UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE MEDICINA HUMANA

**S13 y L33 como proteínas sensoras de movimientos de las
subunidades ribosomales durante la iniciación de la síntesis
proteica en bacterias**

TESIS

Para optar el título profesional de: Médico Cirujano

AUTOR

Cuestas Quiroz, Flavia Alejandra ([0000-0003-4078-1721](#))

Sánchez Ato, Luis Andrés ([0000-0003-1512-4439](#))

ASESOR DE TESIS

Milón Mayer, Pohl Luis, PhD ([0000-0001-6679-5473](#))

Lima, 01 febrero de 2018

Financiamiento

Cofinanciado por

InnóvatePerú

PERÚ

Ministerio
de la Producción

CIENCIACTIVA

Becas y Co-financiamiento de Concytec

Queremos agradecer a José Alberto Nakamoto Kuahara, Diego André Florián Joseph, Katherin Peñaranda y Pablo David Soriano Castillo por su apoyo constante para realizar la metodología del presente trabajo.

Especialmente se agradece a InnóvatePerú, cuyo financiamiento con convenios Nro. 382-PNICP-PIBA-2014 y 297-INNOVATEPERU-EC-2016 han permitido el desarrollo de la presente tesis de investigación.

Asimismo, agradecer a nuestros padres y familiares que han impulsado nuestra carrera y el presente trabajo.

Finalmente, agradecer al Dr. Attilio Fabbretti por su colaboración intelectual y capacitación para la realización de experimentos que concluyeron el presente trabajo.

Resumen

Las proteínas ribosomales S13 y L33 pertenecen respectivamente a las subunidades 30S y 50S del ribosoma bacteriano. S13 se posiciona en cercanía a los factores de iniciación (IF1 e IF3). L33 se encuentra opuesta a S13 en la subunidad mayor. El presente estudio, busca evaluar las proteínas S13 y L33 marcadas fluorescentemente durante la iniciación de la síntesis proteica, para generar un sistema experimental que permita analizar cambios estructurales en las subunidades ribosomales, especialmente durante la iniciación de la traducción y en función de la unión de antibióticos. Mediante técnicas recombinantes y cromatografía de intercambio iónico, se expresaron y purificaron ambas proteínas ribosomales. Se obtuvieron rendimientos de la producción de proteína L33 en el rango de miligramos por g de *Escherichia coli*, e índices de pureza sobre el 98%. S13 fue producido de manera similar y se obtuvieron proteínas puras en el rango de miligramos por g de *Escherichia coli* con una pureza de 99%. Ambas proteínas ribosomales fueron modificadas con compuestos fluorescentes compatibles con mediciones de *FRET* (De sus siglas en inglés, *Föester Resonance Energy Transfer*). En condiciones controladas S13 logró insertarse en la subunidad 30S, mientras que experimentos de sedimentación indicaron que L33 fluorescente no se unía a la subunidad 50S. Se realizaron mediciones *FRET* entre la subunidad 30S modificada con S13 fluorescente y los factores de iniciación IF1 e IF3. La medición *FRET* entre S13(Atto-540Q) e IF3-CTD(Atto-488) se utilizó para medir la interacción de estreptomicina, espectinomicina y GE81112, antibióticos que se unen a la subunidad menor del ribosoma. Estreptomicina se une rápidamente a la subunidad 30S y ocasiona un acercamiento de S13(Atto-540Q) al IF3-CTD(Atto-488) mientras que GE81112, y en menor medida espectinomicina, promueven un alejamiento de la proteína ribosomal del factor de iniciación. Ambos movimientos son compatibles con rotaciones de la cabeza de la subunidad 30S, previamente descritos como fundamentales para el funcionamiento del ribosoma. El presente estudio de investigación brinda un sistema experimental novedoso para estudiar cambios estructurales en la subunidad menor en función de la unión de antibióticos al ribosoma.

Palabras claves: Proteínas ribosomales, antibióticos, síntesis de proteínas, *FRET*

Abstract

The ribosomal proteins S13 and L33 belong respectively to the 30S and 50S subunits of the bacterial ribosome. S13 is positioned close to the initiation factors (IF1 and IF3). L33 is opposite and near to S13 in the major subunit. The present study, the aim is to evaluate the fluorescently labeled S13 and L33 proteins during the initiation of protein synthesis, aiming to build an experimental system that allows the analysis of structural changes in the ribosomal subunits, especially during the initiation of translation and with the binding of antibiotics. Using recombinant techniques and ion exchange chromatography, both ribosomal proteins were expressed and purified. Production yields of pure proteins of L33 were obtained in the range of milligrams per g of *Escherichia coli*, in addition, of 98% purity indices. S13 was produced in a similar manner, obtaining milligrams of pure protein per g of *Escherichia coli* with a purity of 99%. Both ribosomal proteins were modified with fluorescent compounds compatible with measurements of FRET (Föester Resonance Energy Transfer). Under controlled conditions S13 was able to insert into the 30S subunit, while sedimentation experiments indicated that fluorescent L33 did not bind to the 50S subunit. The 30S subunit modified with fluorescent S13 showed various FRET signals in combination with the initiation factors IF1 and IF3. These signals were used to measure the interaction of streptomycin, spectinomycin and GE81112, antibiotics that bind to the minor subunit of the ribosome. Streptomycin binds rapidly to the 30S subunit and causes an approximation of S13(Atto-540Q) to IF3-CTD(Atto-488) while GE81112, and to a lesser extent spectinomycin, promote a distancing of the ribosomal protein from the initiation factor. Both movements can account for rotations of the head of the 30S subunit, previously described as fundamental for the functioning of the ribosome. The present research provides a novel approach to study structural changes in the minor subunit according to the binding of antibiotics to the ribosome.

MeSH: Ribosomal proteins, antibiotics, protein synthesis, FRET

Tabla de contenido

Introducción	10
Objetivos	14
Objetivo general:.....	14
Objetivos específicos:	14
Capítulo 1: Materiales y Métodos.....	15
Cultivo.....	15
Amplificación de los genes <i>rpmG</i> (L33) o <i>rpsM</i> (S13) contenidos en los plásmidos pET-24a (+) Kan R	15
Cuantificación de los productos de <i>PCR</i> y plásmidos	16
Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21	16
Expresión de proteínas.....	17
Purificación de proteínas.....	18
Modificación fluorescente de las proteínas ribosomales L33 y S13.....	19
Intercambio de proteínas ribosomales	19
Proteínas ribosomales marcadas fluorescentemente y medición mediante <i>FRET</i> en complejos 30S	20
Capítulo 2: Resultados	21
Verificación de los plásmidos pET-24a (+) Kan R que contienen los genes <i>rpsM</i> y <i>rpmG</i>	21
Expresión recombinante de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG y comprobación de su solubilidad.....	22
Purificación de S13 (<i>wt</i>) y C114 con Cromatografía de intercambio iónico.....	23
Purificación de L33 (<i>wt</i>) y C30 con Cromatografía de intercambio iónico y filtro de centrifugación Ultracel-10k de Amikon Ultra-4.....	24
Modificación de la subunidad ribosomal 30S con la proteína fluorescente S13	26
Mediciones de <i>FRET</i> entre el complejo 30S-S13(Atto-540Q) con factores de iniciación fluorescentes y cambios ocasionados por antibióticos.....	26
Capítulo 3: Discusión.....	28
Capítulo 4: Conclusiones	31
Lugar de estudio.....	32
Tiempo de estudio.....	33

Recolección y análisis de datos.....	34
Ética	35
Limitaciones.....	36
Conflicto de intereses.....	37
Referencias bibliográficas.....	38
Abreviaciones	42
Anexos	44

Índice de Tablas

Tabla N° 1: Representación del índice de pureza (IP) de las proteínas ribosomales S13 y L33 .. 55

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama de transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21 kanamicina sensible mediante el protocolo Mix & Go Zymo™	44
Figura 2: Los genes <i>rpsM</i> y <i>rpmG</i> contenidos en el plásmido pET-24a (+) Kan R, son correctamente amplificados	45
Figura 3: Expresión recombinante de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG..	46
Figura 4: Producción a gran escala de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG.	47
Figura 5: Las proteínas S13 (<i>wt</i>) y L33 (<i>wt</i>) son ambas hidro-solubles observadas con la técnica de sedimentación diferenciada.....	48
Figura 6: Purificación de S13 (<i>wt</i>) con Cromatografía de intercambio catiónico SP-HiTraP (<i>Pharmacia, Sweden</i>).....	49
Figura 7: Purificación de L33 (<i>wt</i>) con Cromatografía de intercambio catiónico SP-HiTraP (<i>Pharmacia, Sweden</i>).....	50
Figura 8: Purificación de L33 (<i>wt</i>) con Filtro de centrifugación Ultracel-10k (Merck Millipore, <i>Germany</i>)	51
Figura 9: Esquema representativo de un protocolo de dos días para conseguir de forma ultra-pura las proteínas ribosomales S13 y L33	52
Figura 10: Intercambio de la proteína S13 <i>wt</i> por S13(Atto-540Q) en la subunidad 30S	53
Figura 11: Unión de los factores de iniciación IF1 e IF3 a 30S modificados con S13(Atto-540Q)	54

Introducción

La traducción o síntesis de las proteínas requiere de un conjunto de complejos supra macromoleculares como ribosomas y enzimas actuando en sintonía en el mismo momento (1). El conocimiento sobre estos eventos celulares ha avanzado ampliamente en las últimas décadas, permitiendo a su vez comprender el funcionamiento de fármacos que actúan en ellos. Es así que muchos de los antibióticos usados en la actualidad, debido a su especificidad, actúan sobre los ribosomas de las bacterias alterando la función de estos en diversas formas, inhibiendo así la replicación bacteriana más no la del organismo hospedero (1).

