



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE NUTRICIÓN Y

DIETÉTICA

**Nuevo mecanismo de inhibición de la Oxitetraciclina durante la iniciación de
la síntesis de proteínas en bacterias**

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciada en Nutrición y Dietética

AUTORA

Vargas Reyes, Maryhory Fiorella (0000-0002-4903-483X)

ASESOR

Milon Mayer, Pohl Luis (0000-0001-6679-5473)

Lima, 23 de Setiembre del 2019

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a todos los que hicieron posible su realización y me guiaron en este difícil pero gratificante proceso. A Dios, porque sin Él nada es posible, al Doc. Pohl por su mentoría y entrega a este trabajo, también a los miembros del Centro de Investigación: José Alberto Nakamoto, Víctor Barrenechea, Víctor Zegarra, Ana Sánchez, Katherin Peñaranda, Roberto Alcántara el Doc. Miguel Quiliano que me dieron todo su apoyo y consejos. Por último y no menos importante, se lo dedicó a mi familia, porque es mi motor y motivoy me han apoyado incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al programa Beca 18 por la oportunidad de estudiar en UPC. A su vez, agradezco a UPC por los incentivos para la investigación EXP-03-2018 y al Fondecyt-Concytec con convenio Nr 154-Fondecyt-2017 por el financiamiento que ha permitido la presente investigación. Al mismo tiempo, agradezco a InnóvatePerú por brindar financiamiento para el equipamiento científico utilizado, convenios 382-PNCIP-PIBA-2014 y 297-InnovatePeru-EC-2016.

RESUMEN

Desde su descubrimiento, los antibióticos han marcado un hito importante en el tratamiento de enfermedades y han permitido la realización de intervenciones quirúrgicas antes consideradas como letales. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos puede alterar la microbiota, causando disbiosis y aumentando la predisposición al desarrollo de diversas patologías a largo plazo. Antibióticos de amplio espectro como la Oxitetraciclina (OTC) se utilizan de manera desmesurada en diversas industrias agroalimentarias. La relación entre el mecanismo de acción de OTC y alteraciones de la microbiota es aún desconocida. Actualmente, se conoce que OTC funciona como inhibidor de la síntesis de proteínas durante la fase de elongación. Dicho fase de la síntesis de proteínas es altamente conservada entre las bacterias y no explicaría el efecto diferenciado entre géneros bacterianos asociados a disbiosis. Al unirse a la subunidad menor 30S del ribosoma, existe la posibilidad de que OTC también actúe en otras fases de la síntesis proteica. Entre ellas destaca la iniciación de la traducción del ARNm al presentar al menos dos mecanismos alternativos, utilizados diversamente entre las bacterias. El primero utiliza los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3, mientras que el segundo utiliza principalmente IF1 e IF2. En el presente estudio se evalúa a OTC como posible inhibidor de la iniciación de la síntesis de proteínas dependiente de los tres factores mediante métodos bioquímicos y análisis informático de modelamiento estructural. Los resultados indican que IF1 es susceptible a OTC, probablemente por su posicionamiento cercano al antibiótico en el ribosoma. Como consecuencia, OTC induce una mayor estabilización de IF1 en el ribosoma, que va en aumento a través de los complejos intermediarios de iniciación, alcanzando un incremento del 40%. La estabilización de IF1, reducción de su capacidad de disociación del ribosoma, conllevaría a una inhibición de la formación del complejo de iniciación 70S. Los resultados aquí expuestos sugieren un nuevo mecanismo de acción de OTC durante la iniciación de la síntesis de proteínas. El entendimiento del nuevo mecanismo de acción de OTC contribuye con una explicación novedosa y base para el entendimiento de disbiosis mediada por el fármaco. Además, los resultados proporcionan las bases de futuras investigaciones para el desarrollo de nuevos antibióticos que actúen en el mismo blanco molecular.

Palabras claves: Oxitetraciclina, OTC, iniciación de la traducción, subunidad 30S, IF3, IF1, FRET

New inhibition mechanism of Oxytetracycline during synthesis protein initiation in bacteria

Antibiotics have established an important milestone since their discovery, allowing the treatment of infectious diseases and surgical procedures otherwise considered lethal. However, recent studies show that the use of antibiotics can alter the microbiota, causing dysbiosis and leading to the development of diverse pathologies. In particular, broad-spectrum antibiotics such as Oxytetracycline (OTC) are widely used in agricultural and food industries. The relationship between the molecular mechanism of OTC and microbiota modifications is still unknown. The current model suggests that OTC inhibits the elongation phase of protein synthesis inhibitor. This phase of protein synthesis is highly conserved among bacteria and cannot explain the differentiated effect of OTC among bacterial genus. OTC could act in other phases of protein synthesis since the drug binds to 30S small ribosomal subunit. Among these, mRNA translation initiation stands out since it is represented by at least two alternative mechanisms in bacteria. The first mechanism uses initiation factors IF1, IF2 and IF3, while the second uses mainly IF1 and IF2. In the present study, OTC has been evaluated as a potential protein synthesis inhibitor acting at initiation of translation. Particularly, the study focuses in the mechanism that uses all three initiation factors employing biochemical methods and computer analysis of structural modelling. The results indicate that IF1 is susceptible to OTC, probably due to the near positioning with respect to the antibiotic in the ribosome. Consequently, OTC increases the stabilization of IF1 in the ribosome up to 40% along all intermediate initiation complexes. IF1 stabilization would inhibit of 70S initiation complex formation, suggesting a new mechanism of action for OTC during translation initiation. This finding would explain how OTC causes dysbiosis and provides further basis for future research of new antibiotics with a similar molecular mechanism.

