluorescencia decrece en el tiempo. Este resultado es específico porque al medir la reacción contra buffer se obtuvo una emisión de fluorescencia constante que indicó que la señal correspondiente a la llegada de IF2 γ _Q no se debe a la dilución de la reacción. El resultado fue similar con respecto al control versus IF2 γ _{wt}, indicando que la curva correspondiente a la llegada de IF2 γ es específica de la presencia de IF2 γ _Q-IF3_{C_D}. Además, se descartó cualquier interacción directa entre IF2 γ _Q-IF3_{C_D} debido a que el

ensayo en ausencia de ribosoma también denotó una curva que no decrecía en el tiempo, sino que se mantenía constante. Asimismo, se observó que la llegada de IF3_{CD} ($k_{app} = 154.337 \pm 1.786 \text{ s}^{-1}$) al complejo también genera una curva que decrece en el tiempo, pero con una cinética distinta a la de IF2 γ_Q ($k_{app} = 82.740 \pm 0.350 \text{ s}^{-1}$) y también con amplitudes de la curva diferentes (**Figura 21**). En conjunto, el análisis de las curvas de fluorescencia generadas en el tiempo respecto de la formación del complejo 30S·IFs visto desde la llegada de IF2 γ_Q e IF3_{CD}, individualmente, determinó la validez de la señal FRET entre IF2 γ_Q -IF3_{CD}, y que esta señal FRET es dependiente del ribosoma 30S.

Análogamente, se realizó un experimento *chase* con respecto a IF2 γ_Q e IF3_{CD} (**Tabla 6**) para observar el comportamiento de ambas moléculas en su disociación del complejo 30S·IFs. En este ensayo se tiene el complejo 30S·IFs (IF2 γ_Q -IF3_{CD}) formado y en equilibrio, de manera que cada componente se une y se disocia del ribosoma 30S. Al mezclar este complejo con un exceso de una de las moléculas señal, pero en su versión wild-type carentes de fluoróforo (IF2 γ_{wt} o IF3), cada vez que la molécula señal se disocia, tiene que competir con el exceso de la misma molécula sin fluoróforo, resultando en este caso en un aumento de fluorescencia. La concentración en exceso usada de las moléculas wild-type carentes de fluoróforo fue de 10 veces mayor a aquellas modificadas con fluoróforo para la señal.

Los resultados mostraron en ambos casos un aumento de fluorescencia en el tiempo (**Figura 20**), siendo la disociación de IF2 γ ($k_{-1} = 1.078 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$) mucho más rápida que la de IF3 ($k_{-1} = 0.004 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$). En conjunto, se comprobó que se puede medir la unión y disociación de IF2 γ e IF3 al complejo usando FRET entre las

moléculas IF2 γ -IF3 C_D , y que las velocidades de reacción obtenidas son similares a aquellas reportadas anteriormente (Milón *et al.*, 2012).

6.7 El Apt³¹¹ no afecta la unión de IF2 al complejo 30S·IFs

Para determinar si el Apt³¹¹ perturba la formación del complejo 30·IFs, se evaluó la llegada de IF2 al complejo pre-incubado con el aptámero y, adicionalmente, con una secuencia aleatoria de DNA (Random^{DNA}) como control de especificidad al Apt³¹¹ (**Tabla 7**).

Los resultados mostraron que el control sin aptámero presenta una curva que disminuye su fluorescencia en el tiempo con respecto a la llegada de IF2 al complejo 30S·IFs (**Figura 22**), de la misma manera que se reportó en el ensayo anterior (*sección 6.6*). Sin embargo, se observó que las demás curvas correspondiente a la presencia del Apt³¹¹ y el control con la secuencia Random^{DNA} mostraron bastante similitud, siendo las diferencias mínimas y despreciables entre ellas. Por tanto, se concluyó que el Apt³¹¹ no perturba la llegada de IF2 γ al complejo.

6.8 Formación del 30S IC en función del Apt³¹¹

En la *sección 6.2* se observó que, visto desde IF3, el tRNA_i no se une o no llegaba al complejo 30S PIC. Por lo tanto, se evaluó nuevamente la llegada del tRNA_i al pre-

Complejo de Iniciación 30S en presencia de aptámero, pero visto desde un nuevo par FRET: tRNAi fluorescente (BPY-tRNAi) e IF2 γ Q (**Tabla 8**).

Las curvas de fluorescencia generadas en el tiempo demostraron diferencia en la amplitud entre las reacciones con y sin Apt³¹¹, indicando cambios conformacionales en IF2 γ (**Figura 23**). Además, se observó que la llegada de BPY-tRNAi fue más lenta en presencia del Apt³¹¹ ($k_{app} = 0.05 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$) que sin él ($k_{app} = 0.078 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$).

El análisis de resultados indicó que, efectivamente, el Apt³¹¹ perturba la llegada de tRNAi al 30S PIC probablemente debido a cambios conformacionales en IF2 γ que alejan el dominio C2 del tRNAi.

6.9 Formación del 70S IC en función de Apt³¹¹

Para determinar si el Apt³¹¹ perturba la formación del 70S IC, se evaluó la llegada del tRNAi junto con la subunidad ribosomal 50S mediante la señal emitida por BPY-tRNAi pero sin fluoróforo aceptor (**Tabla 9**), debido a que la posición del tRNAi muestra un cambio rotacional durante la formación del 70S IC tras la llegada del 50S.

Se observó que la curva de fluorescencia en ausencia de aptámero decrecía en el tiempo, siendo este comportamiento un resultado esperado (**Figura 24A**). Sin embargo, en presencia del Apt³¹¹ la amplitud de la curva fue bastante menor. Adicionalmente, la curva sin aptámero demostró un comportamiento bifásico, denotando que la reacción se producía en dos distintas velocidades, siendo la primera

más rápida que la segunda ($k_{app1} = 0.036 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app2} = 0.005 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, en presencia de aptámero la reacción resultó bastante rápida ($k_{app} = 1.459 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$), pero dada la forma de la curva y la comparación de amplitudes, el resultado sugería que la reacción no se completaba, indicando que el tRNAi no llegaría a su posición adecuada.

Para evaluar si la subunidad 50S se asocia al complejo 30S PIC en presencia del Apt³¹¹, se repitió el experimento anterior, pero midiéndose a través de Light Scattering usando moléculas wild-type y sin fluoróforos (**Tabla 10**). Además, se adicionaron reacciones con una secuencia de DNA aleatoria como control de especificidad del Apt³¹¹ y con el tRNA de iniciación sin el grupo formilo (Met-tRNA^{fMet}) como control de especificidad de unión IF2-tRNAi.

Light Scattering es un fenómeno de dispersión de luz generado por el movimiento de partículas en un líquido y es una técnica comúnmente usada para analizar el tamaño de partículas a nivel de nm. En este ensayo se midió la dispersión de luz a una longitud de onda de 430 nm sobre el 30S PIC con la llegada conjunta del tRNAi y la subunidad 50S (**Figura 24B**). Un aumento en la dispersión de luz denotaría la creciente formación de complejos 70S IC, debido al mayor volumen de estos en comparación al 30S PIC. En ausencia del Apt³¹¹, se observa que la dispersión de luz alcanza 0.145 a.u. en un tiempo de 200 segundos, también se observa un comportamiento bifásico con respecto a la velocidad de la reacción, cuya primera mitad ocurre bastante rápido ($k_{app1} = 0.105 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$) y la segunda mitad del proceso ocurre más lento ($k_{app2} = 0.020 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, en presencia del Apt³¹¹, la amplitud de dispersión de luz fue reducida, alcanzando un máximo de 0.083 a.u. en

un tiempo de 200 segundos con un comportamiento de reacción también bifásico pero cuya fase rápida inicial ($k_{app1} = 0.114 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$) ocurría en una corta fracción del lapso de reacción y predominaba, mas bien, la fase lenta ($k_{app2} = 0.012 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$); indicando que la presencia del Apt³¹¹ podría reducir la formación de complejos 70S IC. En conjunto, el Apt³¹¹ perturba la formación del Complejo de Iniciación 70S posiblemente impidiendo que el tRNA_i llegue a su posición adecuada y evitando la asociación de la subunidad 50S del ribosoma al complejo.

VII. DISCUSIÓN

IF2 es una molécula multi-dominios que asegura la fidelidad de la iniciación de la traducción bacteriana participando activamente en la formación de complejos intermedios que conllevan a la síntesis proteica (Milón & Rodnina, 2012). Su rol fundamental se debe a que recluta el tRNA_i a través del dominio C2, promueve el emparejamiento de bases codón-anticodón y la asociación de la subunidad 50S al complejo 30S IC, hidroliza GTP mediante el dominio G2 y permite la maduración del 70S IC en 70S EC (Goyal *et al.*, 2015; Ling & Ermolenko, 2015; Milon *et al.*, 2010; Sprink *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). En el presente trabajo, se planteó el uso de aptámeros como moléculas inhibidoras de la traducción bacteriana y su evaluación con respecto a las funciones de IF2 en la iniciación de la traducción; siendo este estudio inédito en el marco de que el Apt³¹¹ se propone como un novedoso inhibidor de síntesis proteica, no existiendo antecedentes de otros aptámeros dirigidos a IF2.

En un primer ensayo preliminar se evaluó el efecto del Apt³¹¹ en la llegada del tRNA_i al complejo 30S PIC usando la molécula señal IF3_{DL}. La reacción sin Apt³¹¹ resultó en un incremento de fluorescencia, significando que los dominios N y C-terminal de IF3 se alejan uno de otro (**Figura 16**); lo cual es consistente con estudios previos experimentales e *in silico* que respaldan un modelo en el que IF3 acomoda al tRNA_i en el sitio P del ribosoma a través de movimientos del NTD (dominio que establece contacto con el codo del tRNA_i) en el que este cambia de la posición N_R a la N_T, mientras que durante la maduración del 30S IC, el CTD (que está unido a la plataforma del 30S) cambia del sitio C2 al C1 (Nakamoto *et al.*, 2021). Sin embargo, la presencia del Apt³¹¹ resultó en una posición inalterada de IF3 en la que sus dominios

permanecieron constantes, sugiriendo que el tRNA_i nunca llega al 30S PIC o no está lo suficientemente cerca de IF3 como para hacer contacto y establecer un cambio conformacional en él (**Figura 25**). En consecuencia, se formularon 3 hipótesis que explicarían este evento:

- i) Que el Apt³¹¹ estaría uniéndose al dominio C2 de IF2, interrumpiendo directamente el reclutamiento del tRNA_i.
- ii) Que el Apt³¹¹ se une a otro dominio de IF2, pero afecta al dominio C2 alostéricamente induciendo un cambio conformacional en él.
- iii) Que el Apt³¹¹ impide la unión de IF2 a la subunidad 30S.

El análisis *in silico* por Docking molecular (**Figura 18**) sugiere que el Apt³¹¹ se une a IF2 entre los dominios G3 y C1, mas no por el dominio C2; descartando la hipótesis (i). Además, el ensayo de la formación del complejo 30S·IFs evaluado mediante la señal FRET IF3C_D-IF2γ_Q, demuestra que IF2 sí se une a la subunidad 30S en presencia de Apt³¹¹ y que este no modifica la estructura de IF2 al llegar ni durante su acomodación en el complejo (**Figura 22**); descartando definitivamente la hipótesis (iii).