El ribosoma está constituido por dos subunidades, una mayor (50S) y otra menor (30S), las cuales se encuentran formadas por proteínas y ARNs ribosomales (*rARNs*, por sus siglas en inglés); estas proteínas que conforman las subunidades ribosomales, si bien ampliamente estudiadas, son un campo que aún requiere investigación (1,2). Su relación dinámica en función de la regulación de la expresión genética es aún poco entendida (3). La fase de traducción de proteínas consta de cuatro etapas; las cuales son iniciación, elongación, terminación y reciclaje (4). La iniciación es la etapa con más mecanismos de control, consiste en la unión del ARNm junto con los factores de iniciación IF1, IF2, IF3 y GTP (1,4). Las interacciones de los factores de iniciación con la subunidad menor ribosomal promueven el posicionamiento del ARNt de iniciación en el ARNm y la determinación del marco de lectura del mismo (3,5,6). Si bien la síntesis de proteínas es conservada en todas las células, el paso de la iniciación es el que más difiere entre células eucariotas y procariotas (1,4). Posteriormente, se une la subunidad mayor 50S formando el complejo de iniciación 70S donde se produce la lectura codón a codón del ARNm realizada por los ARNt de elongación, los cuales generan la formación pre-codificada de cadenas peptídicas (1,7). Luego, en la translocación, se produce el movimiento del ARNt y ARNm a través de los tres diferentes sitios de unión del ribosoma (aminoacilo, peptidilo, *exit* o de salida) (1). Después, ocurre la fase de terminación por la cual al darse la lectura del codón de parada se libera la proteína formada (1). Finalmente, en la fase de reciclaje, las subunidades ribosomales se disocian y el ARNm es liberado (4).

Con el fin de satisfacer las necesidades bacterianas en la replicación celular, la síntesis de proteínas tiene que ser eficiente y eficaz (7). Por ello, tanto a nivel celular como ribosomal se han generado diversos mecanismos de control para evitar errores en la expresión genética, dentro de los cuales se tiene: El control cinético de la iniciación durante la traducción, *no-go decay*, *nonstop decay* de control del ARNm y de ubiquitinización, mediante los cuales las proteínas chaperonas y las proteasas pueden reparar o degradar una proteína mal plegada (8–11). Si estos sistemas de control fallan, la célula puede sufrir daños irreparables que conducirían a su muerte o mal funcionamiento; por ello, alteraciones genéticas en estas vías de control son la etiología de múltiples enfermedades hereditarias (12).

Las proteínas ribosomales S13 y L33 pertenecen a las subunidades 30S y 50S respectivamente; ambas en conjunto con otras proteínas ribosomales hacen puentes inter-subunidades por lo que intervienen en el proceso de translocación (13). La proteína ribosomal S13 tiene un peso molecular de 13.1 kD, esta forma un complejo con la proteína S19 para unirse de forma sitio específica al ARNr 16S; así mismo se ha visto que genera un *crosslink* con los factores de iniciación IF2 e IF3 (14–16). Por otro lado, la proteína ribosomal L33 tiene un peso molecular de 6.4 kD, siendo esta de mucho menor tamaño en comparación con S13 (15). Esta última forma un *crosslink* con el ARNr 23S y con el sitio P del ARNt (16–19). L33 puede ser intercambiable en los ribosomas de células intactas permitiendo su reparación (20). Es importante resaltar que el posicionamiento estructural de S13 y L33 permite analizar cambios estructurales del ribosoma entre ambas subunidades (21). Estudios del ribosoma y de sus proteínas son de importancia clínica, ya que han generado que los tratamientos con antibióticos sean más específicos, mediante el conocimiento de los mecanismos de acción de estos y resistencia antibiótica (22,23).

En la actualidad la industria farmacéutica ha cesado la mayoría de estudios para generar nuevos antibióticos debido a los altos costos que esto supone, la velocidad con la que bacterias adquieren resistencias a nuevos fármacos, y las regulaciones de la FDA (*Food and Drug Administration*) de no aprobar fármacos con propiedades terapéuticas inferiores a los ya conocidos (24). Por ello, el estudio de las proteínas S13 y L33 como de otras proteínas ribosomales que faciliten el desarrollo de nuevos fármacos antibióticos es relevante.

Debido a la problemática mundial en relación con la resistencia antibiótica, hasta el año pasado según la OMS (Organización Mundial de la Salud) existían un total de 42 potenciales antibióticos en estudios clínicos (25). Se espera utilizar estos como tratamiento para infecciones críticas como

son las asociadas a bacterias resistentes a carbapenémicos por *Pseudomona Aeruginosa*, *Acinetobacter Baumannii* y Enterobacterias (25). Además, otra área que requiere mayor investigación es el tratamiento de tuberculosis resistente, cuyo porcentaje de cura es bajo bordeando globalmente el 50% y para la cual solo hay 7 antibióticos en estudios clínicos actualmente (25). Sin embargo, el desarrollo de estos toma varios años y es altamente costoso por lo que los avances son insuficientes para la creciente resistencia bacteriana (25). Por ello, el contar con herramientas que ayuden a facilitar este proceso es relevante, como el uso de proteínas ribosomales fluorescentes.

Se presume que el mecanismo de acción de muchos antibióticos promueve cambios estructurales del ribosoma, lo cual lleva a una disminución de la funcionabilidad del mismo, finalmente inhibiendo la proliferación bacteriana. Entre ellos destacan algunos de nueva generación como el antibiótico GE81112, y algunos aminoglucósidos. GE81112 actúa sobre la subunidad ribosomal 30S al inhibir de forma específica la traducción durante la iniciación de la síntesis de proteínas (26). GE81112 inhibe selectivamente el sitio de unión P del ARNt, evitando que se produzca una adecuada decodificación del anticodón (27). Se ha observado que este antibiótico permite la formación del complejo de preiniciación, aunque con una estructura inadecuada puesto que aparentemente el IF3 se une más fuertemente y la velocidad de formación del 70S disminuye (26). Por otro lado, el antibiótico estreptomicina a nivel molecular se une firmemente a la proteína ribosomal S12 de la subunidad 30S y al ARN 16s impidiendo el adecuado ensamblaje del ARNt con lo que se interrumpe el paso de la translocación a la elongación; además de causar una decodificación errónea (28,29). Entre los aminoglucósidos destaca también la espectinomicina que actúa inhibiendo la translocación. El mecanismo de acción de este antibiótico es que, al unirse al cuello del 30S, reduce el movimiento de la translocación del ARNt del sitio A al sitio P (30). Los tres antibióticos mencionados, si bien interfieren mediante distintos mecanismos en la síntesis de proteínas, tienen en común que se unen a la subunidad menor 30S por lo que su uso contribuye con el análisis del presente sistema experimental.

En este estudio, se busca producir cada subunidad del ribosoma modificada con una variante fluorescente de una de sus proteínas. Como ya se ha observado anteriormente, al reintegrar proteínas ribosomales a sus respectivas subunidades la funcionabilidad de estas no se altera (31). Esto último, hace viable su uso para poder implementar este nuevo sistema experimental, que incluye proteínas ribosomales fluorescentes de cada subunidad. De esta manera, se busca obtener

una herramienta sensible para evidenciar cambios estructurales ante diversos estímulos, como la presencia de los antibióticos antes mencionados.

El sistema experimental basado en proteínas fluorescentes específicamente insertadas en cada subunidad podría a su vez ser utilizado en combinación con otros factores modificados fluorescentemente. Mediciones de *FRET* entre la proteína S13 y factores de iniciación podrían evidenciar cambios estructurales de la subunidad menor 30S en función de la unión de los inhibidores del ribosoma arriba mencionados o potenciales nuevos antibióticos que actúen a este nivel. Dichos experimentos contribuirían a mejorar nuestro entendimiento sobre el mecanismo de acción y resistencia de estos antibióticos durante la inhibición de la síntesis de proteínas.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar S13 y L33 como proteínas sensoras de movimientos de las subunidades ribosomales durante la iniciación de la síntesis proteica en bacterias.

Objetivos específicos:

1. Verificar que los plásmidos pET-24a contengan los genes codificantes *rpmG* y *rpsM*, de las proteínas ribosomales L33 y S13 respectivamente.
2. Expresar y purificar las proteínas ribosomales S13 y L33.
3. Marcar con fluoróforos las proteínas ribosomales S13 y L33 e insertarlas en las subunidades ribosomales.
4. Medir la interacción de los antibióticos estreptomicina, espectinomicina y GE81112 con la subunidad menor 30S.

Capítulo 1: Materiales y Métodos

Cultivo

La eficiente reproducción celular del bacilo *Escherichia coli* hace que sea fácilmente reproducible en el laboratorio. Además de requerir medidas de bioseguridad bajas (nivel I), por lo que se usó en el presente trabajo como organismo de expresión para la síntesis de proteínas. La cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3), sensible a kanamicina, fue obtenida de la empresa Promega (USA), esta deriva de B834 (32). Se cultivó en medio líquido de Luria-Bertani (LB), que contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl, pH 7.5, o en placas suplementadas con medio *Super Optimal broth with Catabolic repressor* (SOC), que contiene 20g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 4,8 g/L de MgSO₄, 3,603 g/L de dextrosa, 0,5 g/L de NaCl y 0,186 g/L de KCl. Las *Escherichia coli* BL21 (DE3), pueden ser usadas con vectores de expresión proteica que están bajo control del promotor T7, como son los que contienen los vectores pET. Las cepas de *Escherichia coli* transformadas con el plásmido pET-24a (+) Kan R, con el gen *rpmG* (L33) o *rpsM* (S13), se pudieron seleccionar al cultivarse en placas de SOC suplementada con 30 µg/mL de kanamicina (32).