Key words: Oxytetracycline, OTC, translation initiation, subunit 30S, IF3, IF1, FRET

TABLA DE CONTENIDOS

1	TABLA DE CONTENIDO	
2	INTRODUCCIÓN	8
3	MATERIALES Y METODOS	11
3.1	MEDICIONES CINÉTICAS	11
3.1.1	<i>Obtención de las proteínas ribosomales, ARNm, ARNt y subunidades ribosomales</i>	<i>11</i>
3.1.2	<i>Interacciones moleculares en tiempo real – Stopped Flow</i>	<i>11</i>
3.1.3	<i>FRET, Förster resonance energy transfer</i>	<i>13</i>
3.1.4	<i>LS, Light scattering</i>	<i>13</i>
3.2	ESTUDIOS DE MODELAMIENTO E INTERACCIÓN	13
4	RESULTADOS	15
4.1	OTC ACERCA LOS DOMINIOS N Y C TERMINAL DE IF3 EN LA SUBUNIDAD 30S	15
4.2	POSIBLE INTERACCIÓN DE IF1 Y OTC EN 30S	17
4.3	OTC NO COMPITE CON IF1	18
4.4	OTC NO AFECTA LA UNIÓN DE IF3 A LA SUBUNIDAD 30S	19
4.5	OTC PROMUEVE LA REACOMODACIÓN DEL DOMINIO IF3C	19
4.6	OTC PODRÍA ESTABILIZAR LOS FACTORES IF1 O IF3 EN LA SUBUNIDAD 30S	20
4.7	DISOCIACIÓN DE IF1 EN EL COMPLEJO 30S-IF3	21
4.8	DISOCIACIÓN DE IF3 EN EL COMPLEJO 30S-IF1	22
4.9	DISOCIACIÓN DE IF1 EN EL PRE COMPLEJO DE INICIACIÓN POR OTC	23
4.10	DISOCIACIÓN DE IF1 EN EL COMPLEJO DE INICIACIÓN POR OTC	24
4.11	DISOCIACIÓN DE IF1 EN AUSENCIA DE GTP	25
4.12	OTC INHIBE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE INICIACIÓN 70S.	27
4.13	TITULACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE OTC EN PRESENCIA DE IF3 DL	29
4.14	MODELO ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO 30S-IF1-IF3-OTC	30
5	DISCUSIÓN	33
6	CONCLUSIONES	36
7	REFERENCIAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Antibióticos como OTC y su posible relación con la microbiota	8
Figura 2 Diagrama de dos vías de iniciación de la síntesis de proteínas	10
Figura 3 Esquema de análisis de resultados	15
Figura 4 OTC modifica la disposición IF3 DL pre-unido a la subunidad 30s	16
Figura 5 La presencia de IF1 en el complejo 30S-IF3 DL no varía el efecto de unión de OTC a la subunidad 30s.....	17
Figura 6 OTC no compete con IF1	18
Figura 7 OTC no reduce la unión de IF3 a la subunidad 30S	19
Figura 8 OTC promueve la reacomodación del dominio IF3C	20
Figura 9 OTC puede estabilizar los factores de iniciación en la subunidad 30S.....	21
Figura 10 Disociación de IF1 en el complejo 30S-IF3.....	22
Figura 11 Disociación de IF3 en el complejo 30S-IF1	23
Figura 12 Disociación de IF1 en el pre complejo de iniciación	24
Figura 13 Comparación de la amplitud (cambio de fluorescencia) entre los complejos de iniciación	25
Figura 14 Disociación de IF1 en el complejo de iniciación por OTC	25
Figura 15 La ausencia de GTP y el efecto de OTC	26
Figura 16 OTC reduce la velocidad de asociación de 70S	28
Figura 17 Inhibición de la formación del complejo 70S cómo resultado de la estabilización de IF1 en los complejos intermedios de la iniciación.....	29
Figura 18 Los cambios conformacionales de IF3 dependen de la concentración de OTC .	30
Figura 19 OTC se posiciona cerca de IF1 e IF3c	32
Figura 20 Diagrama de iniciación de la síntesis de proteínas y representación de los pasos afectados por OTC.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones de complejos intermedios	12
--	----

Glosario:

- IF1, Factor de iniciación 1
- IF1_D, IF1 etiquetado con fluoróforo donador Atto-488
- IF1_A, IF1 etiquetado con fluoróforo aceptor o *quencher* Atto-540Q
- IF2, Factor de iniciación 2
- IF3, Factor de iniciación 3
- IF3_D, IF3 etiquetado con fluoróforo donador, Atto-488
- IF3_A, IF3 etiquetado con fluoróforo aceptor o *quencher*, Atto-540Q
- IF3DL
- *wt*, *wild type* (tipo silvestre)
- ARN, Ácido ribonucleico
- ARNm, ARN mensajero
- ARNm_D, ARNm etiquetado con fluoresceína como donador
- fMet-ARNt, formil-Metionina-ARN de transferencia
- fMet-ARNt_D, fMet-ARNt etiquetado con fluoresceína como donador
- aa-ARNt, ARNt aminoacilado
- 30S, Subunidad menor del ribosoma bacteriano
- 50S, Subunidad mayor del ribosoma bacteriano
- 70S IC, del inglés *initiation complex* 70S (complejo de iniciación 70S)
- PIC, del inglés *pre-initiation complex* (complejo de pre-iniciación)
- IC, del inglés *initiation complex* (complejo de iniciación)
- OTC, Oxitetraciclina
- STR, Streptomicina
- SF, *Stopped Flow*
- LS, *Light Scattering*
- FRET, del inglés *Förster resonance energy transfer* (Transferencia de energía de resonancia Föster).

2 INTRODUCCIÓN

La microbiota es el conjunto de microorganismos que habita en el cuerpo humano, tiene funciones homeostáticas y de estimulación del sistema inmune (1). Su diversidad difiere en función a su localización, destacando la microbiota residente en el aparato digestivo (2). Desbalances en la composición y representación de los microorganismos de la microbiota, también llamado disbiosis, predispone al desarrollo de diversas enfermedades como cardiovasculares, diabetes, hipertensión, artritis (3–7). Por su repercusión en la salud, la microbiota es catalogada como un nuevo órgano (8). Su composición depende de la dieta de cada persona, componentes genéticos, socioculturales, entre otros (9) como factores químicos y farmacéuticos han sido estudiados como causantes de disbiosis (10–12). En especial, una exposición extensa y a temprana edad a los antibióticos podría influir en el desarrollo de enfermedades desde metabólicas hasta inmunológicas, como también aumentar su potencial riesgo a desarrollar neoplasias (13–16). A pesar de que el descubrimiento de los antibióticos revolucionó el tratamiento de enfermedades infecciosas, ahora se acumulan evidencias de los daños colaterales que estos pueden causar, teniendo entre las más recientes la alteración de la microbiota (17) (Figura 1).