A propósito de la hipótesis (ii), mediciones usando smFRET sugieren que el dominio C1 juega un papel fundamental alostérico que involucra la unión de GTP al dominio G2 y el reconocimiento del tRNA_i por el dominio C2 (Caban *et al.*, 2017). El grupo propone que en el complejo 30S IC, la unión específica de GTP al dominio G2 de IF2 está comunicada alostéricamente a través del dominio C1, lo cual resulta en un

reposicionamiento del dominio C2 más cerca del sitio P; y cuando C2 reconoce específicamente la metionina formilada del tRNAⁱ, se retroalimenta la comunicación con C1 estabilizando una conformación alargada de IF2 en el 30S IC que permite la rápida unión de la subunidad 50S (Caban *et al.*, 2017). En cambio, observaron que cuando GDP se une al dominio G2 de IF2, el dominio C2 se aleja del tRNAⁱ unido al sitio P y más bien se acerca a la conformación G2-C1 adoptando una estructura más compacta de IF2 y que inactiva la unión rápida del 50S en el complejo (Basu *et al.*, 2022; Caban *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha comprobado que IF2 induce una conformación semi-rotada del ribosoma durante la formación del 70S Pre-IC y que requiere de GTP y el tRNAⁱ para estabilizar dicha orientación rotacional (Ling & Ermolenko, 2015; Sprink *et al.*, 2016). Asimismo, visualizaciones por cryo-EM de las interfaces entre los dominios de IF2·GDP compacto de *Pseudomonas aeruginosa* y el ribosoma durante la transición del 70S IC al 70S EC proponen un modelo similar explicando que tras la hidrólisis de GTP, el dominio G se re-arregla liberando restricciones en el dominio C1 y aumentando su flexibilidad intrínseca (Basu *et al.*, 2022). El dominio C1, ahora libre, pierde interacciones con la subunidad 30S, permitiendo que el 30S revierta su rotación atrás mientras que el dominio C1 se reubica formando una nueva interfaz con el dominio G unido a GDP. Esta nueva conformación de los dominios C1 y G aleja al dominio C2 del tRNAⁱ, liberando el tRNAⁱ de IF2 en el sitio P. El estado IF2·GDP pierde interacciones con las subunidades 30S y 50S, facilitando su disociación del complejo y comprometiendo el ribosoma a la elongación (Basu *et al.*, 2022).

Dado que el planteamiento de que el dominio C1 tiene actividad alostérica sobre el dominio C2 y encaja con el resultado del Docking molecular en el que situamos al

Apt³¹¹ entre los dominios G3-C1 (**Figura 18** y **Figura 25**), se evaluó la transición del 30S IC al 70S IC en presencia de Apt³¹¹, midiendo la formación del complejo 30S IC visto desde el dominio C2 de IF2 (IF2 γ Q) y el tRNAi fluorescente (BPY-tRNAi) (**Figura 23**). La presencia del Apt³¹¹ en la reacción evidenció que el tRNAi no se llega a acomodar adecuadamente pues no establece contacto cercano con el dominio C2 de IF2, probablemente porque IF2 no alcanza su conformación final (**Figura 25**). Una posibilidad es que el Apt³¹¹ restrinja la flexibilidad del dominio C1 y otra posibilidad es que el Apt³¹¹ bloquee la comunicación alostérica del dominio C1 desde el dominio G, manteniendo en ambos casos una conformación compacta similar a aquella en IF2·GDP.

Cuando se evalúa la llegada de BPY-tRNAi en conjunto con la subunidad 50S al complejo 30S IC para medir la formación del 70S IC dependiente de tRNAi, se observó una reducción de la fluorescencia (**Figura 24A**) que ya se ha caracterizado anteriormente atribuyéndola a la liberación del tRNAi de IF2 durante la formación del 70S IC y su adecuada acomodación en el sitio P (Goyal *et al.*, 2015). Sin embargo, en presencia del Apt³¹¹ la reducción de fluorescencia fue mínima en comparación. Además, los resultados por Light Scattering (**Figura 24B**) demuestran que, efectivamente, el complejo 70S IC no llega a formarse en presencia de Apt³¹¹ pues la subunidad 50S no se asocia. Esto podría deberse a que en el complejo 30S IC·Apt³¹¹ nunca se establece la conformación codón-anticodón, evitando la asociación de la subunidad 50S (Milon *et al.*, 2008). Otro desencadenante de la liberación de los IFs del complejo, además de la disociación del tRNAi de IF2, es la hidrólisis de GTP (Goyal *et al.*, 2015). Es posible que el Apt³¹¹ perturbe la hidrólisis de GTP de manera indirecta.

En conjunto, el Apt³¹¹ perturba el reclutamiento del tRNAⁱ de IF2 y su posterior acomodación en el sitio P de la subunidad 30S durante la formación del complejo 30S IC, así como también, impide la asociación de la subunidad 50S y, por ende, la formación del 70S IC. Al respecto, el Apt³¹¹ es una molécula con potencial antibiótico que inhibe las funciones de la molécula esencial IF2 en la iniciación de la traducción probablemente debido a su unión a nivel de los dominios C1 y G3 de IF2, impidiendo la comunicación alostérica entre los dominios G2 y C2 (Caban *et al.*, 2017). Futuras investigaciones con el Apt³¹¹ deberán incluir ensayos *in vivo* para evaluar su capacidad antimicrobiana. Asimismo, la presente investigación demuestra que los aptámeros pueden usarse como moléculas inhibitoras, pudiendo obtener prospectos moleculares de uso clínico; así como también podemos usarlos para descubrir o validar nuevas funciones (estructurales o metabólicas) de dominios estructurales de proteínas, y que pueden ayudar a esclarecer los distintos procesos bioquímicos investigados en la ciencia básica.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos con el propósito de evaluar las posibles perturbaciones que causa el aptámero de DNA (Apt³¹¹) en las funciones del Factor IF2 de *Escherichia coli* en la fase de iniciación de la traducción, podemos concluir que:

- La predicción de la estructura tridimensional del aptámero Apt³¹¹ y su interacción en complejo con el Factor de Iniciación 2 (IF2) de *E. coli* establece que la unión del Apt³¹¹ se sitúa a nivel de los dominios C1 y G3 de IF2.
- Se expresaron y purificaron las moléculas del Factor de Iniciación 2: IF2 α , IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C} .
- Se marcaron fluorescentemente las moléculas proteicas IF2 γ_Q e IF3 C_D .
- Las distintas señales FRET caracterizadas para los estudios cinéticos del ribosoma bacteriano son: IF2 γ_Q -IF3 C_D ; BPY-tRNA_i-IF2 γ_Q .
- El Apt³¹¹ perturba el reclutamiento del tRNA_i de IF2 y su posterior acomodación en el sitio P de la subunidad ribosomal 30S, durante la formación del complejo 30S IC.
- El Apt³¹¹ impide la asociación de la subunidad ribosomal 50S y, por ende, perturba la formación del complejo 70S IC.

IX. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. *Molecules*, *24*(23).
<https://doi.org/10.3390/molecules24234229>
- Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(9).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361>
- Ashrafuzzaman, M. (2014). Aptamers as Both Drugs and Drug-Carriers. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/697923>
- Barrenechea, V., Vargas-Reyes, M., Quiliano, M., & Milón, P. (2021). A Complementary Mechanism of Bacterial mRNA Translation Inhibition by Tetracyclines. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1431.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.682682/BIBTEX>
- Basu, R. S., Sherman, M. B., & Gagnon, M. G. (2022). Compact IF2 allows initiator tRNA accommodation into the P site and gates the ribosome to elongation. *Nature Communications* *2022 13:1*, *13*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31129-2>
- Bayat, P., Nosrati, R., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Khedri, M., & Ramezani, M. (2018). SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie*, *154*, 132–155.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.001>
- Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C. L., Dahlberg, A. E., & Gualerzi, C. O. (2008). Initiation of protein synthesis: A target for antimicrobials. *Expert Opinion on*

Therapeutic Targets, 12(5), 519–534.

<https://doi.org/10.1517/14728222.12.5.519>

Caban, K., Pavlov, M., Ehrenberg, M., & Gonzalez, R. L. (2017). A conformational switch in initiation factor 2 controls the fidelity of translation initiation in bacteria. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01492-6>

Caserta, E., Ferrara, C., Milon, P., Fabbretti, A., Rocchetti, A., Tomšić, J., Pon, C. L., Gualerzi, C. O., & La Teana, A. (2010). Ribosomal Interaction of *Bacillus stearothermophilus* Translation Initiation Factor IF2: Characterization of the Active Sites. *Journal of Molecular Biology*, 396(1), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.026>

Caserta, E., Tomšić, J., Spurio, R., La Teana, A., Pon, C. L., & Gualerzi, C. O. (2006). Translation Initiation Factor IF2 Interacts with the 30 S Ribosomal Subunit via Two Separate Binding Sites. *Journal of Molecular Biology*, 362(4), 787–799. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.07.043>

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., ... Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

CDC. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>

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* 2016, Vol. 5, Page 38, 5(4), 38.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS5040038>

Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., & Ruml, T. (2015). Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1141–1161.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>

DIGEMID. Ministerio de Salud. (2017). *Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017-2019*.
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf>

Elvekrog, M. M., & Gonzalez, R. L. (2013). Conformational selection of translation initiation factor 3 signals proper substrate selection. *Nature Structural & Molecular Biology* 2013 20:5, 20(5), 628–633.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2554>

Eugene, W. M., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Guyer, D. R., & Adamis, A. P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2), 123–132.
<https://doi.org/10.1038/nrd1955>

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>

Famulok, M., & Mayer, G. (2011). Aptamer modules as sensors and detectors.

Accounts of Chemical Research, 44(12), 1349–1358.

<https://doi.org/10.1021/ar2000293>

Fernandes, P., & Martens, E. (2017). Antibiotics in late clinical development.

Biochemical Pharmacology, 133, 152–163.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>

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>

Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E. N., Carter, J., Dalby,

A. B., Eaton, B. E., Fitzwater, T., Flather, D., Forbes, A., Foreman, T., Fowler,

C., Gawande, B., Goss, M., Gunn, M., Gupta, S., Halladay, D., ... Zichi, D.

(2010). Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker

Discovery. *PLOS ONE*, 5(12), e15004.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015004>

Goyal, A., Belardinelli, R., Maracci, C., Milón, P., & Rodnina, M. V. (2015).

Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation.

Nucleic Acids Research, 43(22), 10700–10712.

<https://doi.org/10.1093/NAR/GKV869>

Gualerzi, C. O., Fabbretti, A., Brandi, L., Milon, P., & Pon, C. L. (2010). Role of the

initiation factors in mRNA start site selection and fMet-tRNA recruitment by

bacterial ribosomes. *Israel Journal of Chemistry*, 50(1), 80–94.

<https://doi.org/10.1002/ijch.201000006>

Gualerzi, C. O., Severini, M., Spurio, R., La Teana, A., & Pon, C. L. (1991).

Molecular dissection of translation initiation factor IF2. Evidence for two structural and functional domains. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16356–16362. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55305-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55305-9)

Gualerzi, C., & Pon, C. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes.

Biochemistry, 29(25), 5881–5889. <https://doi.org/10.1021/bi00477a001>

Gualerzi, C., & Pon, C. (2015). Initiation of mRNA translation in bacteria: Structural and dynamic aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22), 4341–4367.

<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2010-3>

Hamula, C. L. A., Zhang, H., Li, F., Wang, Z., Chris Le, X., & Li, X. F. (2011).

Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(10), 1587.

<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.08.006>

Hicke, B. J., & Stephens, A. W. (2000). Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 106(8), 923.

<https://doi.org/10.1172/JCI11324>

Hoellenriegel, J., Zboralski, D., Maasch, C., Rosin, N. Y., Wierda, W. G., Keating,

M. J., Kruschinski, A., & Burger, J. A. (2014). The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood*, 123(7), 1032.

<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-03-493924>

Jeddi, I., & Saiz, L. (2017). Three-dimensional modeling of single stranded DNA

hairpins for aptamer-based biosensors. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5>

Jilma-Stohlawetz, P., Gilbert, J. C., Gorczyca, M. E., Knöbl, P., & Jilma, B. (2011).

A dose ranging phase I/II trial of the von Willebrand factor inhibiting aptamer ARC1779 in patients with congenital thrombotic thrombo-cytopenic purpura.