Amplificación de los genes *rpmG* (L33) o *rpsM* (S13) contenidos en los plásmidos pET-24a (+) Kan R

La presencia de los genes codificantes *rpmG* y *rpsM* contenidos en los plásmidos pET-24a (+) Kan R, Kanamicina resistente (Stratagene, USA), fueron confirmados mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La PCR se realizó con el *MasterMix Thermo Scientific*, (contiene Taq ADN polimerasa, *Buffer* para la reacción, 4mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP). La mezcla de la reacción se realizó a un volumen final de 50 µL. Las condiciones del termociclador fueron adaptadas de la siguiente manera: pre-desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de 25 ciclos compuestos de desnaturalización de 1 min a 95°C, anillamiento durante 1 min a 49.1°C, elongación durante 30 segundos a 72°C, finalmente una elongación de 10 min a 72°C. La amplificación fue

realizada utilizando un termociclador de gradiente (Thecno PrimeG, China). La presencia y el tamaño del producto amplificado fueron analizados mediante electroforesis al 2% de Agarosa (Cleaver, USA) en 1x Tris-ácido acético-EDTA (TAE), el ADN en el gel fue visualizado con *SafeRun* (Cleaver, USA), una tinción alternativa no tóxica al bromuro de etidio. Las bandas fueron visualizadas con ayuda de un sistema documentador de geles Cleaver (USA) bajo irradiación UV (Ultravioleta) a 254 nm de longitud de onda.

Finalmente, los productos amplificados fueron purificados con el kit comercial “*PCR Purification Kit*” (Zymo, USA). Los fragmentos purificados fueron secuenciados por el servicio de *MacroGen-Korea*.

Cuantificación de los productos de *PCR* y plásmidos

Se realizó la cuantificación de las muestras de ADN (Ácido desoxirribonucleico) con el kit “*Quant-iTTM dsDNA Assay Kit*”, *Broad Range*, de Invitrogen usando el espectrofotómetro de fluorescencia Nanodrop 3300, para lo cual primero se realizó una curva de estándares y luego se procedió a medir cada muestra. Los datos obtenidos se tabularon en Microsoft Excel 365.

Transformación de *Escherichia coli* BL21

Las *Escherichia coli* BL21 (DE3), se transformaron con los plásmidos pET-24a (+) Kan R que contenían los genes *gen rpmG* (L33) o *rpsM* (S13). Además, estos últimos tenían su variante que le conferían una cisteína en la posición 30 y 114 respectivamente. Se realizó la preparación de células competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3), para ello, se usó 0.5 mL de un cultivo de la misma en medio LB, el cual se inoculó en 50 mL de *ZymoBrothTM* (*Zymo Research, USA*) este se agitó a 150 RPM a 26°C hasta que alcanzaron un OD_{600nm} 0.4 a 0.6. Este cultivo se transfirió al hielo (4°C), se sometió a 3000 RPM por 10 minutos a 4°C obteniendo un *pellet*, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de 1X *Wash Buffer* (*Zymo Research, USA*) a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de 1X *Competent Buffer* (*Zymo Research, USA*) a 4°C.

Se preparó medio SOC (20g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 4,8 g/L de MgSO₄, 3,603 g/L de dextrosa, 0,5 g/L de NaCl y 0,186 g/L de KCl), el cual se conservó a temperatura ambiente.

Se precalentó por 1 hora a 37°C la placa con medio SOB (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 4,8 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L de NaCl y 0,186 g/L de KCl) con 30 µL/mL de kanamicina. Posteriormente, se añadió el plásmido pET-24a(+) Kan R conteniendo las secuencias de los genes de interés, a una concentración de 0,1 µg/µL. 100 ng de plásmido se agregaron a 50 µL de células competentes obtenidas del protocolo *Mix & Go* (*Escherichia coli* kanamicina sensible). Esto se incubó a 4°C por 10 minutos; luego, se añadió 200 µL de medio SOC (a temperatura ambiente) y se cultivó a 300 RPM por 1 hora a 37°C. Finalmente, se colocó 200 µL en la placa con medio SOB con 30 µL/mL de kanamicina y se incubó por 12 horas a 37°C. De las colonias cultivadas en la placa se eligió una colonia única que se colocó en matraz auto-clavado con medio LB, y se incubó con agitación a 120 RPM a 37°C por 12 horas (**Figura 1**).

Expresión de proteínas

Los vectores de expresión obtenidos contienen la mutación puntual, que les confieren una cisteína en la posición 30 y 114, en los genes *rpmG* (L33) y *rpsM* (S13) respectivamente. Se indujo la producción de las proteínas ribosomales S13 y L33, para ello se utilizó el sistema LacZ e inducción por Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Se realizó un cultivo de 12 horas en 30 mL de un medio LB con 30 µg/mL de kanamicina, obtenido de una colonia aislada de cada cepa de *Escherichia coli* transformada con el plásmido. Se procedió a medir la absorbancia con un espectrofotómetro para determinar la densidad de células en el cultivo líquido. Luego, se subcultivó, para lo cual se colocó 8.5 mL de este cultivo con OD₆₀₀ 3.0 en 500 mL de un medio LB con 30 µg/mL de kanamicina para tener una densidad óptica inicial de OD₆₀₀ 0.05 y se incubó a 120 RPM a 37°C por 3 horas. La inducción se realizó luego de este tiempo, puesto que los subcultivos alcanzaron aproximadamente OD₆₀₀ 0.5, se agregó IPTG a una concentración de 1 mM, posteriormente se siguió la inducción proteica hasta por 4 horas.

Para comprobar la inducción se realizaron geles de poliacrilamida al 16% teñidos con azul de Commassie, visualizados con luz blanca y capturados con una cámara fotográfica. Posteriormente, el cultivo bacteriano fue centrifugado en una temperatura de 4°C, a 10,000 RPM durante 3 minutos. Los precipitados bacterianos fueron lavados con diversas soluciones, dentro de las cuales tenemos: 50 mM HEPES-NaOH pH: 7 (Merck, Germany), 100 mM de NaCl (Merck, Germany), glicerol al 10% (Merck, Germany) y 6 mM de 2-Mercaptoetanol (Merck, Germany).

Finalmente, las bacterias fueron lisadas con ayuda de *BugBuster Protein Extraction Reagent*, Novagen, *Germany* (*BugBuster MasterMix*), para ello se usó un volumen de 5 mL de *BugBuster MasterMix* por cada 1 g de muestra, se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos y luego se centrifugó a 10 000 RPM por 30 minutos a 4°C. Luego, tanto las paredes celulares como las membranas fueron descartadas por centrifugación y los lisados citosólicos se separaron mediante cromatografía de alta performance (*HPLC*) con la utilización de columnas y resinas adecuadas (Filtro de centrifugación Ultracel-10k, Merck Millipore, *Germany*).

Las proteínas ribosomales se analizaron mediante electroforesis *SDS-PAGE* y tinción con azul de Commassie (ver abajo). Con el fin de comprobar la solubilidad de las proteínas expresadas, se centrifugaron muestras de lisado celular a 10 000 RPM por 30 minutos a 4°C. Se obtuvieron dos fracciones, una inferior (membranas) y un sobrenadante (lisado). Ambas fracciones se analizaron en un gel de poliacrilamida al 16%. Los geles fueron teñidos con azul de Commassie y visualizados con luz blanca y capturados con una cámara fotográfica.

Purificación de proteínas

Para realizar la purificación de las proteínas ribosomales S13 y L33 se utilizó cromatografía por intercambio iónico usando columnas SP-HiTraP (*Pharmacia, Sweden*) en un sistema *HPLC* de marca Jasco (*Japan*) con lectores de absorbancia y fluorescencia. Tras hallar que las proteínas S13 y L33 son solubles en *BugBuster Protein Extraction Reagent*, Novagen (*BugBuster MasterMix*), se procedió a cargar el lisado en la columna SP-HiTraP de 1 mL. Luego, se sometió la misma a un gradiente de sal (NH_4Cl). Para ello, se usaron dos *Buffers*, el primero contenía 50 mM de *HEPES Buffer*, glicerol al 5%, 6 mM de 2-Mercaptoetanol (Merck, *Germany*); el segundo contenía 50 mM de *HEPES Buffer*, glicerol al 5%, 6mM de 2-Mercaptoetanol (Merck, *Germany*) y 1,5 M de NH_4Cl . El pH de los *Buffers* variaba si contenía o no 2 M de urea (si no contenía urea el pH era de 8, y cuando contenía urea el pH era de 7). Todo lo cargado a la columna fue recolectado en tubos *Eppendorf*, en fracciones de 500 μL .

Para verificar la presencia de la proteína purificada se utilizó un gel de poliacrilamida al 16%. Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados con luz blanca y capturados con una cámara fotográfica. Ante la presencia de algunos contaminantes en las fracciones, se procedió a utilizar filtros de centrifugación Ultracel-10k (Merck Millipore, *Germany*), se centrifugó a 7500

G por 30 minutos. Para verificar la presencia de la proteína purificada, luego del proceso de filtrado, se utilizó nuevamente un gel de poliacrilamida al 16%. Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados con luz blanca y capturados con una cámara fotográfica. Se realizó una curva de estándares (0.1 a 1 ng/ μ L) para cuantificar las muestras con *Quanti-iT DS protein BR* (Invitrogen) y se midió fluorescencia con Nanodrop 3300 mediante el espectrofotómetro.