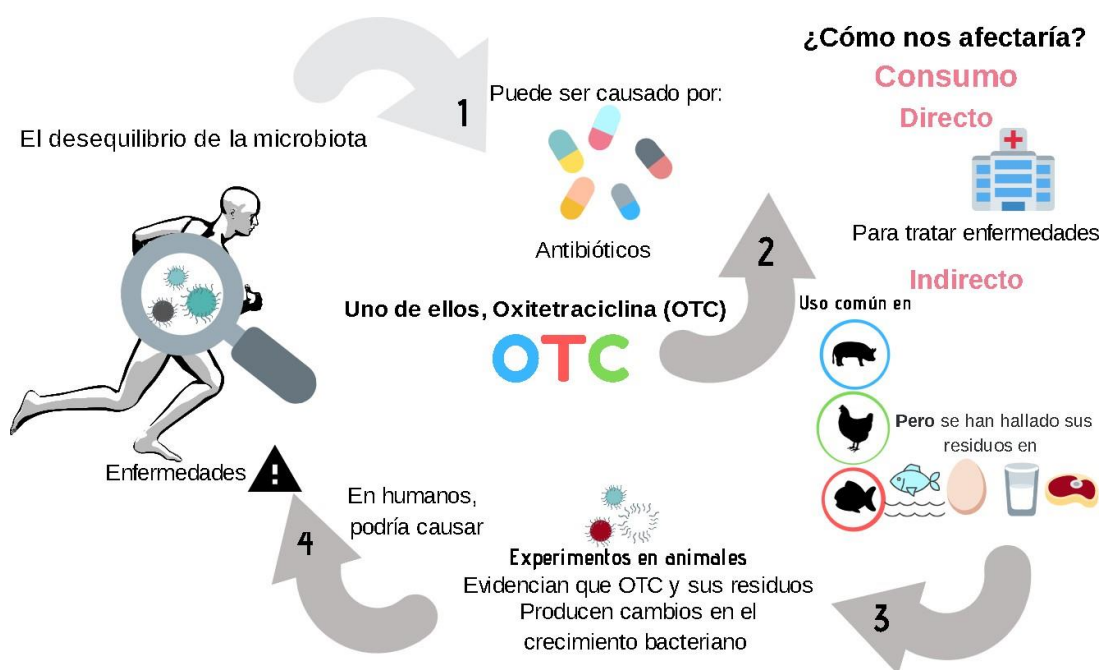


Figura 1 Antibióticos como OTC y su posible relación con la microbiota

Los antibióticos actúan en diversos mecanismos de síntesis de macromoléculas, como la replicación del ADN, la síntesis del ARN o de proteínas (18). De todos estos procesos, se conoce que la mayoría de los actuales antibióticos comerciales inhiben principalmente la síntesis de proteínas (19) (o traducción del ARN) de las bacterias en sus etapas de iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosoma (20). En este grupo se encuentran las tetraciclinas, que al unirse a la subunidad menor 30S, inhiben la unión del aa-ARNt en el sitio A (fase de elongación) deteniendo la traducción o provocando una codificación errónea del ARNm (21). En la actualidad, la familia de las tetraciclinas es comercialmente representada por la Oxitetraciclina (OTC), que es comúnmente usada en animales (22). Estudios recientes han encontrado residuos de la OTC en alimentos derivados de animales (23–25), y que además se encuentran relacionados con cambios en la microbiota en estos animales y su entorno (26,27) (Figura 1).

OTC al unirse a la subunidad menor 30S podría también comprometer otras fases de la traducción, con particular interés en la fase de iniciación, pues es la única que presenta variaciones. Actualmente se han descrito dos mecanismos usados por el ribosoma para iniciar la síntesis de proteínas en bacterias (Figura 2). El primero, y más caracterizado, utiliza tres factores de iniciación y selecciona ARN mensajeros que contienen una región no codificante antes del codón de iniciación mediante la secuencia Shine – Dalgarno (SD) y el ARNt de iniciación (28). El segundo mecanismo, denominado “sin secuencia líder” (del inglés, *leaderless*), utiliza el factor de iniciación IF2 (29) con alguna dependencia de la presencia de IF1 y promueven la traducción de ARNm que solo contienen el codón de iniciación como señal de inicio (30). Estudios recientes de análisis genético indican que las bacterias usan ambas vías para iniciar la síntesis de proteínas (31). La iniciación dependiente de los tres factores es un proceso cíclico en la síntesis de proteínas en bacterias, en la cual los factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3) llegan a la subunidad pequeña del ribosoma (30S), con el fin de regular la unión del ARNm y fMet-ARNt (Figura 2). Cada uno de los factores cumplen roles diferentes y a la vez complementarios donde IF1 mejora las actividades de los otros factores, IF2 acelera la unión del fMet-ARNt a la subunidad e IF3 controla la lectura de codones canónicos de inicio en el ARNm y previene la unión prematura de la subunidad 50S (20). La unión de OTC al ribosoma podría tener un efecto sobre alguno de estos factores, pues estos también se unen a la subunidad pequeña 30S (32,33), y así modificar la traducción de bacterias en sus fases iniciales.

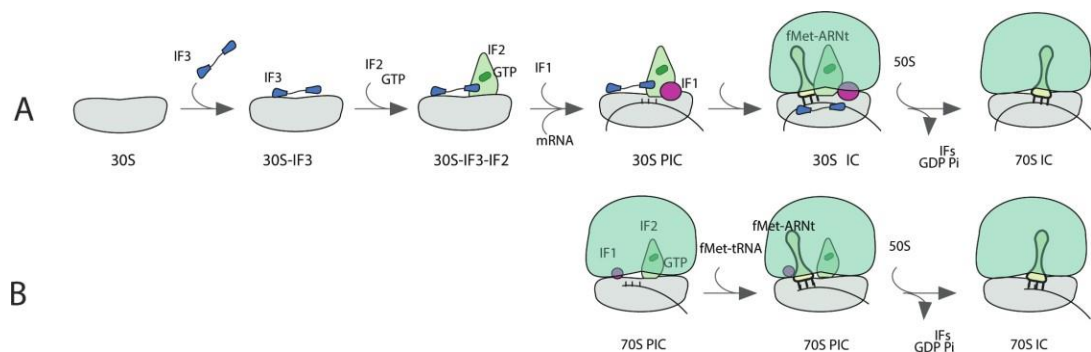


Figura 2 Diagrama de dos vías de iniciación de la síntesis de proteínas en bacterias

A) Iniciación de la vía clásica de la traducción: El orden de la llegada de los factores al ribosoma es IF3, IF1 e IF2-GTP (34), el ARNm puede unirse en cualquier momento, pero en conjunto a los factores forman complejos 30S de pre-iniciación (PIC) listos para la aceptar el fMet-ARNt y así se forman los complejos 30S de iniciación (IC). La unión del codón- anti codón del ARNm y fMet-ARNt, permiten la llegada del 50S, y con ello los factores se eyectan del ribosoma (20). **B)** Iniciación de la vía *Leaderless* de la traducción: Esta vía, usa IF1 e IF2-GTP, no requiere la separación de las subunidades y resulta en la formación del complejo 70SPIC, luego de la disociación de los factores se forma el complejo 70S IC, capaz de traducir el ARNm (30).