Thrombosis and Haemostasis, 106(3), 539–547. <https://doi.org/10.1160/TH11-02-0069/ID/JR0069-10>

Joseph, D. F., Nakamoto, J. A., Garcia Ruiz, O. A., Peñaranda, K., Sanchez-Castro,

A. E., Castillo, P. S., & Milón, P. (2019). DNA aptamers for the recognition of HMGB1 from *Plasmodium falciparum*. *PLOS ONE*, 14(4), e0211756.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211756>

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>

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms

of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical*

Pharmacology, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature*

Reviews. Drug Discovery, 9(7), 537. <https://doi.org/10.1038/NRD3141>

Kovacevic, K. D., Buchtele, N., Schoergenhofer, C., Derhaschnig, U., Gelbenegger,

G., Brostjan, C., Zhu, S., Gilbert, J. C., & Jilma, B. (2020). The aptamer BT200

effectively inhibits von Willebrand factor (VWF) dependent platelet function

after stimulated VWF release by desmopressin or endotoxin. *Scientific Reports*

2020 10:1, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68125-9>

- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187–208. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00210-3)
- Laursen, B. S., Kjærgaard, A. C., Mortensen, K. K., Hoffman, D. W., & Sperling-Petersen, H. U. (2004). The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 13(1), 230. <https://doi.org/10.1110/PS.03337604>
- 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/mmbr.69.1.101-123.2005>
- Ling, C., & Ermolenko, D. N. (2015). Initiation factor 2 stabilizes the ribosome in a semirotated conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 15874–15879. https://doi.org/10.1073/PNAS.1520337112/SUPPL_FILE/PNAS.201520337SI.PDF
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135–145. [/pmc/articles/PMC5369031/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27481111/)
- Londei, P. (2015). Translation Initiation Models in Prokaryotes and Eukaryotes. In *eLS* (pp. 1–7). John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000541.pub3>
- Maasch, C., Buchner, K., Eulberg, D., Vonhoff, S., & Klussmann, S. (2008). Physicochemical stability of NOX-E36, a 40mer L-RNA (Spiegelmer) for

therapeutic applications. *Nucleic Acids Symposium Series (2004)*, 52, 61–62.

<https://doi.org/10.1093/nass/nrn031>

- Martin, D. F., Klein, M., Haller, J., Adamis, A., Gragoudas, E., Miller, J., Blumenkrantz, M., Goldberg, M., Yannuzzi, L., Henninger, D., Wiegand, L. B., Chen, L. S., Drolet, D. W., Gill, S. C., Bill, J., Tomkinson, B., Bendele, R. A., O'Shaughnessy, D., Guyer, D. R., & Patel, S. (2002). Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 22(2), 143–152. <https://doi.org/10.1097/00006982-200204000-00002>
- McPhillie, M. J., Cain, R. M., Narramore, S., Fishwick, C. W. G., & Simmons, K. J. (2015). Computational methods to identify new antibacterial targets. *Chemical Biology and Drug Design*, 85(1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12385>
- Medina, E., & Pieper, D. H. (2016). Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 3–33. https://doi.org/10.1007/82_2016_492
- Mendoza-Rojas, G., Sarabia-Vega, V., Sanchez-Castro, A., Tello, L., Cabrera-Sosa, L., Nakamoto, J. A., Peñaranda, K., Aduai, V., Alcántara, R., & Milón, P. (2021). A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. *STAR Protocols*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100899>
- 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. *Methods in Enzymology*, *430*, 1–30. [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 & Molecular Biology* *2012 19:6*, *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., Tomšic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M. V., Pon, C. L., Boelens, R., & Gualera, C. O. (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/ASSET/134E6729-7A0D-4038-8B99-EA788C2E18DD/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ03706344200G5.JPEG>
- Mortensen, K. K., Kildsgaard, J., Moreno, J. M. P., Steffensen, S. A. D. A., Egebjerg, J., & Sperling-Petersen, H. U. (1998). A six-domain structural model for *Escherichia coli* translation initiation factor IF2. Characterisation of twelve

surface epitopes. *IUBMB Life*, 46(5), 1027–1041.

<https://doi.org/10.1080/15216549800204582>

Myasnikov, A. G., Simonetti, A., Marzi, S., & Klaholz, B. P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 300–309.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.04.010>

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).

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab522>

Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 61–79.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>

Nyengaard, N. R., Mortensen, K. K., Lassen, S. F., Hershey, J. W. B., & Sperling-Petersen, H. U. (1991). Tandem translation of E.coli initiation factor IF2 β : Purification and characterization in vitro of two active forms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 1572–1579.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)92118-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)92118-4)

O’Neill, J. (2014). *Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. http://www.jpiamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations_1-2.pdf

Özalp, V. C., Bilecen, K., Kavruk, M., & Avni Öktem, H. (2013). Antimicrobial aptamers for detection and inhibition of microbial pathogen growth. *Future*

Microbiology, 8(3), 387–401. <https://doi.org/10.2217/FMB.12.149>

Parunov, L. A., Soshitova, N. P., Fadeeva, O. A., Balandina, A. N., Kopylov, K. G., Kumskova, M. A., Gilbert, J. C., Schaub, R. G., McGinness, K. E., Ataulakhanov, F. I., & Pantelev, M. A. (2014). Drug-drug interaction of the anti-TFPI aptamer BAX499 and factor VIII: studies of spatial dynamics of fibrin clot formation in hemophilia A. *Thrombosis Research*, 133(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2013.10.036>

Pavlov, M. Y., Zorzet, A., Andersson, D. I., & Ehrenberg, M. (2011). Activation of initiation factor 2 by ligands and mutations for rapid docking of ribosomal subunits. *The EMBO Journal*, 30(2), 289–301. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.328>

Quiñones D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “una salud.” *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1–17. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=pt

Rodnina, M. V. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9), a032664. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A032664>

Rohloff, J. C., Gelinas, A. D., Jarvis, T. C., Ochsner, U. A., Schneider, D. J., Gold, L., & Janjic, N. (2014). Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 3(10), e201. <https://doi.org/10.1038/MTNA.2014.49>

Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T. E., & Burley, S. K. (2000). X-Ray Structures of the Universal Translation Initiation Factor IF2/eIF5B. *Cell*, 103(5), 781–792.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00181-1)

Rusconi, C. P., Roberts, J. D., Pitoc, G. A., Nimjee, S. M., White, R. R., Quick, G., Scardino, E., Fay, W. P., & Sullenger, B. A. (2004). Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1423–1428. <https://doi.org/10.1038/NBT1023>

Rusconi, C. P., Scardino, E., Layzer, J., Pitoc, G. A., Ortel, T. L., Monroe, D., & Sullenger, B. A. (2002). RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature*, 419(6902), 90–94. <https://doi.org/10.1038/NATURE00963>

Sacerdot, C., Vachon, G., Laalami, S., Morel-Deville, F., Cenatiempo, Y., & Grunberg-Manago, M. (1992). Both forms of translational initiation factor IF2 (alpha and beta) are required for maximal growth of *Escherichia coli*. Evidence for two translational initiation codons for IF2 beta. *Journal of Molecular Biology*, 225(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91026-L](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91026-L)

Sánchez, 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* [Tesis de maestría]. In Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/18576>

Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71–109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>

Sprink, T., Ramrath, D. J. F., Yamamoto, H., Yamamoto, K., Loerke, J., Ismer, J., Hildebrand, P. W., Scheerer, P., Bürger, J., Mielke, T., & Spahn, C. M. T. (2016). Structures of ribosome-bound initiation factor 2 reveal the mechanism of subunit association. *Science Advances*, 2(3), e1501502.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501502>

Spurio, R., Brandi, L., Caserta, E., Pon, C. L., Gualerzi, C. O., Misselwitz, R., Krafft, C., Welfle, K., & Welfle, H. (2000). The C-terminal subdomain (IF2 C-2) contains the entire fMet-tRNA binding site of initiation factor IF2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2447–2454.

<https://doi.org/10.1074/JBC.275.4.2447>

Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>

Stuart, R. K., Stockerl-Goldstein, K., Cooper, M., Devetten, M., Herzig, R., Medeiros, B., Schiller, G., Wei, A., Acton, G., & Rizzieri, D. (2009). Randomized phase II trial of the nucleolin targeting aptamer AS1411 combined with high-dose cytarabine in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Clinical Oncology*, 27(15_suppl), 7019–7019.

https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.15_SUPPL.7019

Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2066.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>

Sun, H., & Zu, Y. (2015). Aptamers and their Applications in Nanomedicine. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 11(20), 2352.

<https://doi.org/10.1002/SMLL.201403073>

Sundaram, P., Kurniawan, H., Byrne, M. E., & Wower, J. (2013). Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1–

2), 259–271. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2012.10.014>

Tolentino, M. J., Dennrick, A., John, E., & Tolentino, M. S. (2015). Drugs in Phase II clinical trials for the treatment of age-related macular degeneration. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(2), 183–199.

<https://doi.org/10.1517/13543784.2015.961601>

Troisi, R., Napolitano, V., Spiridonova, V., Krauss, I. R., & Sica, F. (2018). Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer. *Nucleic Acids Research*, 46(22), 12177–12185.

<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY990>

Wang, J., Caban, K., & Gonzalez, R. L. (2015). Ribosomal initiation complex-driven changes in the stability and dynamics of initiation factor 2 regulate the fidelity of translation initiation. *Journal of Molecular Biology*, 427(9), 1819–1834.

<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2014.12.025>

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 35–48). Nat Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>

Windels, E. M., Michiels, J. E., van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2019). Antibiotics: Combatting tolerance to stop resistance. *MBio*, 10(5).

<https://doi.org/10.1128/mBio.02095-19>

World Health Organization. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. WHO. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

World Health Organization. (2019, March 21). *Ten threats to global health in 2019*. <https://www.who.int/vietnam/news/feature-stories/detail/ten-threats-to-global->

health-in-2019

- Yan, A. C., & Levy, M. (2018). Aptamer-Mediated Delivery and Cell-Targeting Aptamers: Room for Improvement. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(3), 194–199. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0732>
- Yazdian-Robati, R., Bayat, P., Oroojalian, F., Zargari, M., Ramezani, M., Taghdisi, S. M., & Abnous, K. (2020). Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1420–1431. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.11.118>
- Yelin, I., & Kishony, R. (2018). Antibiotic Resistance. *Cell*, 172(5), 1136-1136.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>
- Zeninskaya, N. A., Kolesnikov, A. V., Ryabko, A. K., Shemyakin, I. G., Dyatlov, I. A., & Kozyr, A. V. (2016). Aptamers in the treatment of bacterial infections: Problems and prospects. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 71(5), 350–358. <https://doi.org/10.15690/vramn591>
- Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Erratum: Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges (Nature Reviews Drug Discovery (2017) 16 (181-202) DOI: 10.1038/nrd.2016.199). *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6), 440. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.86>

X. ANEXOS

FIGURAS

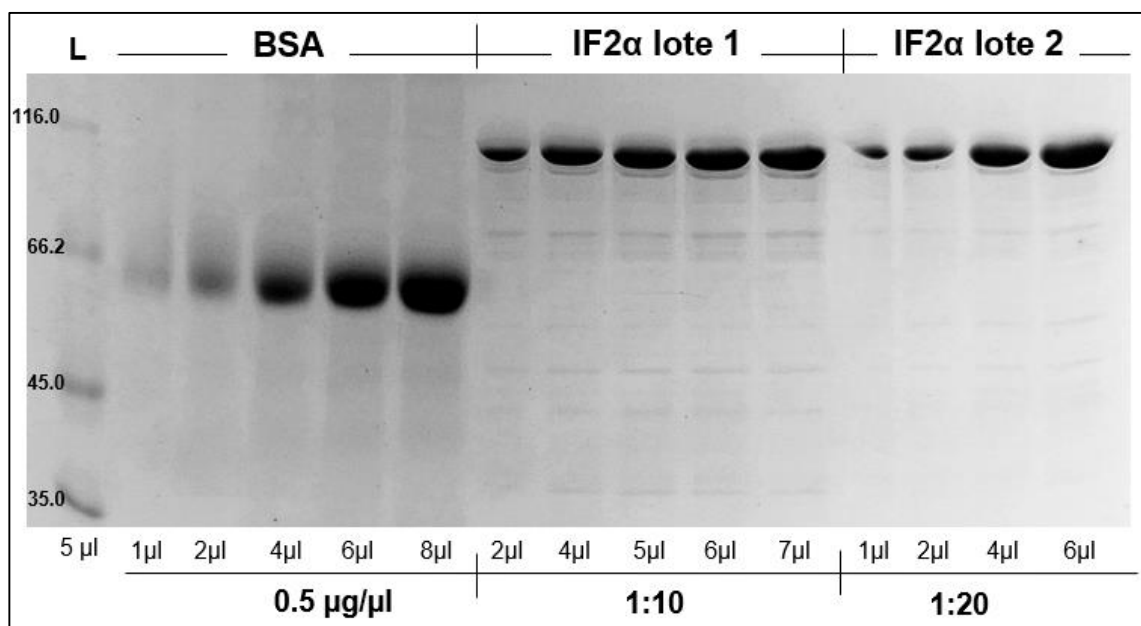


Figura 1. Cuantificación de IF2 α por análisis de gel SDS-PAGE mediante ImageJ (NIH). El gel de poliacrilamida 10% muestra distintos volúmenes cargados de la proteína IF2 α purificada, a partir de una dilución 1:10 del lote 1 y una dilución 1:20 del lote 2. L: Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