Modificación fluorescente de las proteínas ribosomales L33 y S13

Las proteínas S13 C114 y L33 C30 se sometieron a diálisis extensa en el *Buffer* de marcado (*HEPES Buffer* 50 mM pH: 7,1, NH_4Cl 100 mM, glicerol al 10%, *TCEP* 0,5 mM y 2 M de urea) en un *D-Tube™ Dialyzer Maxi* (Merck) para eliminar trazas de 2-mercaptoetanol, puesto que como agente reductor este inhibe fuertemente el acoplamiento de puentes de maleimida a cisteínas. Además, la urea sirve para desnaturalizar las proteínas S13 y L33 que da como resultado la exposición de la cisteína ya que de lo contrario estas estarían ocultas (28,33). Se incubaron, en un exceso de 10 veces 540Q-maleimido (Atto-Tec) sobre S13 C114 y L33 C30 en *Buffer* de marcado durante 20 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 6 mM de 2-mercaptoetanol. El S13(Atto-540Q) y L33(Atto-540Q) se purificaron en una columna HiTrap SP HP (Merck, *Germany*) como arriba mencionado. Las proteínas se dializaron en tampón de almacenamiento (*HEPES* pH: 7,1, NH_4Cl 100 mM, glicerol al 10%, 6 mM de 2 - mercaptoetanol) y se almacenaron en alícuotas pequeñas a -80°C .

Intercambio de proteínas ribosomales

Con el fin de realizar el intercambio de la proteína ribosomal S13 en la subunidad menor (30S) del ribosoma por una proteína ribosomal S13(Atto-540Q), modificada fluorescentemente en C114 con el fluoróforo 540Q (Atto-Tec, *Germany*), se realizaron experimentos que ayudaron a determinar las condiciones ideales de intercambio. Entre las condiciones se probaron diversas concentraciones de cloruro de amonio, diferentes titulaciones de S13(Atto-540Q), y a diferentes temperaturas de incubación (47°C o 26°C).

Para realizar el intercambio se mezcló 720 pmol de 30S, proporcionado por Attilio Fabbretti PhD de la *Università di Camerino* (Italia), 3600 pmol de S13(Atto-540Q) y 0.5 μL de inhibidor de

ARNasa (Merck, *Germany*) en 1 mL de *Buffer* (20 mM de Tris HCl pH 7.7, 400 mM de NH₄Cl, 20 mM de MgOAc y 6 mM de 2-Mercaptoetanol (Merck, *Germany*)). Se incubó por 1 hora a 47°C, para luego poner la mezcla a 4°C. Después de añadir 1 mL de etanol 99.98 % (-20°C) se centrifugó a 15 000 RPM por 15 minutos a 4°C. Se esperó la evaporación del etanol a 26°C, obteniendo un *pellet* que fue resuspendido en *Stopped Flow Buffer* (10 mM de Tris HCl pH 7.7, 70 mM de NH₄Cl, 10 mM de MgOAc y 30 mM de KCl de la marca Merck, *Germany*). Se realizaron las mismas condiciones para introducir L33(Atto-540Q) a la subunidad 50S.

Proteínas ribosomales marcadas fluorescentemente y medición mediante *FRET* en complejos 30S

Luego de realizar el intercambio de proteínas ribosomales se utilizó la técnica *FRET* (*Föester Resonance Energy Transfer*) para medir las variaciones de fluorescencia de dichas proteínas. Se realizó este experimento en diferentes condiciones, incluyendo los factores de iniciación IF1 e IF3 (proporcionados por el laboratorio de Bioquímica y Biofísica Aplicada, UPC) y tres antibióticos (estreptomicina, espectinomicina y GE81112). Las reacciones en instrumento *Stopped-Flow SF-300x* (*Kintek Corporation, USA*), siendo replicadas en cada experimento 8 veces. Los *Buffer* utilizados consistieron en *Buffer A* (20 mM de Tris-HCl pH 7.7, 400 mM de NH₄Cl, 20 mM de MgOAc y 6 mM de B-mercaptoetanol) y en *Buffer de Stopped Flow* (10 mM de Tris-HCl pH 7.7, 70 mM de NH₄Cl, 10 mM de MgOAc y 30 mM de KCl (Merck, *Germany*)).

Capítulo 2: Resultados

Verificación de los plásmidos pET-24a (+) Kan R que contienen los genes *rpsM* y *rpmG*

Para proceder a realizar la transformación de las *Escherichia coli* BL21 con los plásmidos pET-24a (+) Kan R, primero se debía verificar que estos contuvieran los genes que codificarían las proteínas de interés para el estudio y asegurar que las bacterias puedan sintetizar las proteínas S13 y L33. Los plásmidos pET-24a (+) Kan R contenían los genes *rpsM* y *rpmG*, que habían sido clonados por de Stratagene (USA), los cuales codifican las proteínas S13 y L33. Los genes tenían dos variantes, el gen *rpsM* tenía su variante *wt* y C114, la cual codificaría las proteínas S13 *wt* y S13 C114 respectivamente. En similitud, las variantes del gen *rpmG* fueron *wt* y C30, los cuales codificarían las proteínas L33 *wt* y L33 C30 correspondientemente. Por ello, finalmente se contaba con cuatro plásmidos pET24a (+) Kan R.

Con el fin de comprobar que cada uno de los plásmidos contenía el gen de interés, se realizó la amplificación por *PCR* de cada uno de los genes. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de Agarosa al 2%, el resultado de amplificar el gen *rpsM*, con sus 2 variantes, muestra 357 pares de bases, mientras que para las dos variantes del gen *rpmG* se obtuvo 168 pares de bases (**Figura 2A**). Para constatar que las amplificaciones realizadas por *PCR* no sean contaminantes, se ejecutó una amplificación por *PCR* del kit *MasterMix Thermo Scientific*; sin la obtención de ningún producto de amplificación (**Figura 2A**). Con los resultados obtenidos se confirmó que cada uno de los plásmidos contenía los genes de interés, ya que el gen *rpsM* contiene efectivamente 357 pares de bases y el gen *rpmG* 168 pares de bases (34).

Finalmente, para verificar los productos de la amplificación obtenidos por *PCR*, se realizó una cuantificación de estos. Para ese fin, se obtuvo una curva de estándares en el *Nanodrop 3300* con 5 puntos R^2 de 0,98 (**Figura 2B**). Posteriormente, se realizó la cuantificación de los productos amplificados en *Nanodrop 3300*, resultando: 26 ng/ μ L de concentración del gen *rpsM* C114, para el gen *rpsM* se obtuvo una concentración de 32 ng/ μ L, para la amplificación del gen *rpmG* C30 se obtuvo una concentración de 20 ng/ μ L y, por último, para la amplificación de *rpmG* (*wt*) se obtuvo

una concentración de 18 ng/μL (**Figura 2C**). Este resultado corrobora que se amplificaron correctamente los genes de interés de cada plásmido.

Expresión recombinante de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG y comprobación de su solubilidad

Luego de la transformación de las *Escherichia coli* BL21 con los respectivos plásmidos pET-24a (+) Kan R, se indujo con IPTG a los bacilos transformados para expresar las proteínas S13 y L33 con sus variantes correspondientes. Las *Escherichia coli* BL21 deben ser inducidas cuando haya una velocidad de crecimiento significativa, además, cuando contengan una gran cantidad de nutrientes y ribosomas para resultar en una importante producción de proteínas, por lo que se induce a un OD₆₀₀ de 0.5 aproximadamente (35).

Las bacterias transformadas, fueron cultivadas desde un OD₆₀₀ 0.1 hasta alcanzar un OD₆₀₀ de 0.5 aproximadamente, momento en el que fueron inducidas. Posteriormente, se hizo el monitoreo horario hasta las 4 horas luego de haber realizado la inducción proteica. Para comprobar la presencia de la proteína en las células se realizaron geles de Acrilamida al 16%. En las *Escherichia coli* BL21 que contenían el gen *rpsM* con sus variantes *wt* y C114 se visualiza una pequeña cantidad de la proteína ribosomal S13 previo a la inducción y una cantidad de proteína notable en las siguientes 4 horas posterior a esta (**Figura 3A**). En contraposición, las *Escherichia coli* BL21 que contenían el gen *rpmG* con sus respectivas variantes *wt* y C30, antes de la inducción proteica no había presencia de la proteína en estudio, pero luego de la inducción y en el control de 4 horas posterior a esta sí se observó la presencia de la proteína (**Figura 3C**). Como resultado se obtuvo una cantidad considerable de producción de las proteínas de interés, tanto para S13 como para L33, con pesos moleculares de 13.1 kDa y 6.4 kDa respectivamente luego de la inducción proteica.

Esta primera inducción de proteínas se realizó con el fin de optimizar la producción proteica, por ello se monitorizó el crecimiento celular hasta por 4 horas después de la inducción proteica. Para ambas proteínas de interés, S13 y L33, con sus variantes se observó un crecimiento celular importante hasta la segunda hora posterior a la inducción proteica (**Figuras 3B y 3D**). Al observar las curvas de crecimiento celular de las bacterias transformadas e inducidas, la producción de

proteínas no causó toxicidad celular aparente durante las primeras horas de inducción, llegando a una biomasa considerable durante las primeras 2 horas tras la inducción proteica.