En las fases tardías de la iniciación, la subunidad 50S, se une a 30S para formar el complejo de iniciación 70S (70S IC) promoviendo la salida de los factores de iniciación y así el ribosoma entra en la fase de elongación (35). A su vez, distintos aa ARNt son decodificados por el ARNm en aminoácidos en el sitio A, translocados al sitio P y finalmente disociados desde el sitio E de 30S. Esto continúa hasta que aparece el codón de terminación (fase de terminación) y la proteína sintetizada es liberada. El complejo 70S es reciclado en sus subunidades iniciales (30S y 50S) propiciando el reinicio del ciclo de la traducción (20).

Si bien la literatura describe que OTC tiene un solo mecanismo de acción, asignado a la fase de elongación de la síntesis de proteínas, dicha fase es altamente conservada en las bacterias (36), y su inhibición resultaría en una acción bactericida similar en todas las especies. Sin embargo, un estudio reciente indica que OTC impide el crecimiento de algunas bacterias mas no de otras (27). De manera similar, se reportaba que la Estreptomicina (STR) actuaba solamente en la fase de elongación; sin embargo, recientemente se ha comprobado que también lo hace en la fase de iniciación (37). Por ello, en la presente investigación nos preguntamos ¿Por qué la capacidad inhibitoria de Oxitetraciclina varía entre géneros de bacterias? ¿Existe un mecanismo de acción implicado en la fase de iniciación que respalda las diversas sensibilidades entre bacterias? Para responder estas preguntas, se estudió el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas dependiente de factores de iniciación en presencia de OTC mediante técnicas bioquímicas y de modelamiento de la subunidad 30S con el antibiótico. Es así que, este estudio busca relacionar los cambios que OTC induce en

la microbiota mediante la exploración de un nuevo mecanismo de acción molecular del antibiótico.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Mediciones cinéticas

3.1.1 Obtención de las proteínas ribosomales, ARNm, ARNt y subunidades ribosomales
Las subunidades ribosomales, factor de iniciación 1 (IF1), 2 (IF2) y 3 (IF3), ARNm y fMet-ARNt fueron obtenidos a partir de *E. coli* según previamente reportado (37,38). Se realizó el doble etiquetado de IF3 con fluoróforos (Atto-Tec, USA). En el dominio carboxilo terminal se añadió el fluoróforo aceptor (quencher) Atto-540Q mientras que en el dominio amino terminal se añadió el fluoróforo donador Atto-488. A este factor doblemente etiquetado se le denominó IF3DL y se obtuvo siguiendo la metodología de Chulluncuy y colaboradores (37). Adicionalmente, se realizó el etiquetado simple de IF3 en el dominio carboxilo terminal con un solo fluoróforo. Por un lado, se usó Atto488 como donador y se le denominó IF3_D; por otro lado, pero también en el mismo dominio, se etiquetó con el fluoróforo aceptor Atto-540Q, denominado IF3_A. Luego a IF1, en su posición 4, se hizo el etiquetado simple usando el fluoróforo donador Atto488, y para ARNm, en su ribosa terminal 3 y fMet-ARNt, en posición 8; se etiquetaron con fluoresceína y fueron designados como IF1_D, ARNm_D y fMet-ARNt_D, respectivamente. Además, en el caso particular de IF1, se hizo el mismo tipo de etiquetado con Atto-540Q, IF1_A previamente reportadas (38).

3.1.2 Interacciones moleculares en tiempo real – *Stopped Flow*

El aparato de flujo detenido o *Stopped Flow* (SX20 de Applied Photophysics) es un instrumento que permite medir cinéticamente las interacciones de moléculas (FRET) o formación de complejos (*Light Scattering*). Este aparato lo realiza a través del detenimiento del flujo de la mezcla de dos soluciones que ingresaron al aparato por inyectores o jeringas (39). La mezcla depende del objetivo experimental, pero en líneas generales, en este estudio, estuvo compuesta por proteínas ribosomales, ARNm, ARNt y subunidades ribosomales. Todos ellos necesitaron de un medio y por ello se usó la solución tampón TAKM7 (25 mM de buffer Tris (pH: 7,5), 70 mM de acetato de amonio, 30 mM de cloruro de Potasio, 7 mM de cloruro de Magnesio) a 25°C previamente filtrado (Filtros Millipore 0.1 µm) y degasificado mediante vacío y agitación. Así, una solución podía contener complejos intermedios de iniciación, mientras que la otra solución, OTC. De esta manera, mediante mediciones cinéticas se evaluó la llegada de OTC a estos complejos de iniciación, así como

con complejos de iniciación y OTC incubados en solución; se evaluaba la llegada de factores de iniciación, y finalmente, también, la formación de complejos. Las concentraciones de estos componentes y los detalles de los experimentos se encuentran en la Tabla 1; para OTC la concentración fue de 100 μM en todos los experimentos FRET y el doble en *Light Scattering*. Algunas consideraciones para el uso del *Stopped Flow* fueron la longitud de onda de excitación que se usó para ATTO488 fue 470 nm, la emisión que se detectó a través de un filtro óptico con corte de 515 nm. Se hizo seis mediciones independientes de cada reacción por 200 segundos por cada ensayo. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C, a 392 V para el sensor de fluorescencia.