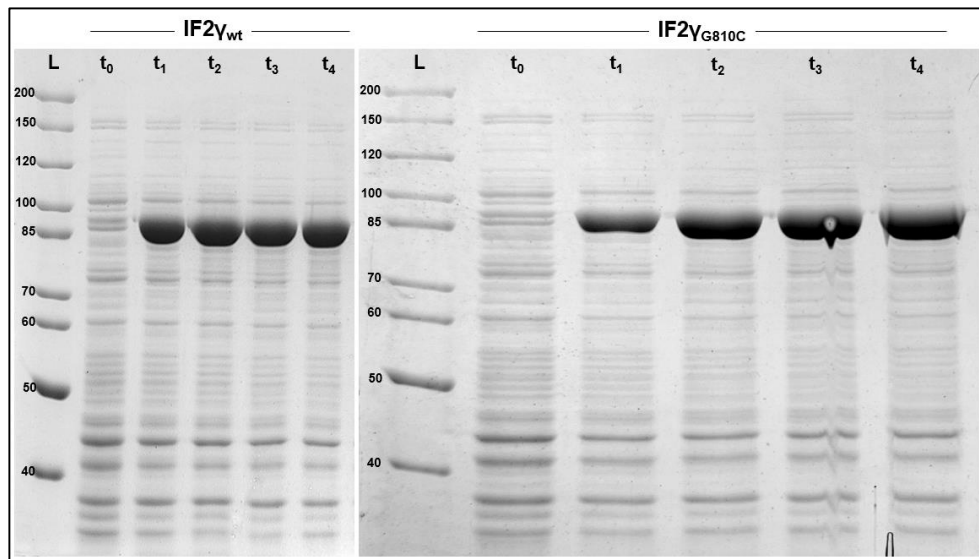


Figura 2. Expresión analítica de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C} . Expresión a escala pequeña de las proteínas IF2 γ_{wt} (izquierda) e IF2 γ_{G810C} (derecha) antes de la inducción (t_0) y post inducción (t_1 - t_4). Gel de poliacrilamida 10% mediante SDS-PAGE. L: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

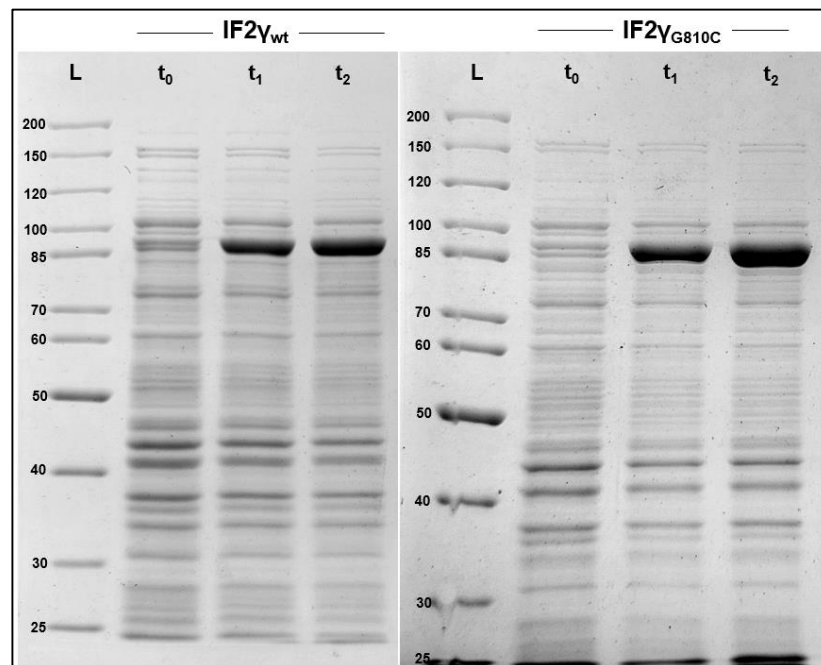


Figura 3. Expresión preparativa de IF2 γ_{wt} e IF2 γ_{G810C} . Expresión a mayor escala de las proteínas IF2 γ_{wt} (izquierda) e IF2 γ_{G810C} (derecha) antes de la inducción (t_0) y post inducción (t_1 y t_2). Gel de poliacrilamida 10% mediante SDS-PAGE. L: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

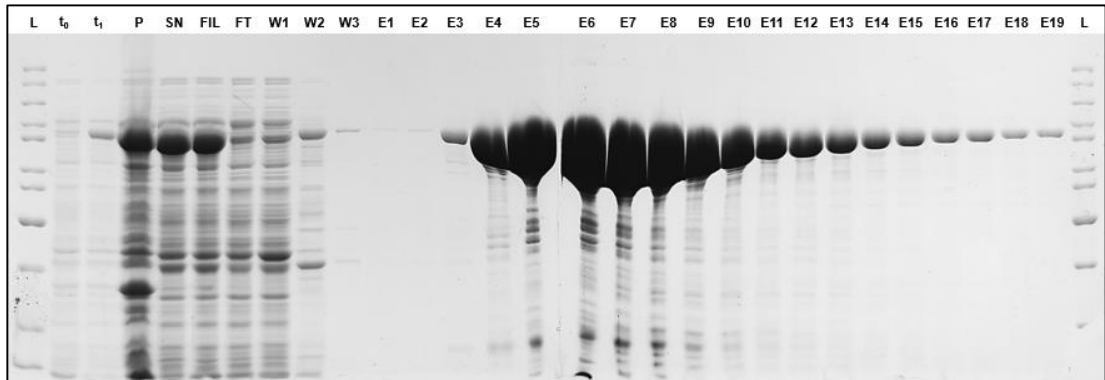


Figura 4. Purificación de IF2 γ _{wt}. Gel de poliacrilamida 10% mediante SDS-PAGE. **L:** PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), **t₀:** muestra de la expresión preparativa antes de la inducción, **t₁:** muestra de la expresión preparativa antes de la inducción, **P:** pellet, **SN:** sobrenadante, **FIL:** filtrado, **FT:** Flow-through, **W1:** primer lavado, **W2:** segundo lavado, **W3:** tercer lavado, **E1-19:** fracciones eluidas. Elaboración de las muestras: 2 μ l de P, SN, FIL y FT + 20 μ l de SB 1X; y 20 μ l de W y E + 20 μ l de SB 2X. Volumen de carga: 10 μ l.

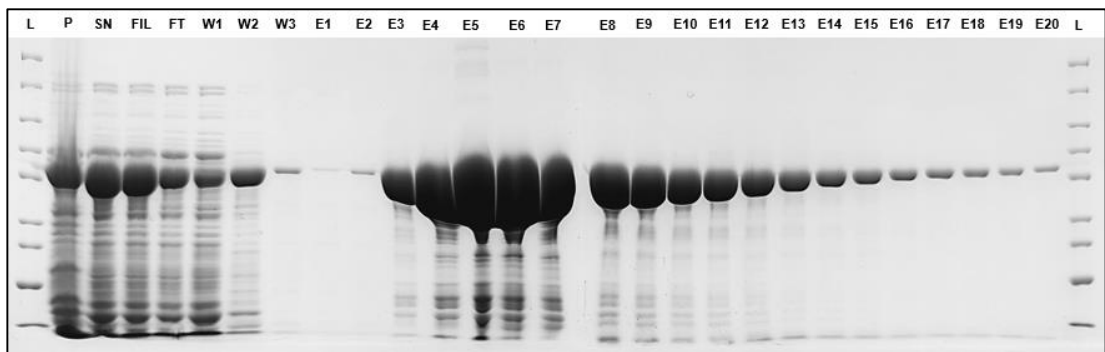


Figura 5. Purificación de IF2 γ _{G810C}. Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. **L:** PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific), **P:** pellet, **SN:** sobrenadante, **FIL:** filtrado, **FT:** Flow-through, **W1:** primer lavado, **W2:** segundo lavado, **W3:** tercer lavado, **E1-20:** fracciones eluidas. Elaboración de las muestras: 2 μ l de P, SN, FIL y FT + 20 μ l de SB 1X; y 20 μ l de W y E + 20 μ l de SB 2X. Volumen de carga: 10 μ l.

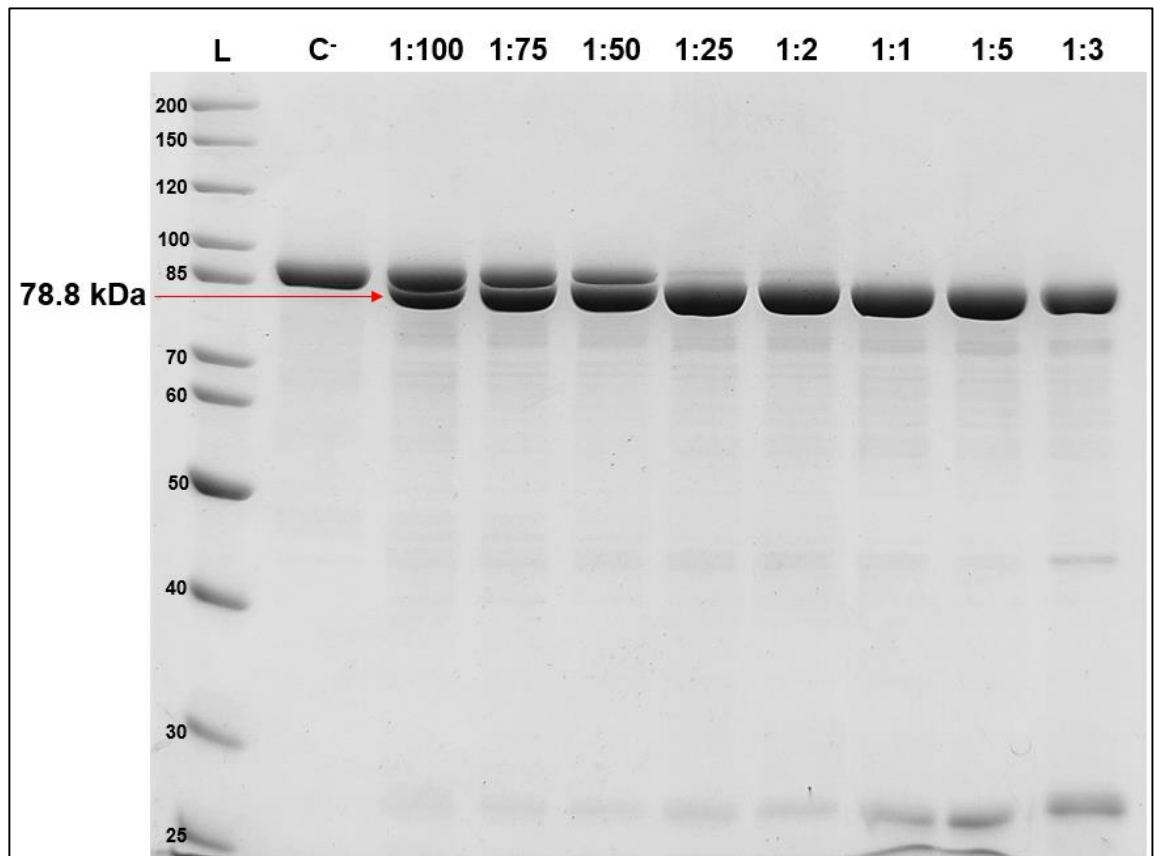


Figura 6. Ensayo analítico de corte de la proteasa TEV para IF2 γ . Relación Proteasa TEV:IF2 γ para 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de IF2 γ en 12 horas. Gel de poliacrilamida 10% mediante SDS-PAGE. L: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). C⁻: Control de IF2 γ sin tratamiento con la proteasa TEV.