Luego de obtener los parámetros para la inducción de proteínas se realizó la expresión preparativa, es decir la inducción de las proteínas a mayor escala. Se realizaron los mismos pasos anteriormente mencionados, obteniendo de igual manera una gran cantidad de las proteínas de interés (**Figuras 4A y 4C**). Durante esta, tampoco se observó toxicidad celular aparente (**Figura 4B y 4D**). El 67% de las proteínas que se sintetizan en *Escherichia coli* BL21 pET-24a (+) Kan R que contienen el gen *rpsM* son proteínas ribosomales S13 y en las *Escherichia coli* BL21 pET-24a (+) Kan R que contienen el gen *rpmG* el 44% de las proteínas que se sintetizan son L33.

Después de la inducción de las proteínas S13 y L33 se procedió a comprobar su solubilidad. Para realizar la purificación proteica se requirió comprobar que las proteínas de interés se encontraban en estado hidrosoluble y no en las membranas bacterianas, ya que serían purificadas por la técnica de intercambio catiónico. Esto se realizó mediante sedimentación diferencial y fue visualizado en un gel de Acrilamida al 16%. Luego de la lisis celular de los bacilos, previamente transformados e inducidos, usando el *kit BugBuster Protein Extraction Reagent*, Novagen (*BugBuster MasterMix*), se obtuvo un *pellet* (membranas) y un lisado (fase líquida) tras la sedimentación diferencial. Se pudo observar que S13 y L33 se encontraban en el lisado (fase hidrosoluble) (**Figuras 5A y 5B**). Se concluye que ambas proteínas son solubles en el *kit BugBuster MasterMix*, ya que ambas se encuentran en el lisado y ausentes en las membranas.

Purificación de S13 (*wt*) y C114 con Cromatografía de intercambio iónico

Se purificó las proteínas por medio de una Cromatografía de intercambio catiónico. Para ello, se utilizaron columnas SP-HiTraP, las cuales contienen una fase móvil y una estacionaria. En la fase móvil se tiene una carga neta positiva producida por las proteínas del presente estudio y en la fase estacionaria hay una carga neta negativa. La proteína en estudio al tener una carga neta positiva se unió a la fase estacionaria, por lo cual al someterlo a un gradiente de sal como NH_4Cl y a la vez a una alta presión con el *HPLC*, la proteína sale de la columna mediante el principio de fraccionamiento (1).

Para determinar la concentración de sal y fracciones en las que comenzará a salir la proteína de la columna, se sometió a un primer gradiente de 100 mM a 1000 mM donde se pudo evidenciar mediante un gel de Acrilamida que la proteína se recolectaba a partir de la fracción 21 y a 820 mM de NH_4Cl , siguiendo la línea del fraccionamiento de la proteína, se determinó la recta: $y = 45x - 125$ (**Figura 6A**). Se visualizó que a partir de 820 mM de NH_4Cl , la proteína S13 iniciaba su salida de la columna.

Con lo obtenido previamente, se elevó el gradiente de NH_4Cl para minimizar el tiempo de la purificación. Se procedió a realizar una gradiente de NH_4Cl desde 150 mM a 1500 mM, obteniendo que la proteína ribosomal inició su salida de la columna a partir de 820 mM de NH_4Cl (**Figura 6A**). Luego, se utilizó un filtro de centrifugación Ultracel 30k (Merck Millipore, *Germany*) para concentrar la proteína obtenida. Se visualizó en geles de Acrilamida al 14%, que la proteína se encontraba a partir de la fracción 16 hasta la 44, presentando menos contaminantes durante las primeras fracciones (F16 a F21) (**Figuras 6B y 6C**). Se pudo concluir que la proteína S13 se purifica eficientemente usando el gradiente de 150 mM a 1500 mM de NH_4Cl . Además, la utilización de cromatografía de intercambio iónico en estudios similares a este logra una pureza de 88.34%, mientras que, en el presente trabajo, para S13 se logró una pureza de 99% (**Tabla 1**) (36).

Purificación de L33 (*wt*) y C30 con Cromatografía de intercambio iónico y filtro de centrifugación Ultracel-10k de Amikon Ultra-4

De manera similar, las proteínas sintetizadas por los bacilos inducidos que contenían la proteína L33, fueron purificadas con el fin de marcarlas fluorescentemente y posterior introducción a las subunidades ribosomales. La purificación se realizó utilizando Cromatografía de intercambio catiónico, para ello se utilizaron columnas SP-HiTraP.

Debido a que en el control del gel de Acrilamida de este primer paso de purificación no se visualizó la proteína de interés, el protocolo se modificó. Se utilizaron condiciones denaturantes (2M de urea), para asegurar el paso de la proteína de interés a través de la columna. Luego de cargar la columna con los productos de inducción proteica a un gradiente de NH_4Cl desde 50 mM a 1000

mM en presencia de 2M de urea, se observó que la proteína ribosomal de interés salía de la columna a una concentración de sal de 1000 mM (**Figura 7A**).

Se observó en los geles de Acrilamida al 16%, que la proteína de interés se encontraba a partir de la Fracción 32, siendo esta notable en las fracciones 34, 35, 36 (**Figuras 7B y 7C**). Se pudo concluir que la proteína L33 (*wt*) se encontraba purificada, pero existían aún contaminantes por lo que se utilizó un filtro Ultracel 10-k (Merck Millipore, *Germany*) para de este modo eliminarlos. Para la proteína L33 la pureza fue de 49%. Se debe resaltar, que en la cromatografía de intercambio catiónico de L33 se utilizó 2 M de urea en el *buffer*, ya que en condiciones denaturantes es más factible la purificación de esta (**Tabla 1**).

Para mejorar la pureza de la proteína L33 se decidió utilizar un filtro de centrifugación de 10k. L33 tiene un peso de 6.4 kDa y los contaminantes tienen un peso mayor a este, por ello un filtro de 10k separaría los potenciales contaminantes (**Figuras 7B y 7C**). Se presenta un esquema de cómo se llevó a cabo el proceso de filtrado (**Figura 8A**), antes de centrifugar se tomaron las muestras de la fracción superior del filtro (*Top 1*) y de la fracción inferior del filtro (*Bottom 1*). Luego de centrifugar a 7500 G por 30 minutos se obtuvieron 2 fracciones más, una en la parte superior del filtro (*Top 2*) y otra en la parte inferior (*Bottom 2*). Se logró finalmente una correcta purificación de la proteína ribosomal L33 libre de contaminantes, tras la centrifugación a través del filtro Ultracel-10k (Merck Millipore, *Germany*) (**Figura 8B**).

Por último, se cuantificó la cantidad de proteína L33 obtenida en cada uno de los pasos. Para tal motivo se realizó una curva de estándares con 5 puntos, se presenta un R^2 de 0,98 en Nanodrop 3300 (**Figura 8C**). Se obtuvo una gráfica de concentración de proteínas (ng/ μ L), la cual mostró que la mayor concentración de proteína L33 se encontró en la muestra procedente del *Top 2* con 640.8 ng/ μ L, seguida de la muestra procedente del *Top 1* con 361.2 ng/ μ L y por último la muestra del *Bottom 2* con 122.6 ng/ μ L (**Figura 8D**).

Se concluye que el proceso de filtrado con centrifugación ayuda a eliminar los contaminantes que se apreciaban luego de la purificación de la proteína L33 (*wt*), como se presenta en el gel de Acrilamida al 16 % (**Figura 8B**). También se puede mencionar que la mayor concentración de proteína se encuentra en el *Top 2* lo que va de acorde a las especificaciones del filtro utilizado. Luego de este procedimiento se llegó índice de pureza del 98% para la proteína ribosomal L33, siendo esta una concentración importante (**Tabla 1**).

De esta forma se obtuvo un protocolo rápido de purificación, el cual permite la obtención de las proteínas S13 y L33 en dos días de trabajo (**Figura 9**).

Modificación de la subunidad ribosomal 30S con la proteína fluorescente S13

Al obtener la proteína S13 con el fluoróforo Atto-540Q, se procedió a introducirla a la subunidad correspondiente (30S). Se presenta un diagrama de intercambio de la proteína ribosomal S13 *wt* por S13(Atto-540Q) con respecto a la localización probable de IF3-CTD(Atto-488) (**Figura 10A**). La proteína ribosomal S13 se encuentra localizada colindante al C terminal del IF3. De este modo, al intercambiar la proteína ribosomal S13 *wt* por una modificada con un fluoróforo se observaría una variación de la fluorescencia. Se pudo observar que al mezclar rápidamente IF3-CTD(Atto-488) y el 30S hubo un aumento de la fluorescencia, mientras que al combinar este mismo factor de iniciación con el 30S modificado fluorescentemente se evidenció una disminución de la misma (**Figura 10B**). Se concluye que se realizó el correcto intercambio de la proteína S13 *wt* por una modificada fluorescentemente.

Mediciones de *FRET* entre el complejo 30S-S13(Atto-540Q) con factores de iniciación fluorescentes y cambios ocasionados por antibióticos

Una vez introducida la proteína S13(Atto-540Q) a la subunidad ribosomal 30S se procedió a realizar diversos experimentos utilizando la técnica *FRET* para detectar cambios estructurales que se producen en el ribosoma. EL fluoróforo Atto-540Q es un aceptor no emisor (*Quencher*) y Atto-488 es un fluoróforo donador, por lo que un acercamiento entre estos generaría una disminución de la medición de fluorescencia, de manera opuesta, un alejamiento entre los fluoróforos resultaría en un aumento de la fluorescencia medida. La localización de S13 en el ribosoma se encuentra en cercanía a los factores de iniciación IF1 e IF3. En este estudio se usaron ambos marcados con el fluoróforo donador Atto-488, Atto-Tec: Dos versiones de IF3, cada uno marcado de manera

independiente en sus dominios C o N terminal (IF3-CTD(Atto-488) e IF3-NTD(Atto-488)); e IF1(Atto-488) (**Figura 11A**).