Tabla 1 Detalles de los experimentos realizados en *Stopped-Flow*

Evaluar	1 Solución		2 Solución
El efecto de la llegada de OTC	30S-IF3DL	0.025 μM IF3DL pre unido a 0.05 μM 30S	100 μM OTC
	30S-IF1-IF3DL	0.2 μM IF1 , 0.025 μM IF3DL pre unido a 0.05 μM 30S	
	30S- ARNm _D -IF3 _A	0.025 μM ARNm _D , 0.075 μM IF3 _A pre unido a 0.05 μM 30S	
	30S- IF1 _D -IF3 _A	0.025 μM de IF1 _D , 0.075 μM IF3 _A , pre unido a 0.05 μM 30S	
El efecto de la llegada de factores a complejos incubados con OTC	30S- IF3 _A -OTC	0.075 μM IF3 _A , 100 μM OTC pre unido a 0.05 μM 30S	0.025 μM de IF1 _D
	30S-ARNm _D -OTC	0.025 μM ARNm _D , pre unido a 0.05 μM 30S y 100 μM OTC	0.075 μM IF3 _A
El efecto de la llegada de IF1 o IF3 <i>wt</i> en complejos incubados con OTC	30S-IF1-IF3	0.1 μM IF3 _D , 0.2 μM IF1 _A , 100 μM OTC pre unido a 0.1 μM 30S	1 μM de IF1 o IF3 <i>wt</i>
	30S PIC	0.1 μM IF3 _D , 0.2 μM IF1 _A , 0.3 μM IF2, 100 μM GTP, 0.3 μM ARNm, 100 μM OTC preunido a 0.1 μM 3 S	1 μM de IF1 <i>wt</i>
	30S IC	0.1 μM IF3 _D , 0.2 μM IF1 _A , 0.3 μM IF2, 100 μM GTP, 0.3 μM ARNm y 0.3 μM fMet-ARNt, 100 μM OTC preunido a 0.1 μM 30S	
	30S PIC _{sin GTP}	0.3 μM IF3 _D , 0.3 μM IF1 _A , 0.3 μM IF2, 0.1 μM ARNm , 100 μM OTC preunido a 0.1 μM 30S	3 μM de IF1 <i>wt</i>
	30S IC _{sin GTP}	0.3 μM IF3 _D , 0.3 μM IF1 _A , 0.3 μM IF2, 0.1 μM ARNm y 0.2 μM fMet-ARNt, 100 μM OTC preunido a 0.1 μM 30S	
El efecto de la llegada de 50S	30S IC	0.1 μM fMet-ARNt _D , 0.2 μM IF1 _A , 0.3 μM IF2, 100 μM GTP, 0.3 μM IF3 <i>wt</i> , 0.3 μM ARNm, 100 μM OTC preunido a 0.1 μM 30S	0.1 μM 50S

*El medio usado para estos experimentos fue TAKM7

3.13 FRET, Förster resonance energy transfer

La Transferencia de Energía de Resonancia Förster FRET, es un proceso físico que responde a la interacción molecular de moléculas marcadas por fluoróforos excitados, uno donante y otro aceptor de fluorescencia. Dichas modificaciones entre las dos proteínas ocurren dentro del radio de Foster, que se refiere a la distancia a la que la mitad de la energía de excitación del donante se ha transferido al aceptor, comúnmente de 3 a 6 nm (40,41). Esta herramienta permite detectar cambios en la conformación o en la distancia de moléculas en tiempo real a través de la fluorescencia emitida de las proteínas. En este caso de los factores de iniciación IF3, IF1 pueden reportar cambios estructurales y/o de sus sitios de unión en la plataforma 30S, que se evidencian mediante los cambios de fluorescencia. Todo esto se llevó a cabo en un sistema fluorímetro espectrofotómetro en tiempo real, *Stopped Flow*, (42).

3.14 LS, *Light scattering*

Este método permite observar los comportamientos de difusión de macromoléculas en una solución a través de la dispersión de la luz medida en *Stopped Flow*. Esta es proporcional al tamaño de las macromoléculas, por ello las partículas pequeñas dispersan poca luz y la formación de moléculas de tamaño mayor resultan en mayor dispersión. Así, la formación del complejo de iniciación 70S PIC pudo ser evaluada (42), considerando a una longitud de onda ($\lambda = 430$ nm), misma que se ha utilizado en la mayoría de experimentos que han usado este método. Además, esta longitud de onda es suficiente para evaluar los movimientos o colisiones de las subunidades, necesarias para la formación del complejo de iniciación, ya que se extienden a menos de 30nm (43). La onda de excitación se configuró a 430 nm y se midió la dispersión de luz perpendicular a la luz de incidencia, sin filtro alguno. El Buffer fue TAKM₇ con las mismas consideraciones de los experimentos anteriores. Para formar el complejo 70S PIC se usó como una solución 0.6 μ M IF1, 0.6 μ M IF2, 200 μ M GTP, 0.6 μ M IF3, 0.6 μ M ARNm, 0.6 μ M fMet-ARNt preunido a 0.2 μ M 30S, mientras que la otra solución contenía 0.2 μ M 50S.