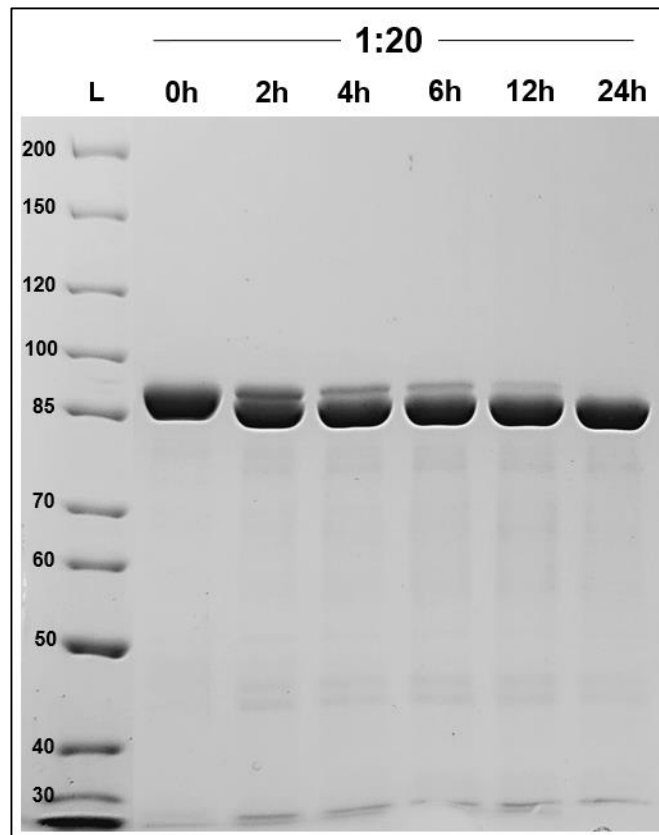


Figura 7. Ensayo analítico de corte en el tiempo de la proteasa TEV en relación 1:20 con IF2 γ . Las reacciones de corte contienen 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de IF2 γ . Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. **L:** PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). **h:** horas.

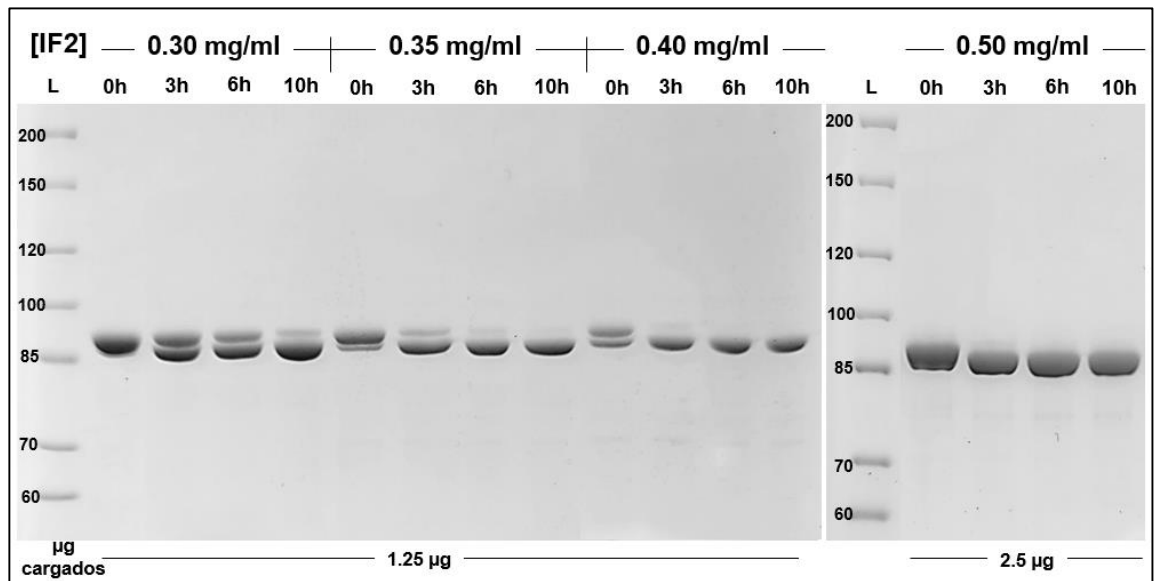


Figura 8. Ensayo analítico de corte en el tiempo de la proteasa TEV en relación 1:20 con IF2 γ . Las reacciones de corte contienen 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 y 0,50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de IF2 γ . Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. L: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). h: horas.

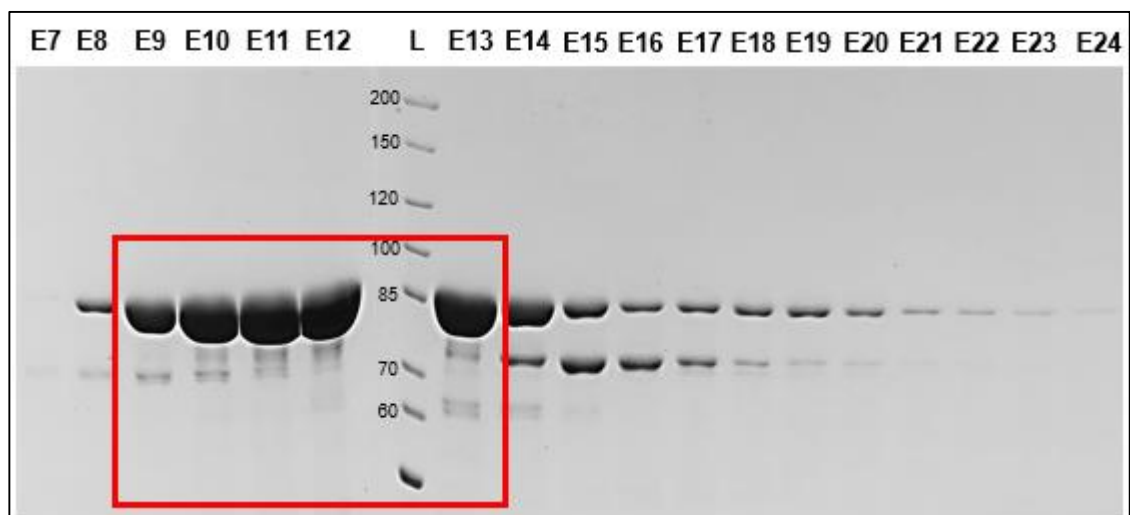


Figura 9. Fracciones eluidas de IF2 γ G810C por FPLC. Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. L: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). E: fracciones eluidas de 1 ml. El cuadro rojo encierra las fracciones escogidas para dializar.

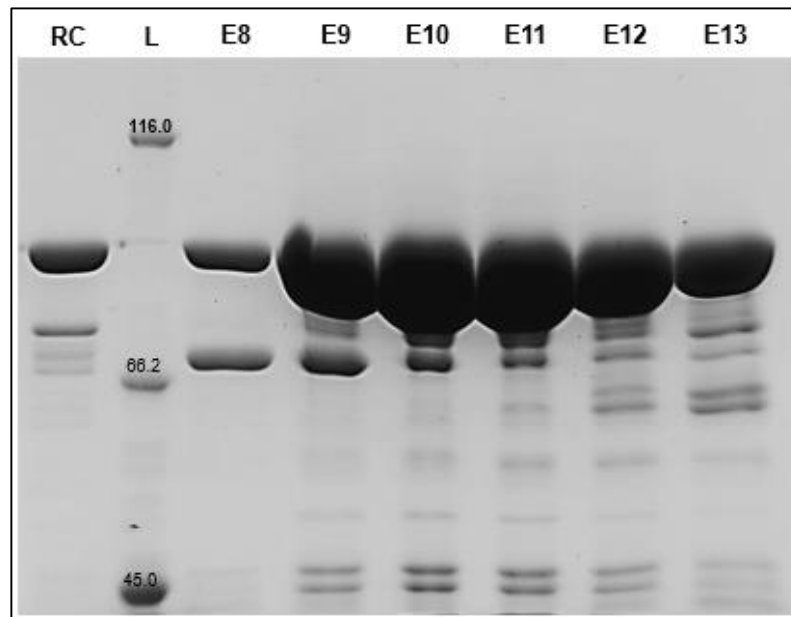


Figura 10. Fracciones eluidas de IF2 γ_{wt} por FPLC. Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. **RC:** muestra de reacción de corte de IF2 γ_{wt} con la proteasa TEV antes de purificar por FPLC. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific). **E:** fracciones eluidas de 1 ml.

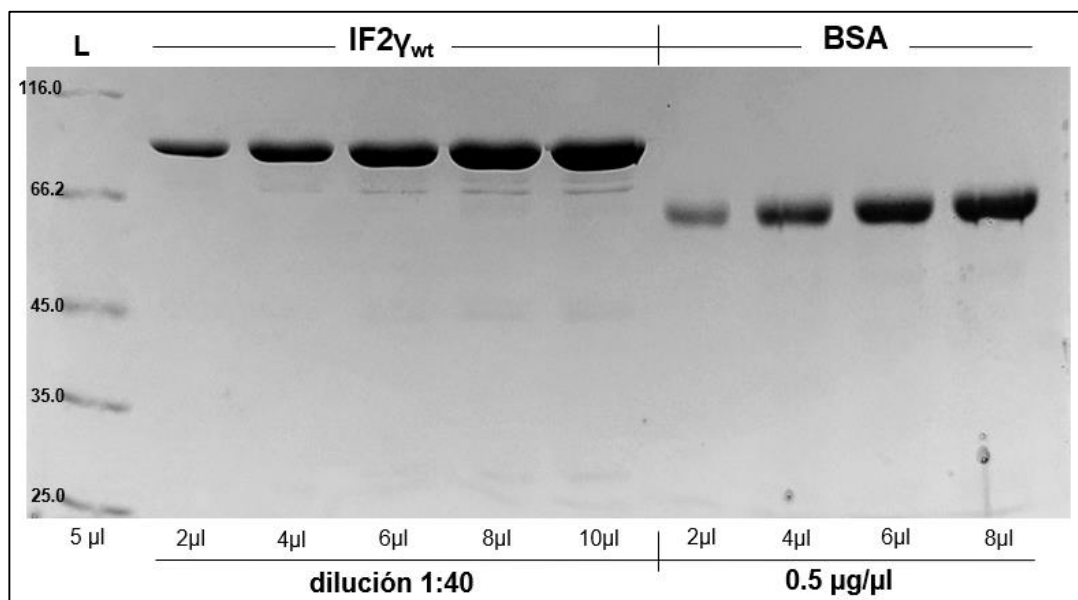


Figura 11. Cuantificación de IF2 γ_{wt} por análisis de gel mediante ImageJ (NIH). El gel de poliacrilamida 10% mediante SDS-PAGE muestra distintos volúmenes cargados de la proteína IF2 γ_{wt} purificada, a partir de una dilución 1:40 del stock original. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

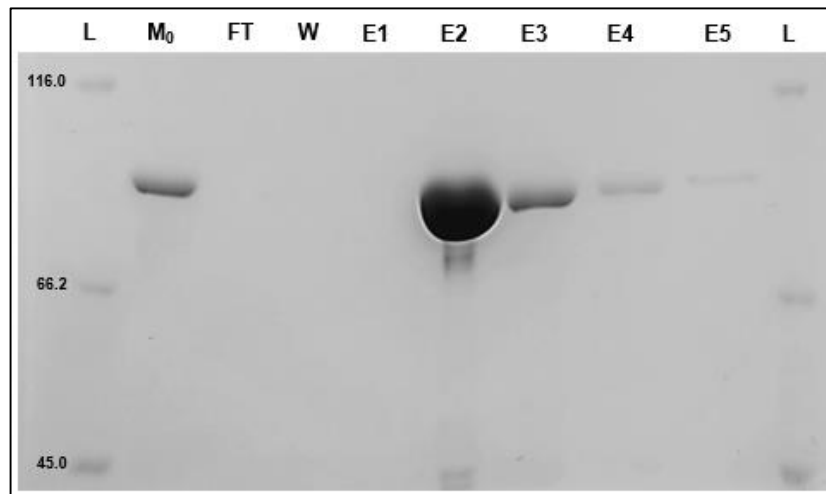


Figura 12. Marcación fluorescente de IF2 γ G810C con ATTO 540Q maleimide antes, durante y después de la columna. Gel de poliacrilamida 7.5% mediante SDS-PAGE. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific). **M₀:** muestra de reacción de marcación antes de pasar por la columna. **FT:** Flow-through. **W:** lavado. **E:** fracciones eluidas. Elaboración de las muestras: 10 μ l de todas las muestras, excepto E2, + 10 μ l de SB 2X; para E2 se tomó 1 μ l + 10 μ l SB 1X. Volumen de carga: 10 μ l.