Para estimar el posicionamiento de S13(Atto-540Q) en la subunidad 30S se procedió a utilizar 3 pares de *FRET*: 30S-S13(Atto-540Q) con IF1(Atto-488), 30S-S13(Atto-540Q) con IF3-CTD(Atto-488) y 30S-S13(Atto-540Q) con IF3-NTD(Atto-488). Cuando se procedió a mezclar rápidamente 30S-S13(Atto-540Q) con IF1(Atto-488) en un instrumento *Stopped-Flow*, presentó una disminución de la fluorescencia en aproximadamente 0.2 RFU (del inglés, *Relative Fluorescence Units*) (**Figura 11B**). Al realizar la mezcla entre 30S-S13(Atto-540Q) con IF3-NTD(Atto-488), se evidenció una disminución de la fluorescencia en 0.25 RFU (**Figura 11B**). Completando el tercer par, se mezcló 30S-S13(Atto-540Q) con IF3-CTD(Atto-488), observando una disminución de la fluorescencia en 0.3 RFU (**Figura 11B**).

30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) resultó en un mayor cambio de fluorescencia lo cual es ideal para evaluar cambios estructurales en el tiempo del complejo en función de la unión de antibióticos. En el presente estudio se utilizaron estreptomicina, espectinomicina y GE81112, los cuales unen a la subunidad menor 30S del ribosoma (26,28,30). Se realizó una primera mezcla entre el complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) con estreptomicina, evidenciando una disminución de la fluorescencia en 0.1 RFU (**Figura 11C**). Esto indica un acercamiento entre S13 e IF3-CTD. De manera opuesta, la unión de GE81112 al complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) resultó en un aumento de la fluorescencia en 0.2 RFU (**Figura 11C**). Esto indica que el factor de iniciación se aleja de S13. Por último, al mezclar el complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) con espectinomicina se visualiza un ligero aumento de la fluorescencia (menor a 0.05 RFU) (**Figura 11C**), indicando un pequeño distanciamiento entre las proteínas estudiadas. Para comprobar que los cambios observados son específicos de la unión de los compuestos antibióticos se mezcló el complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) con *Stopped Flow Buffer* sin resultar en ningún cambio de fluorescencia observada (**Figura 11C**). La pareja de *FRET* implementada en el presente estudio permite visualizar cambios estructurales del complejo 30S en función de la unión de antibióticos que inhiben la traducción de las proteínas.

Capítulo 3: Discusión

La generación de subunidades 30S modificadas con S13(Atto-540Q) permitieron analizar reacciones *FRET* entre el complejo creado (30S-S13(Atto-540Q)) y los factores de iniciación IF1 e IF3, con o sin la presencia de espectinomicina, estreptomicina o GE81112. La importancia de usar S13 recae en su ubicación en la cabeza del 30S; la cual se encuentra en cercanía a L33, al ARNt de iniciación y a los factores IF1 e IF3 (4). Dicha ubicación, permitiría evaluar los cambios conformaciones de la subunidad menor, como se ha llevado anteriormente con otras parejas de proteínas S6 y L9 (37). Además, S13 carboxilo terminal contacta con el sitio P del 30S, lugar donde se sitúa el primer aminoacil ARNt, esto resulta útil al momento de probar la reacción con antibióticos como se explicará más adelante (38).

La modificación de las proteínas ribosomales S13 y L33 con fluoróforos, no impedirían la producción proteica por los ribosomas. Como se ha estudiado, S13 cumple diversas funciones en la síntesis de proteínas, como unirse de forma específica al ARNr 16S en la subunidad menor, además, participar en puentes de unión entre las subunidades para formar el complejo ribosomal 70S y contactar con el fMet-ARNt, por lo que resulta relevante que estas no se alteren al modificar su estructura con partículas fluorescentes (38). En estudios recientes se menciona que a pesar de estas modificaciones no hay interrupción de la síntesis de proteínas, lo que podría extrapolarse para otras proteínas ribosomales como L33 (37).

Con el presente sistema experimental se evaluó en tiempo real diferentes reacciones mediante la técnica *FRET*. De estas, se obtuvo que el IF3-CTD(Atto-488) se encuentra posicionado más cercano a S13(Atto-540Q) en comparación al IF1(Atto-488) durante etapas tempranas de la síntesis proteica. Estudios recientes indican que efectivamente cuando el IF3 se une a la plataforma del 30S adopta un estado elongado, situándose en el sitio P, lugar próximo con el dominio carboxilo del S13 (21). Por lo que, con lo anteriormente mencionado, en el presente estudio puede concluirse que S13 realiza un *crosslink* con IF3. Nuestros resultados indicaron una unión cercana de IF3-CTD a S13 al demostrar una disminución en la fluorescencia (*Quencher*) mayor que con el dominio N del factor mencionado (**Figura 11B**).

Posteriormente, se analizaron las reacciones del *FRET* del complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) en presencia de antibióticos. Al utilizar estreptomicina, la fluorescencia disminuye, indicando un acercamiento entre ambos. Este puede deberse a movimientos conformacionales de la cabeza del 30S o a una rotación del cuerpo de dicha subunidad (23). La estreptomicina, se une al ARN 16S y a la proteína ribosomal S12 en el sitio A, promoviendo así una reacomodación del IF3 (23,39). En estudios de cristalografía por rayos X del 30S, en presencia de este antibiótico se observó que estabiliza el estado “Ram” por lo que hay una mayor afinidad por el sitio A del ARNt lo que junto con la decodificación alterada causaría un movimiento de la cabeza del 30S (30). Por lo antes mencionado, estreptomicina no sólo actúa en la elongación causando una codificación errónea, sino también en etapas tempranas de la síntesis proteica (28,30).

El antibiótico GE81112 inhibe de forma selectiva el sitio de unión P del ARNt como mecanismo principal de acción y como se mencionó anteriormente el sitio P contacta con la región carboxilo terminal de S13 (26). En las reacciones de *FRET* que involucran este antibiótico, se visualizó un aumento de la fluorescencia del complejo 30S-S13(Atto-540Q)-IF3-CTD(Atto-488) tras la unión del antibiótico, significando un distanciamiento entre S13(Atto-540Q) e IF3-CTD(Atto-488). Es probable que este se deba a dos alternativas no excluyentes: un movimiento rotacional de la cabeza del 30S alejándose del IF3 o la disociación del factor de iniciación. Los datos del presente estudio soportan que GE81112 promueve cambios rotaciones de la cabeza del 30S más que la disociación del IF3, lo cual es congruente con recientes hallazgos en investigaciones que postulan que IF3 permanece unido al 30S al interactuar con el antibiótico (26).

Con respecto a espectinomicina, se observó mediante *FRET* que hay un ligero aumento de la fluorescencia entre S13(Atto-540Q) e IF3-CTD(Atto-488), lo que implica que estos se estarían alejando. En cuanto a estudios estructurales se ha observado que este antibiótico es una molécula rígida que se une cerca al pivote de la cabeza del 30S, lo que afecta la conformación de esta con respecto al cuerpo de dicha subunidad, de esta manera también impediría un adecuado movimiento del ARNt (30). Estas investigaciones también mencionan que la unión de espectinomicina existiendo mutaciones bacterias en proteínas como S5, desestabilizan el antibiótico, permitiendo el movimiento de la cabeza del 30S (30). El aumento de la fluorescencia evidenciando en el presente estudio, podría estar asociado a estos mecanismos de resistencia bacteriana.

El presente trabajo de investigación concluye que se generó un sistema experimental para poder visualizar cambios dinámicos del ribosoma durante la iniciación de la síntesis de proteínas. En su conjunto se establecieron aproximaciones experimentales para producir rápidamente la subunidad menor 30S fluorescente y compatibles con otros ligandos también modificados con fluoróforos interés. Se logró insertar S13 en la subunidad menor 30S; sin embargo, no se pudo insertar L33 en la subunidad mayor 50S, probablemente por limitaciones técnicas y de infraestructura. Finalmente, se midió la interacción de antibióticos (estreptomicina, GE81112 y espectinomicina) con la subunidad 30S modificada con S13(Atto-540Q) obteniendo los resultados antes mencionadas en este trabajo. Si bien el sistema experimental generado permitió evidenciar reacciones *FRET* durante fases tempranas de la iniciación, insertar la proteína L33 en el 50S permitiría un análisis más amplio de la formación del complejo de iniciación 70S. De esta manera, se podría caracterizar el mecanismo de acción y de resistencia de partículas antibióticas ya existentes o nuevas.

Capítulo 4: Conclusiones

- En el presente trabajo de investigación, se demuestra que S13 permite visualizar cambios conformacionales de la subunidad menor en combinación con IF3.
- Al unirse estreptomicina a la subunidad menor 30S se generan cambios conformacionales de esta en relación con S13 e IF3, evidenciando una disminución de la fluorescencia. Esto indica un acercamiento entre ambos.
- Al unirse espectinomicina a la subunidad menor 30S se generan cambios conformacionales de esta en relación con S13 e IF3, se observó un incremento ligero de la fluorescencia. Lo que sugiere un aumento de distancia entre ambas proteínas.
- Al unirse GE81112 a la subunidad menor del 30S se generan cambios conformacionales de este en relación con S13 e IF3, se obtuvo un marcado aumento de la fluorescencia. Por un probable alejamiento entre ambas proteínas fluorescentes.
- Se ha generado un sistema experimental que permite medir movimientos de la subunidad ribosomal menor 30S durante la iniciación de la síntesis proteica.