3.2 Estudios de modelamiento e interacción

Para el modelamiento molecular se utilizaron los programas, MOE (*Molecular Operating Environment*) y PyMOL. Utilizando el módulo *LigPlot*, de uso bioinformático para generar representaciones de la proteína y su ligando, implementado en MOE se modificó la estructura de Tigeciclina, con una resolución de 3.417 Å (código PDB: 4YHH)(44), a Oxitetraciclina. Se retiró el grupo amino del C7 y tert-butilamino ubicado en el C9

(ambos en el anillo D); asimismo, en lugar de un grupo hidroxilo se colocó oxígeno en el C12, y viceversa se hizo en el C11 (anillo B y C, respectivamente). Debido a que ambos antibióticos pertenecen a la familia de las tetraciclinas, solo algunas modificaciones en su estructura fueron realizadas. Estos cambios luego fueron verificados usando la opción de vista de la estructura 2D en el programa. Luego se procedió con el protonado, un proceso esencial que reconstruye los puentes de hidrógeno que pudieron no obtenerse por defecto de la cristalización o modificaciones realizadas, a través de la aplicación Protonate3D. Adicionalmente, se realizó una dinámica molecular al simular dos modelos de la subunidad 30S, estos fueron rígido y semi flexible, con esto se obtuvieron la propiedades de OTC , como ligando, en unión a su receptor, 30S (45).

Por otro lado, con el fin de evaluar las aproximaciones conformacionales que tiene OTC en el ribosoma con IF1 e IF3; se alineó al modelo obtenido de la subunidad 30S en forma rígida a la estructura reportada que contiene 30S y sus factores IF1 e IF3 con la resolución de 4.2 Å (código PDB: 5LMN)(33), en el programa PyMOL (46). Con ello, estas aproximaciones fueron medidas a partir del lado de las proteínas más cercanas a OTC.

4 RESULTADOS

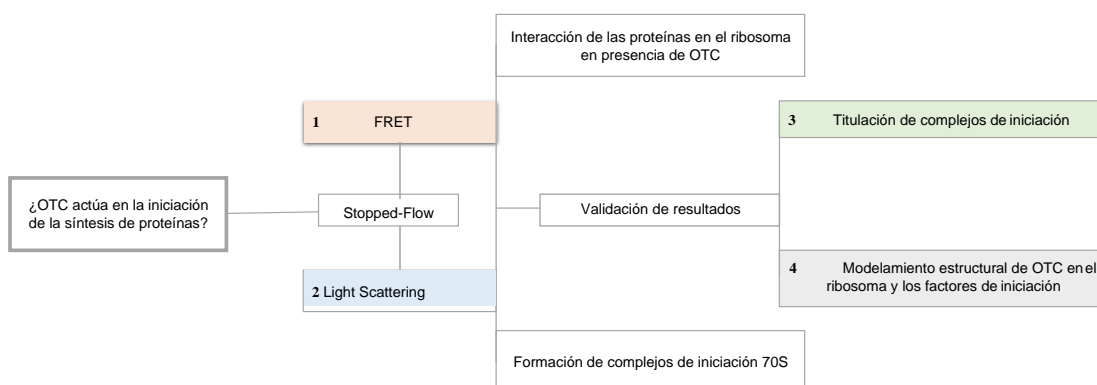


Figura 3 Esquema de análisis de resultados

Para evaluar si OTC actúa en la iniciación de la síntesis de proteínas, se usó FRET y Light *Scattering* mediante el uso del instrumento de mediciones cinéticas, *Stopped Flow*. Estos resultados fueron validados mediante la Titulación de complejos de iniciación en diferentes concentraciones de OTC y modelamiento de la estructura de 30S junto a sus factores de iniciación, IF1 e IF3 junto a OTC. A continuación, se explicará a detalle los resultados según el orden establecido del esquema.

4.1 OTC acerca los dominios N y C terminal de IF3 en la subunidad 30S

Durante la iniciación de la síntesis de proteínas, el factor IF3 es el primero en interactuar con la subunidad 30S, pues regula la unión de la subunidad 50S y así evita una unión prematura que detenga el proceso de iniciación (47). Como resultado, se obtiene el complejo de iniciación intermedio 30S-IF3 que interactúa posteriormente con IF2 e IF1 para formar el complejo 30S de pre-iniciación (Figura 2). OTC, al interactuar con la subunidad menor 30S, podría perturbar la disposición de IF3 en uno o más de los complejos intermedios mencionados. Para evaluar si efectivamente OTC promueve el reposicionamiento de IF3 en el ribosoma, se utilizó el método FRET entre los dominios de IF3 para medir mediciones de cinética rápida en el instrumento *Stopped Flow*. Este método permite medir, a través de cambios de fluorescencia en el tiempo, si los dominios de IF3 se acercan (disminución de fluorescencia observada) o se alejan (aumento de fluorescencia) en función de la interacción de OTC con el ribosoma (37). Se midió la llegada de OTC a complejos 30S-IF3DL (IF3 etiquetado con dos fluoróforos en cada dominio) utilizando *Stopped-Flow*, (Ver Métodos).