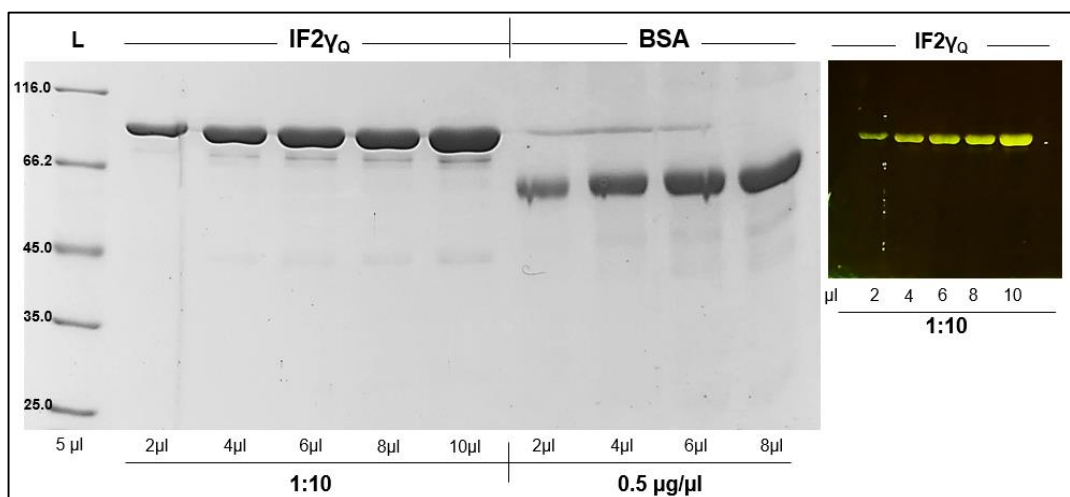


Figura 13. Cuantificación de IF2 γ Q por análisis de gel mediante ImageJ (NIH). A la izquierda se observa el gel de poliacrilamida 10% muestra distintos volúmenes cargados de la proteína IF2 γ _{wt} purificada, a partir de una dilución 1:10 del stock original. A la derecha se observa el mismo gel a través de un transiluminador, evidenciando la proteína marcada fluorescentemente. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

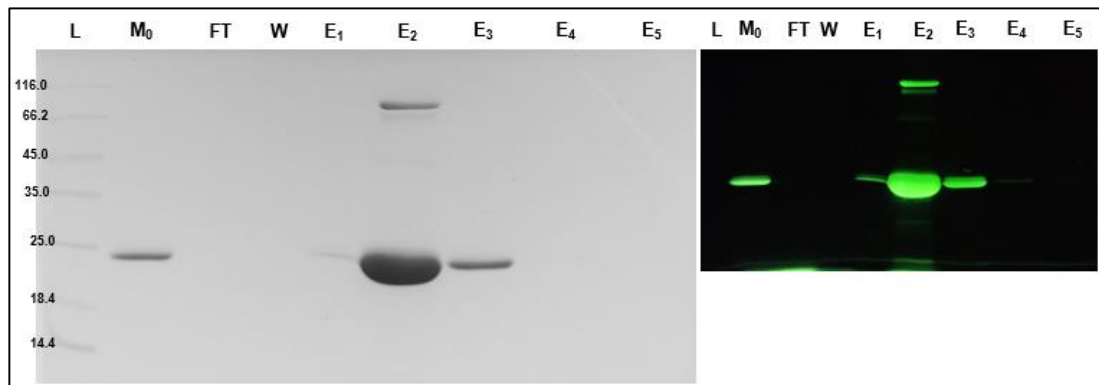


Figura 14. Marcación fluorescente de IF3_{E166C} con Alexa Fluor 488 maleimide antes, durante y después de la columna. A la izquierda se observa el gel de poliacrilamida 15% mediante SDS-PAGE. A la derecha se observa el mismo gel a través de un transiluminador, evidenciando la proteína marcada fluorescentemente. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific). **M₀:** muestra de reacción de marcación antes de pasar por la columna. **FT:** Flow-through. **W:** lavado. **E:** fracciones eluidas. Elaboración de las muestras: 10 µl de todas las muestras + 10 µl de SB 2X. Volumen de carga: 20 µl.

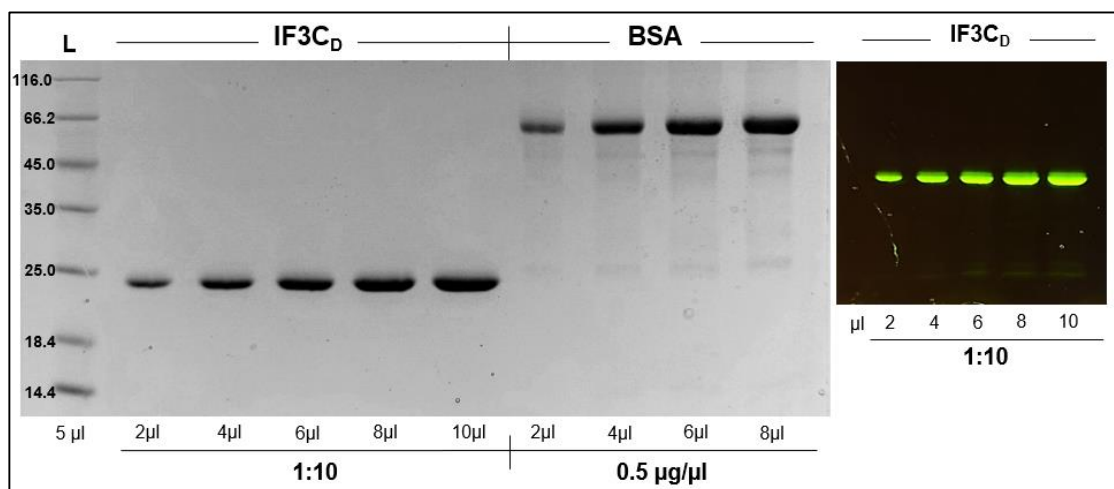


Figura 15. Cuantificación de IF3_{CD} por análisis de gel mediante ImageJ (NIH). A la izquierda se observa el gel de poliacrilamida 15% muestra distintos volúmenes cargados de la proteína IF3_{CD} purificada, a partir de una dilución 1:10 del stock original. A la derecha se observa el mismo gel a través de un transiluminador, evidenciando la proteína marcada fluorescentemente. **L:** Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

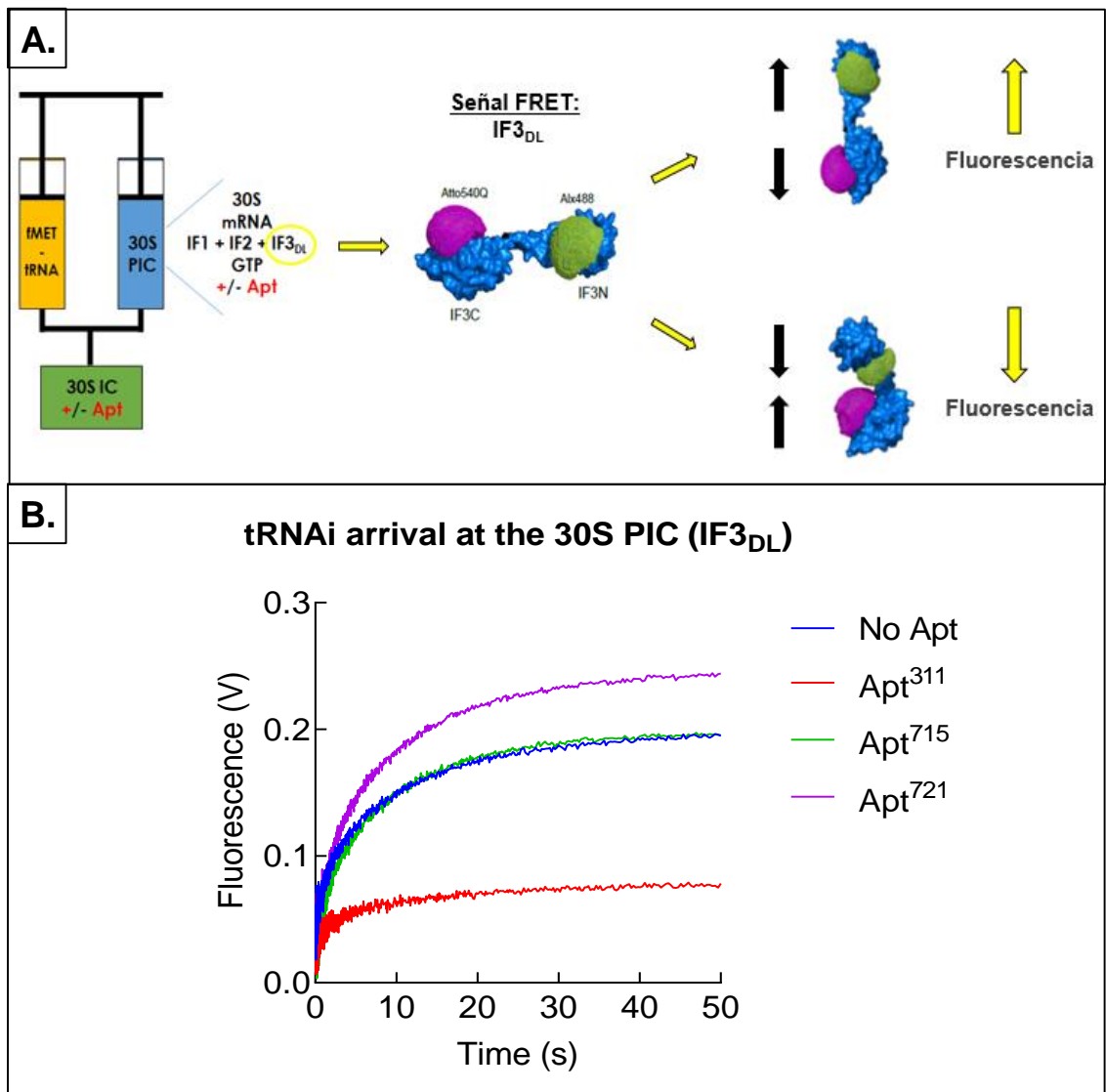


Figura 16. Llegada del tRNA_i al 30S PIC en función del aptámero pre-incubado al complejo. A) Ilustración del sistema experimental de esta reacción (imagen de la proteína marcada IF3_{DL} obtenida de Nakamoto *et al.*, 2021). B) Curvas de fluorescencia en el tiempo producto de la reacción. La señal FRET es producida por IF3_{DL}. Apt⁷¹⁵ y Apt⁷²¹ son aptámeros afines al dominio C2 de IF2. El Apt³¹¹ perturba la unión del tRNA_i al 30S PIC, pero se desconoce su sitio de unión a IF2.