Lugar de estudio

Centro de Investigación, Universidad Peruana de Ciencia Aplicadas (UPC), Lima, Perú.

El Centro de Investigación de la UPC es un laboratorio con estándares de bioseguridad I, se encuentra equipado para realizar investigación en biología molecular, biología celular, microbiología, bioquímica y proteómica. Por lo tanto, cumple con los requisitos, en términos de infraestructura, equipamiento y experiencia profesional para la ejecución del presente proyecto.

Laboratorio de biología molecular del centro de investigación de la *Università di Camerino*, Camerino, Italia.

Tiempo de estudio

Los experimentos principales del presente estudio se llevaron a cabo durante el segundo semestre del 2015, hasta el segundo semestre del 2016.

Recolección y análisis de datos

- Para la recolección y análisis de datos se usó Word 365, Evernote, Mendeley y bitácora del laboratorio.
- Todos los experimentos analíticos se llevaron a cabo en triplicado, se calculó un promedio y desviación estándar.
- Todas las mediciones contendrán estándares y controles positivos y negativos.
- Analítica
- ImageJ
- NanoDrop Software
- ChromNAV: *HPLC* Software

Ética

Todos los experimentos fueron realizados *in vitro*. No se utilizaron muestras humanas o de animales por lo que no se considera que genere problemas de índole ético. El único agente biológico que se utilizó es la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3), el cual es un organismo inocuo, con un bajo potencial de patogenicidad y que es utilizado frecuentemente para la clonación y expresión de proteínas.

Se siguieron protocolos de bioseguridad establecidos por el Centro de Investigación e Innovación, además, de los protocolos de bioseguridad establecido para el laboratorio de biología molecular de la *Università di Camerino*.

Esta tesis fue revisada y aprobada por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.

Todas las imágenes realizadas en el presente estudio son de autoría propia de los tesisistas. Por lo cual, no se generan problemas de derechos de autor.

Limitaciones

Dentro de las limitaciones se encuentran que, si bien se cuenta con la proteína L33 marcada fluorescentemente, esta no llegó a ser introducida en la subunidad mayor 50S. Por ello, aún se necesita efectivizar este paso de la investigación.

Se evaluaron los protocolos experimentales previo al inicio de los experimentos principales, ello permitió detectar tempranamente posibles aspectos no contemplados y establecer un protocolo experimental definitivo para la realización del proyecto.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Lehninger A, Nelson D CM. Principles of Biochemistry. 6th ed. New York: W. H. Freeman & Company; 2012.
2. Grunberg-Manago M, Studer S, Joseph S. Protein Synthesis Initiation in Bacteria. eLS. 2007.
3. Milón P, Maracci C, Filonava L, Gualerzi CO, Rodnina M V. Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(6):609–15.
4. Laursen B, Sørensen H. Initiation of protein synthesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2005;236(3):747–71.
5. Antoun A, Pavlov MY, Lovmar M, Ehrenberg M. How initiation factors tune the rate of initiation of protein synthesis in bacteria. EMBO J. 2006;25(11):2539–50.
6. Hartz D, McPheeters DS, Gold L. Selection of the initiator tRNA by E.coli initiation factors. Genes Dev. 1989;3:1899–912.
7. Rudolf S, Lipowsky R. Protein Synthesis in E. coli: Dependence of Codon-Specific Elongation on tRNA Concentration and Codon Usage. PLoS One. 2015;10(8).
8. Milón P, Rodnina M V. Kinetic control of translation initiation in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2012;47(4):334–48.
9. Van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. Science (80-). 2002;295(5563):2262–4.
10. Doma MK, Parker R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. Nature. 2006;440(7083):561–4.
11. Bengtson MH, Joazeiro CAP. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. Nature. 2010;467(7314):470–3.

12. Macario AJL, Grippo TM, De Macario EC. Genetic disorders involving molecular-chaperone genes: A perspective. *Genet Med*. 2005;7(1):3–12.
13. Qi Liu, Fredrick K. Intersubunit bridges of the bacterial ribosome. *J Mol Biol*. 2016;4(1):139–48.
14. Pohl T, Witmann-Liebold B. Identification of a cross-link in the *Escherichia coli* ribosomal protein pair S13-S19 at the amino acid level. *J Biol Chem*. 1988;263(9):4293–301.
15. Schuwirth BS. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science*. 2005;310(5749):827–34.
16. Osswald M, D??ring T, Brimacombe R. The ribosomal neighbourhood of the central fold of tRNA: Cross-links from position 47 of tRNA located at the A, P or site. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(22):4635–41.
17. Obwald M, Greuer B, Brimacombe R. Localization of a series of RNA-protein cross-link sites in the 23S and 5S ribosomal RNA from *Escherichia coli*, induced by treatment of 50S subunits with three different bifunctional reagents. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(23):6755–60.
18. Wittmann-Liebold B, Pannenbecker R. Primary structure of protein L33 from the large subunit of the *Escherichia Coli* ribosome. *FEBS Lett*. 1976;68(1):115–8.
19. Boileau G, Butler P, Hershey JW, Traut RR. Direct cross-links between initiation factors 1, 2, and 3 and ribosomal proteins promoted by 2-iminothiolane. *Biochemistry*. 1983;22(13):3162–70.
20. Pulk A, Liiv A, Peil L, Maiväli Ü, Nierhaus K, Remme J. Ribosome reactivation by replacement of damaged proteins. *Mol Microbiol*. 2010;75(4):801–14.
21. Goyal A, Belardinelli R, Rodnina M V. Non-canonical Binding Site for Bacterial Initiation Factor 3 on the Large Ribosomal Subunit. *Cell Rep*. 2017;20(13):3113–22.
22. Sothiselvam S, Liu B, Han W, Ramu H, Klepacki D, Atkinson GC, et al. Macrolide

- antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9804–9.
23. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria - A description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci*. 2008;15(1):5–14.
 24. Fabbretti A, Gualerzi CO, Brandi L. How to cope with the quest for new antibiotics. *FEBS Lett*. 2011;585(11):1673–81.
 25. WHO, World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. 2017;1–48.
 26. Fabbretti A, Schedlbauer A, Brandi L, Kaminishi T, Giuliadori AM, Garofalo R, et al. Inhibition of translation initiation complex formation by GE81112 unravels a 16S rRNA structural switch involved in P-site decoding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(16):E2286-95.
 27. Maio A, Brandi L, Donadio S, Gualerzi C. The Oligopeptide Permease Opp Mediates Illicit Transport of the Bacterial P-site Decoding Inhibitor GE81112. *Antibiotics*. 2016;5(2):17.
 28. Chulluncuy R, Espiche C, Nakamoto J, Fabbretti A, Milón P. Conformational Response of 30S-bound IF3 to A-Site Binders Streptomycin and Kanamycin. *Antibiotics*. 2016;5(4):38.
 29. Hlaing YM, Tongtawe P, Tapchaisri P, Thanongsaksrikul J, Thawornwan U, Archanachan B, et al. Mutations in streptomycin resistance genes and their relationship to streptomycin resistance and lineage of mycobacterium tuberculosis Thai isolates. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2017;80(2):159–68.
 30. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 2000;407(6802):340–8.
 31. Culver GM, Noller HF. Efficient reconstitution of functional Escherichia coli 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *RNA*.

- 1999;5(6):832–43.
32. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189(1):113–30.
 33. Milon P, Konevega AL, Peske F, Fabbretti A, Gualerzi CO, Rodnina M V. Transient Kinetics, Fluorescence, and FRET in Studies of Initiation of Translation in Bacteria. *Methods Enzymol.* 2007;430(7):1–30.
 34. Cunha CE, Belardinelli R, Peske F, Holtkamp W, Wintermeyer W, Rodnina M V. Dual use of GTP hydrolysis by elongation factor G on the ribosome. 2013;(June):1–11.
 35. Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robatjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N. Overproduction of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. 2007;42:112–7.
 36. Liao JY, Gao YQ, Wu QY, Zhu YC, You MS. Purification of the insecticidal Cry2Ad protein from a Bt-isolated BRC-HZP10 strain and toxin assay to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Genet Mol Res.* 2015;14(3):7661–70.
 37. Belardinelli R, Sharma H, Caliskan N, Cunha CE, Peske F, Wintermeyer W, et al. Choreography of molecular movements during ribosome progression along mRNA. *Nat Struct & Mol Biol.* 2016;(February):1–8.
 38. Cukras AR, Green R. Multiple effects of S13 in modulating the strength of intersubunit interactions in the ribosome during translation. *J Mol Biol.* 2005;349(1):47–59.
 39. Carter a P, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Hartsch T, Wimberly BT, et al. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science.* 2001;291(5503):498–501.