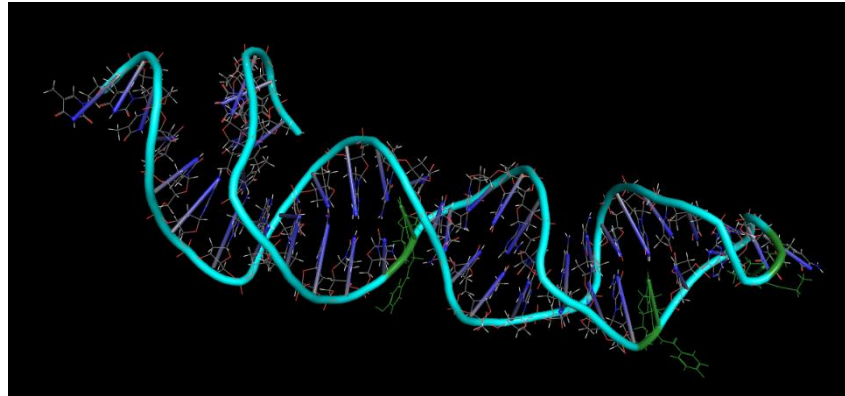


Figura 17. Modelamiento de la estructura tridimensional del Apt³¹¹. Se observa que el plegamiento del aptámero de DNA (Apt³¹¹) consta de 3 steam loops, 1 zona no estructurada en los extremos 3 y 5' terminal y 3 pares de GCs. Las modificaciones químicas se muestran de color verde.

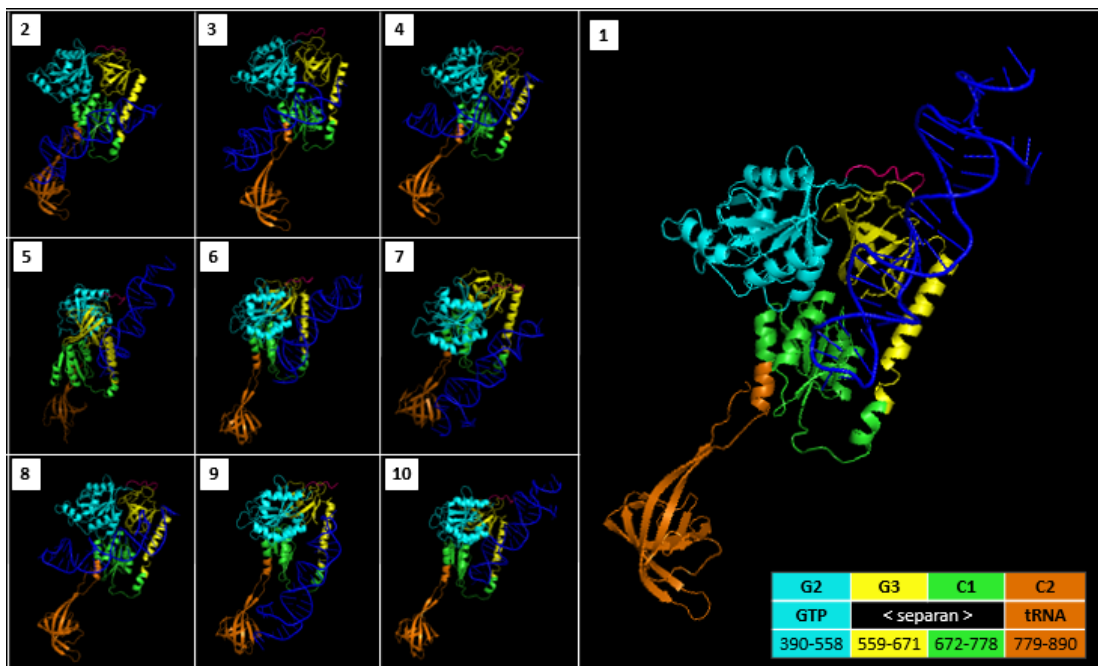


Figura 18. Docking Molecular entre el ligando Apt³¹¹ y el receptor IF2 γ . Ranking de las 10 mejores posiciones posibles del ligando Apt³¹¹ (azul) en el receptor IF2 γ . Se observa que la unión del Apt³¹¹ predomina en los dominios G3 (amarillo) y C1 (verde) de IF2 (PDB: 6O7K).

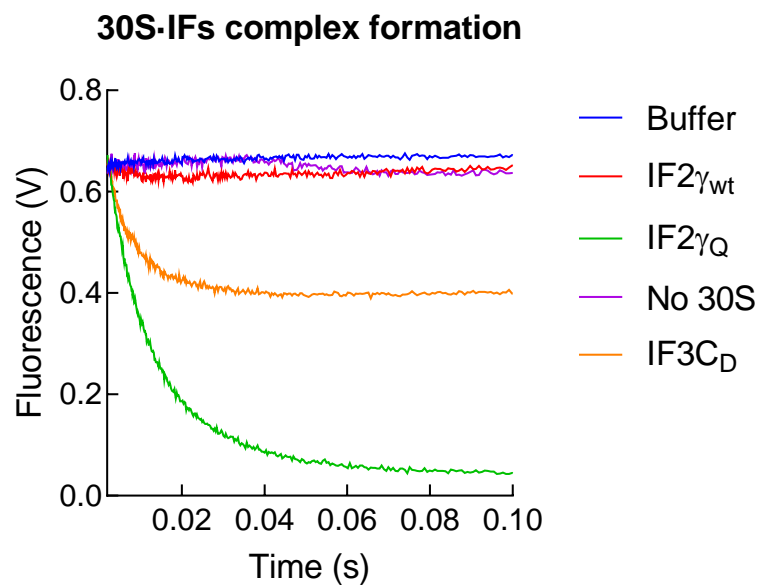


Figura 19. Caracterización de la señal FRET IF3C_D-IF2 γ_Q en la llegada de IF2 γ_Q /IF3C_D al complejo 30S-IFs. (Verde) Llegada de IF2 γ_Q al complejo 30S-IFs. (Azul) Control de señal con buffer. (Rojo) Control de especificidad de unión con IF2 γ_{wt} . (Violeta) Control sin 30S. (Naranja) Llegada de IF3C_D al complejo 30S-IFs. Se obtuvieron los siguientes k_{app} para IF2 γ_Q e IF3C_D: $k_{app} = 82.740 \pm 0.350 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app} = 154.337 \pm 1.786 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

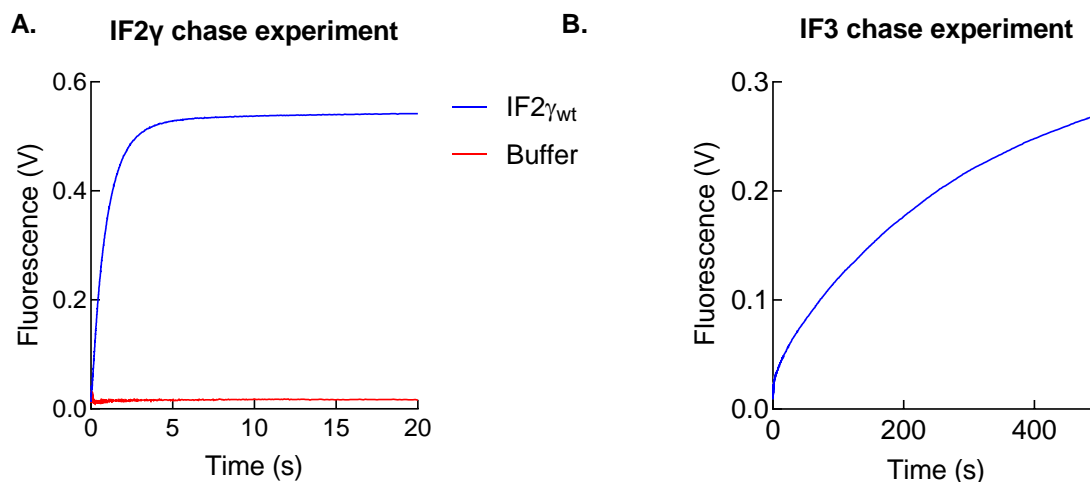


Figura 20. Disociación de IF2 γ _Q e IF3 del complejo 30S·IFs. La señal FRET se da entre IF3C_D–IF2 γ _Q. **(A)** ensayo chase con exceso de IF2 γ _{wt} y control de señal con buffer. **(B)** ensayo chase con exceso de IF3. Las constantes microscópicas de disociación (k_{-1}) para IF2 γ _Q e IF3C_D obtenidas fueron: $k_{-1} = 1.078 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ y $k_{-1} = 0.004 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

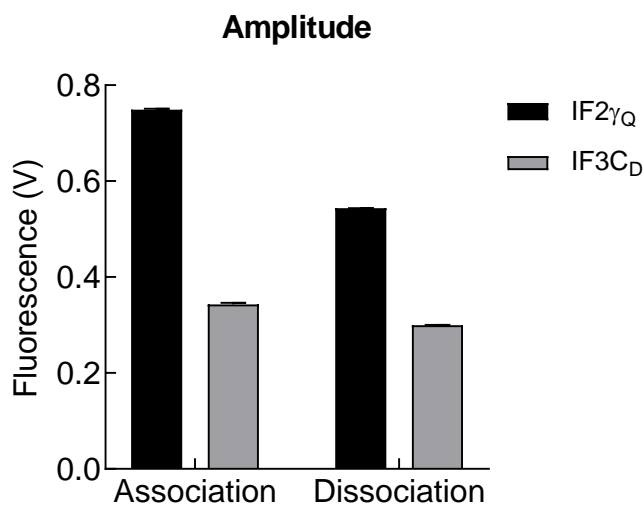


Figura 21. Comparación de amplitudes de las curvas obtenidas en la unión y disociación de IF2 γ _Q e IF3C_D con respecto al complejo 30S·IFs.

30S-IFs (IF3C_D-IF2 γ _Q) complex formation

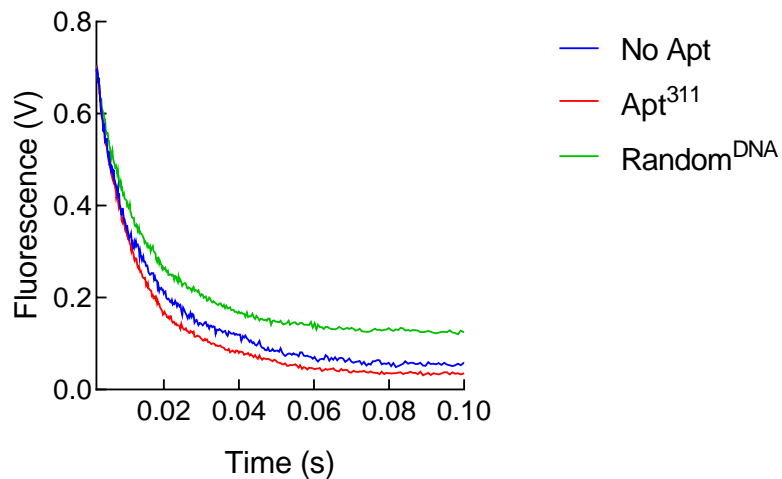


Figura 22. Llegada de IF2 al complejo 30S-IFs en función del Apt³¹¹. Señal FRET se da entre IF3C_D-IF2 γ _Q. Llegada de IF2 γ _Q al complejo 30S-IFs en ausencia de aptámero (azul), y pre-incubado con Apt³¹¹ (rojo) o una secuencia aleatoria de DNA (verde).

30S Initiation Complex (BPY-tRNAi-IF2 γ _Q) formation

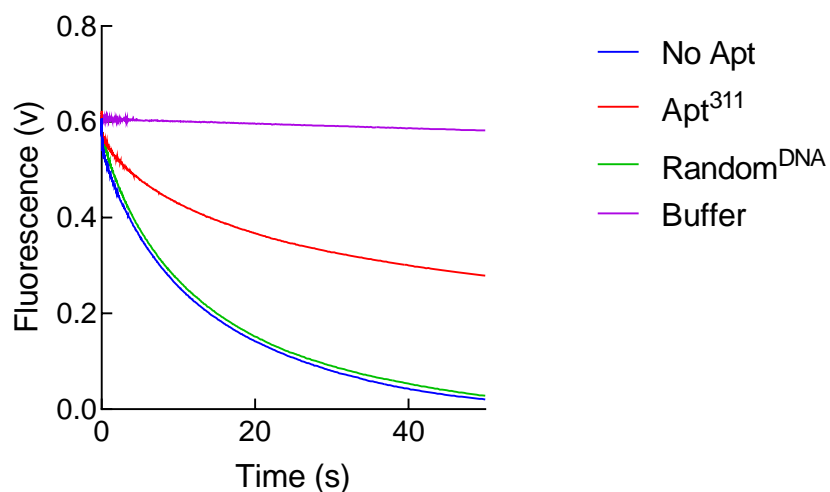


Figura 23. Llegada del tRNAi al 30SPIC en función del Apt³¹¹. Señal FRET se da entre BPY-tRNAi-IF2 γ _Q. El complejo 30S PIC se compone de la subunidad 30S, IF1, IF2 γ _Q, IF3, mRNA, sin aptámero (azul), con Apt³¹¹ (rojo), o con una secuencia aleatoria de DNA (verde). Se añadió un control de señal con buffer (violeta). Las k_{app}

en ausencia y presencia del Apt³¹¹ fueron: $k_{app} = 0.078 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app} = 0.05 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

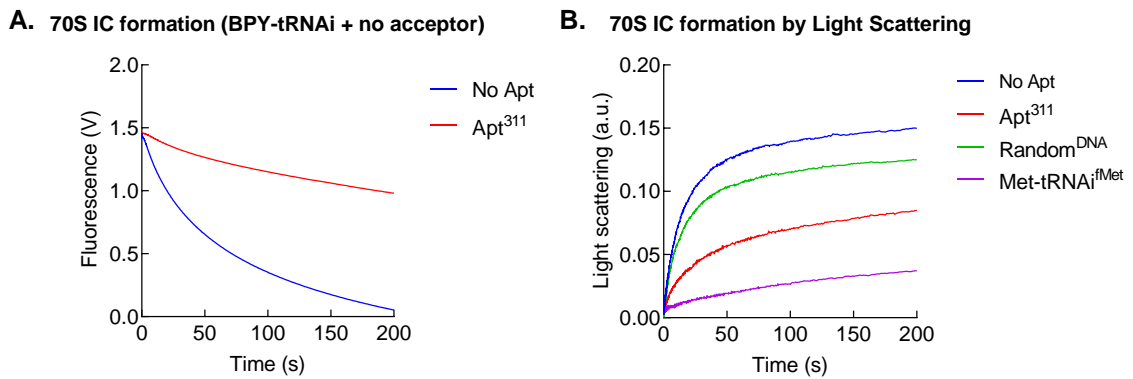


Figura 24. Llegada de tRNAi·50S al 30S PIC en función del Apt³¹¹. (A) El fluoróforo que emite la señal es BPY-tRNAi. Sin embargo, no hay par FRET debido a la ausencia de fluoróforo aceptor. La reacción sin Apt³¹¹ demuestra un comportamiento bifásico: $k_{app1} = 0.036 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app2} = 0.005 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$. La reacción en presencia de Apt³¹¹ obtiene un $k_{app} = 1.459 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$. (B) La formación del complejo de iniciación 70S se mide a través de Light Scattering. Todas las moléculas usadas carecen de fluoróforo y son wild-type. A las reacciones naturales (azul) se les añade Apt³¹¹ (rojo) o una secuencia aleatoria de DNA (verde). Adicionalmente, se agrega un control de especificidad de unión IF2-tRNAi usando tRNAi sin grupo formilo (Met-tRNAi^{fMet}) (violeta). La reacción sin Apt³¹¹ demuestra un comportamiento bifásico cuya primera mitad ocurre bastante rápido ($k_{app1} = 0.105 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$) y la segunda mitad del proceso ocurre más lento ($k_{app2} = 0.020 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$). En presencia del Apt³¹¹, el comportamiento de reacción bifásico denota que la fase rápida inicial ($k_{app1} = 0.114 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$) ocurre en una corta fracción del lapso de reacción, predominando la fase lenta ($k_{app2} = 0.012 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$).

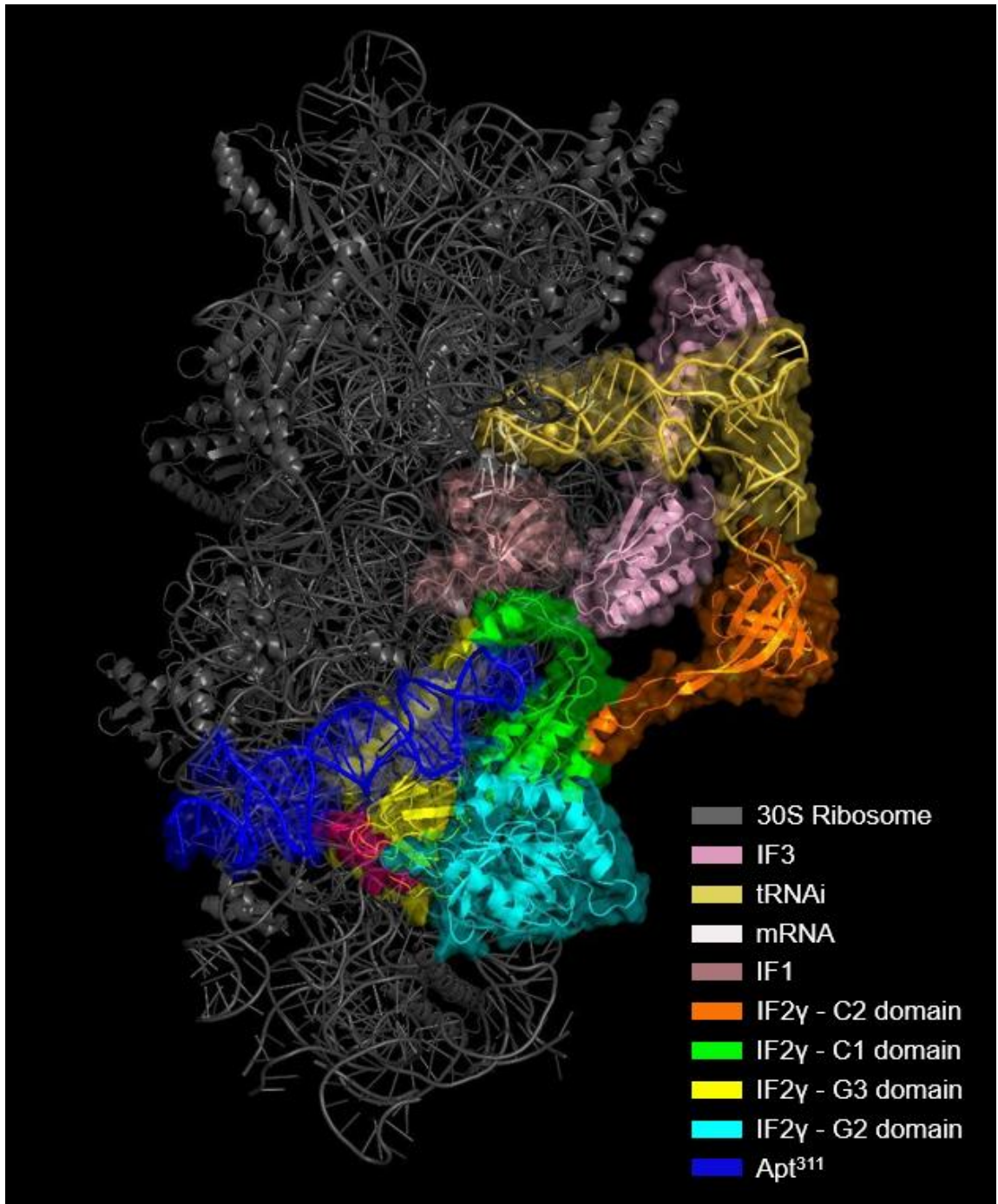


Figura 25. Alineamiento de Docking molecular de IF2 γ -Apt³¹¹ en el 30S IC.

TABLAS

Tabla 1. Ranking de puntajes del Docking molecular entre el ligando Apt³¹¹ y el receptor IF2 γ .

Rank	S	rmsd_refine
1	-156.5706	0.6142
2	-154.5377	0.6131
3	-154.2185	2.8011
4	-134.6545	1.2687
5	-134.4311	3.0767
6	-134.0339	1.5022
7	-130.2411	0.9844
8	-129.9758	1.0361
9	-124.9386	1.4457
10	-123.7679	1.9702

Nota: Cuanto menor sea la puntuación (S; Score), mayor será la afinidad de unión del compuesto al receptor. Rmsd_refine es la raíz de la desviación cuadrática media entre la pose antes del refinamiento y la pose después del refinamiento.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonia de *E. coli*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95	3 min	
Denaturación	95	30 min	25
Annealing	*	30 min	
Extensión	72	**	
Extensión final	72	5 min	

*55.4 °C y **2.35 min en caso de usar primers F_pPROEX_M13 y R_pPROEX_terminator.

59 °C y **2.06 min en caso de usar primers F_pPROEX_M13 y R_G810C.

57 °C y **1 min en caso de usar primers F_G810C y R_pPROEX_terminator.

Tabla 3. Lista de primers usados para PCR de colonia.

Primer	Secuencia
F_pPROEX_M13	5' GCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'
R_pPROEX_terminator	5' CAGTTCCCTACTCTCGCATG 3'
F_G810C	5' CGCCGAAATTTTGTGCCATCGCAGGCTGTATG 3'
R_G810C	5' CATAACAGCCTGCGATGGCACAAAATTTTCGGCG 3'

Tabla 4. Set experimental del efecto del Apt³¹¹ en la llegada del tRNAi al 30S PIC.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3_{DL} · IF2 · IF1 · mRNA · GTP	tRNAi · GTP
2	30S · IF3_{DL} · IF2 · IF1 · mRNA · GTP · Apt ³¹¹	tRNAi · GTP
3	30S · IF3_{DL} · IF2 · IF1 · mRNA · GTP · Apt ⁷¹⁵	tRNAi · GTP
4	30S · IF3_{DL} · IF2 · IF1 · mRNA · GTP · Apt ⁷²¹	tRNAi · GTP

Tabla 5. Set experimental del ensayo de caracterización de la señal FRET IF2 γ Q-IF3C_D.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	Buffer · GTP
2	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	IF2 γ_{wt} · GTP
3	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	IF2γQ · GTP
4	IF3C_D · IF1 · GTP	IF2γQ · GTP
5	30S · IF2γQ · IF1 · GTP	IF3C_D · GTP

Tabla 6. Set experimental del ensayo *chase* con respecto a IF2 γ Q e IF3C_D.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3C_D · IF2γQ · IF1 · GTP	Buffer · GTP
2	30S · IF3C_D · IF2γQ · IF1 · GTP	IF2 γ_{wt} * · GTP
3	30S · IF3C_D · IF2γQ · IF1 · GTP	IF3* · GTP

* Las concentraciones de IF2 γ_{wt} e IF3 se usaron en un exceso de 10 veces respecto de las moléculas fluorescentes usadas en la jeringa A.

Tabla 7. Set experimental de la formación del complejo 30S·IFs en función del Apt³¹¹.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	IF2γQ · GTP
2	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	IF2γQ · Apt ³¹¹ · GTP
3	30S · IF3C_D · IF1 · GTP	IF2γQ · Random ^{DNA} · GTP

Tabla 8. Set experimental de la formación del complejo 30S IC en función del Apt³¹¹.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S·IFs (IF2 γ Q) · mRNA · GTP	BPY-tRNAi · GTP
2	30S·IFs (IF2 γ Q) · mRNA · GTP · Apt ³¹¹	BPY-tRNAi · GTP
3	30S·IFs (IF2 γ Q) · mRNA · GTP · Random ^{DNA}	BPY-tRNAi · GTP
4	30S·IFs (IF2 γ Q) · mRNA · GTP · Buffer	BPY-tRNAi · GTP

Tabla 9. Set experimental de la formación del complejo 70S IC en función del Apt³¹¹.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP	BPY-tRNAi · 50S · GTP
2	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP	BPY-tRNAi · 50S · GTP

Tabla 10. Set experimental de la formación del complejo 70S IC en función del Apt³¹¹ por Light Scattering.

Reacción	Jeringa A	Jeringa B
1	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP	tRNAi · 50S · GTP
2	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP · Apt ³¹¹	tRNAi · 50S · GTP
3	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP · Random ^{DNA}	tRNAi · 50S · GTP
4	30S · IF3 · IF2 γ_{wt} · IF1 · mRNA · GTP	Met-tRNA ^{fMet} · 50S · GTP