Abreviaciones

(L)	<i>Ladder</i>
(wt)	<i>Wild type</i>
30S	Subunidad menor Ribosomal
50S	Subunidad mayor Ribosomal
70S	Complejo Ribosomal Bacteriano
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetil acid</i>
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
fMet-ARNt	Formil metionina ARN de transferencia
FRET	<i>Föester Resonance Energy Transfer</i>
HEPES	<i>Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IF	<i>Initiation Factor</i>
IF1(Atto-488)	IF1 Fluorescente con fluoróforo Atto 488 Donador
IF3-CTD(Atto-488)	IF3 fluorescente con fluoróforo Atto 488 Donador en su dominio C terminal
IF3-NTD(Atto-488)	IF3 fluorescente con fluoróforo Atto 488 Donador en su dominio N terminal
IPTG	Isopropil-B-D-1-Tiogalactopiranósido
Kan R	Kanamicina Resistente
L33 (wt)	<i>L33 wild type</i>
L33 C30	L33 con mutación con Cisteína posición C30
L33(Atto-540Q)	L33 Fluorescente con fluoróforo Atto 540 <i>Quencher</i> -acceptor
LB	Luria Bertani
OD	<i>Optical Density</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RPM	Revoluciones por Minuto
S13 (<i>wt</i>)	<i>S13 wild type</i>
S13 C114	S13 con mutación con Cisteína posición 114
S13(Atto-540Q)	S13 Fluorescente con fluoróforo Atto 540 <i>Quencher</i> -acceptor
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolic Repressor</i>
TAE	<i>Tris bases, acetic acid, EDTA</i>
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride</i>
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UPC	Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas
UV	Ultravioleta

Anexos

Figura 1: Diagrama de transformación de *Escherichia coli* BL21 kanamicina sensible mediante el protocolo Mix & Go Zymo™

Las *Escherichia coli* BL21 (DE3), se transformaron con los plásmidos pET-24a (+) Kan R que contenían los genes *rpmG* (L33) o *rpsM* (S13), además, estos tenían su variante que le conferían una cisteína en la posición 30 y 114 respectivamente. Luego de ser transformadas se cultivaron en una placa con medio SOB suplementada con 30 µg/mL de kanamicina.

Figura 2: Los genes *rpsM* y *rpmG* contenidos en el plásmido pET-24a (+) Kan R, son correctamente amplificados

A) Cada gen contenido pET-24a (+) Kan R fue sometido a *PCR*, electroforesis en gel de Agarosa (2% en *buffer* TAE) de las amplificaciones de la *PCR*, visualizado con luz UV y grabado con una cámara de fotos. En la primera línea se tiene el *Ladder* (L) marcador de tamaños conocidos de ADN, en la segunda línea se tiene el control negativo (-), los productos de amplificación del gen *rpsM* se encuentran en las líneas 3 y 4, y finalmente en las líneas 5 y 6 los productos de amplificación del gen *rpmG*. **B)** Curva de referencia de los estándares de ADN (0.1-1 ng/μL) para la cuantificación de las amplificaciones de la *PCR* fue hecha con el kit *QuantI-iT DS DNA BR* (Invitrogen) y cuantificado en Nanodrop 3300. **C)** Concentración de las amplificaciones de los genes *rpsM* y *rpmG*.

Figura 3: Expresión recombinante de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG

A) Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (PAGE, 16%) de *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpsM*, codificante para S13) e inducido con 1 mM de IPTG luego de 2 horas los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. **B)** Tiempo dependiente de la densidad óptica (OD 600 nm) durante el crecimiento celular de *Escherichia coli* BL21 pET-24a *rpsM*, (wt) y cisteína única C114 son comparadas desde la inducción de producción de proteínas. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro Thermo Scientific. **C)** PAGE (16%) de *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpmG*, codificante para L33) luego de dos horas de inducción. Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. **D)** Como en B para BL21 pET-24a *rpmG*, (wt) y cisteína única C30 son comparadas.

Figura 4: Producción a gran escala de S13 y L33 por la inducción LacZ-dependiente de IPTG

A) Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (*PAGE*, 16%) de *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpsM*, codificante para S13) e inducido con 1 mM de IPTG luego de 2 horas los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. **B)** Tiempo dependiente de la densidad óptica (OD 600 nm) durante el crecimiento celular de *Escherichia coli* BL21 pET-24a *rpsM*, (*wt*) y cisteína única C114 son comparadas desde la inducción de producción de proteínas. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro Thermo Scientific. **C)** *PAGE* (16%) de *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpmG*, codificante para L33) luego de dos horas de inducción. Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. **D)** Como en B para BL21 pET-24a *rpmG*, (*wt*) y cisteína única C30 son comparadas.

Figura 5: Las proteínas S13 (*wt*) y L33 (*wt*) son ambas hidro-solubles observadas con la técnica de sedimentación diferencial

A) Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (*PAGE*, 16%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso muy similar a la proteína S13 (Post) es encontrada en la muestra de lisado como también en la muestra de la *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpsM*, gen codificante para S13) post-inducción. **B)** *PAGE* (16%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso muy similar a la proteína L33 (Post) fue encontrada en la muestra de lisado como también en la muestra de la *Escherichia coli* BL21 (conteniendo el gen *rpmG* gene, codificante para L33) post-inducción.

Figura 6: Purificación de S13 (*wt*) con Cromatografía de intercambio catiónico SP-HiTraP (*Pharmacia, Sweden*)

A) Dos gradientes de concentración de NH_4Cl son comparados para la purificación de S13 (*wt*). Primero, un gradiente desde 100 mM a 1000 mM (línea gris) cedió a S13 (*wt*) luego de 21 mL a 820 mM de NH_4Cl . En un segundo gradiente (línea negra), desde 150 mM a 1500 mM, S13 (*wt*) eluyó luego de 16 mL a 820 mM de NH_4Cl **B)** Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (*PAGE*, 14%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso similar a la proteína S13 (Post) fue encontrada en las fracciones 41, 42, 43 y 44. **C)** *PAGE* (14%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso similar a la proteína S13 (Post) fue encontrada en las fracciones 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

Figura 7: Purificación de L33 (*wt*) con Cromatografía de intercambio catiónico SP-HiTraP (*Pharmacia, Sweden*)

A) Un gradiente de concentración de NH_4Cl en la purificación de L33 (*wt*), con 2M de urea. Un gradiente desde 50 mM a 1000 mM (línea negra) eluyó L33 (*wt*) luego de 34 mL a 1000 mM de NH_4Cl . **B)** Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (*PAGE*, 16%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso similar a la proteína L33 (Post) fue encontrada en las fracciones 31, 34, 38, como también en la muestra post-centrifugación a 10 000 RPM por 30 minutos, y en la primera puesta de la muestra dentro de la columna SP-HitraP (*Pharmacia, Sweden*). **C)** *PAGE* (16%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso similar a la proteína L33 (Post) fue encontrada en las fracciones 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

Figura 8: Purificación de L33 (wt) con Filtro de centrifugación Ultracel-10k (Merck Millipore, Germany)

A) Diagrama del filtro de centrifugación y las fracciones pre-centrifugación, y post-centrifugación a 7500 G por 30 minutos **B)** Electroforesis en gel de Poli-Acrilamida (PAGE, 16%). Los geles fueron teñidos con azul de Commassie, visualizados bajo luz blanca y grabado con una cámara de fotos. Una proteína de peso similar a la proteína L33 (Post) fue encontrada en *Bottom 2*, *Top 2* y *Top 1*. **C)** Curva de referencia de los estándares de concentración de proteínas (0.1-1 ng/ μ L) para la cuantificación usando *QuantI-iT DS protein BR* (Invitrogen) y medido en el espectrofotómetro Nanodrop 3300. **D)** Concentración de *Bottom 2*, *Top 1* y *Top 2* calculado de 5 replicaciones, barras de error indican desviación estándar.

Figura 9: Esquema representativo de un protocolo de dos días para conseguir de forma ultra-pura las proteínas ribosomales S13 y L33

Dos pasos se encuentran resaltados en el segundo día debido a la novedad/o el cuidado que se debe tener, el verde indica el uso de SP-HiTraP para la purificación de S13 con un cargado manual seguido de la *HPLC* (gris), resultando en un proceso rápido que además previene el cargar todo el lisado a instrumentos sofisticados.

Figura 10: Intercambio de la proteína S13 *wt* por S13(Atto-540Q) en la subunidad 30S

A) Diagrama de intercambio de la proteína ribosomal S13 *wt* por S13(Atto-540Q) con respecto a la localización probable de IF3-CTD(Atto-488). Condiciones del intercambio 30S 50pmol, S13(Atto-540Q) 250pmol, 400mM NH₄Cl, incubación a 47°C por 1 hora. **B)** Unión en tiempo real del factor de iniciación fluorescente al 30S (**línea roja**) y al 30S modificado con S13(Atto-540Q) (**línea negra**). *FRET* entre los factores de iniciación y la proteína ribosomal se midió en el tiempo en un instrumento *Stopped-Flow* (Kintek, USA). Todas las mediciones se realizaron 8 veces y se promediaron. Cada medición individual representa 1000 puntos de fluorescencia a lo largo del tiempo medido.

Figura 11: Unión de los factores de iniciación IF1 e IF3 a 30S modificados con S13(Atto-540Q)

A) Diagrama de localización probable de S13(Atto-540Q) y de los diferentes factores de iniciación IF1(Atto-488), IF3-CTD(Atto-488) y IF3-NTD(Atto-488) **B)** Unión en tiempo real de los factores de iniciación fluorescentes al 30S modificado con S13(Atto-540Q). *FRET* entre los factores de iniciación y la proteína ribosomal se midió en el tiempo en un instrumento *Stopped-Flow* (Kintek, USA). **C)** Cambios estructurales en el tiempo en función de la unión de 3 antibióticos, estreptomicina (anaranjado), GE81112 (rosado) o espectinomicina (azul). Un control sin ningún antibiótico se muestra en color negro. Todas las mediciones se realizaron 8 veces y se promediaron. Cada medición individual representa 1000 puntos de fluorescencia a lo largo del tiempo medido.

Tabla N° 1: Representación del índice de pureza (IP) de las proteínas ribosomales S13 y L33

Proteínas	IP Post-inducción con IPTG	IP Post-cromatografía	IP Post-Centrifugación con Filtro 10K
S13	67%	99%	-
L33	44%	49%	98%

*Se detalla el índice de pureza en cada uno de los pasos que llevó a la purificación de cada proteína, con un índice de pureza final de 99% y de 98% para S13 y L33 respectivamente.