Se observó que comparado al control negativo, la presencia de OTC disminuye la fluorescencia de IF3DL en el tiempo (Figura 4A-curva roja).

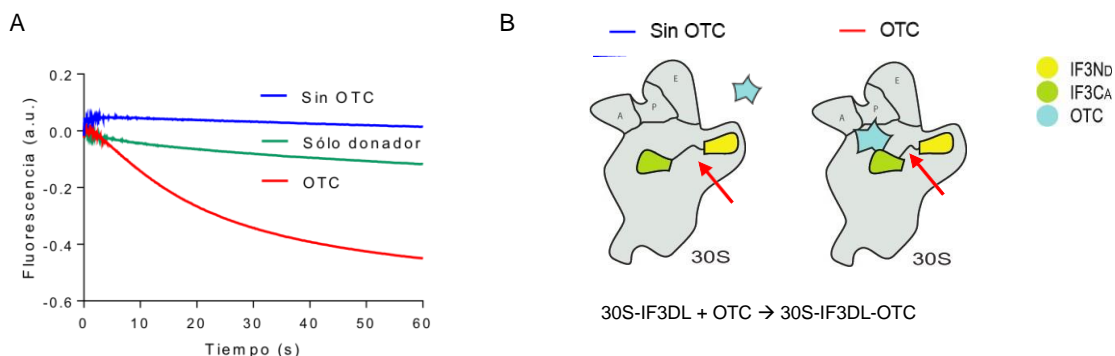


Figura 4 OTC modifica la disposición IF3DL pre-unido a la subunidad 30S

A) Análisis mediante *Stopped Flow* de cambios de fluorescencia de IF3DL en tiempo real. Se usaron complejos de 0.05 μM 30S-0.025 μM IF3DL con 100 μM OTC (curva roja) y ausencia de OTC (curva azul). Para verificar que dicho cambio de fluorescencia se produzca por la pareja de FRET, se hizo un control con 0.025 μM IF3Nb, pre unido a 0.05 μM 30S (curva verde) B) Esquema representativo del acercamiento de los dominios de IF3DL (flecha roja) ocasionados por OTC, en el ribosoma.

Este cambio indicaría que los dominios de IF3 se acercan, sin embargo, estos cambios podrían verse afectados por defectos de la mezcla en *Stopped-Flow* o FRET. Para ello, se hicieron dos controles, uno en ausencia de OTC en lo que se observa la disminución de la fluorescencia en el tiempo, pero de mucha menor magnitud a la observada cuando IF3DL se usó (curva roja comparada a la azul). Para el otro control, se hizo complejos de 30S que contenían IF3 con un solo fluoróforo donador (IF3Nb), que resultó en cambios menores (Figura 4A-curva verde), indicando que el efecto de mezcla y sucesiva dilución en el equipo no son responsables de la disminución de fluorescencia medida durante la interacción de OTC con el complejo 30S-IFDL. Así, se puede determinar que OTC promueve un acercamiento de los dominios de IF3DL pre-unido a la subunidad 30S (Figura 4B). Este acercamiento cambiaría la extensión de su velocidad en función de la concentración de OTC durante la mezcla.

4.2 Posible interacción de IF1 y OTC en 30S

Luego de haber evidenciado cambios en las conformaciones de IF3DL por OTC, se adiciono IF1 al complejo 30S-IF3DL. El factor IF1 es un elemento altamente conservado en la traducción procariota (48). Se conoce que este factor promueve las actividades de IF2 e IF3, al brindar puntos de anclaje para unirse con mayor afinidad a la subunidad 30S (49). IF1 se une al sitio A de la subunidad menor 30S, similar sitio ha sido descrito para OTC por lo que podría competir por el mismo sitio de unión (32). De manera similar al ensayo anterior, se agregó IF1 a una solución de IF3DL pre unido a 30S; se mezcló con OTC y se observaron variaciones conformacionales de IF3 en función del antibiótico. En presencia de IF1 se observa una disminución pronunciada de la fluorescencia en IF3DL al unirse OTC al complejo 30S (Figura 5A-curva roja). Así, IF1 causa que los dominios de IF3DL se acerquen también, y a la llegada de OTC este acercamiento aumenta. Dicha señal representaría que en presencia de IF1, los dominios de IF3 DL también se acercan al unirse OTC. Con dicho resultado, evidenciamos una posible coexistencia de IF1 y OTC, ambos unidos a la subunidad 30S (Figura 5B).

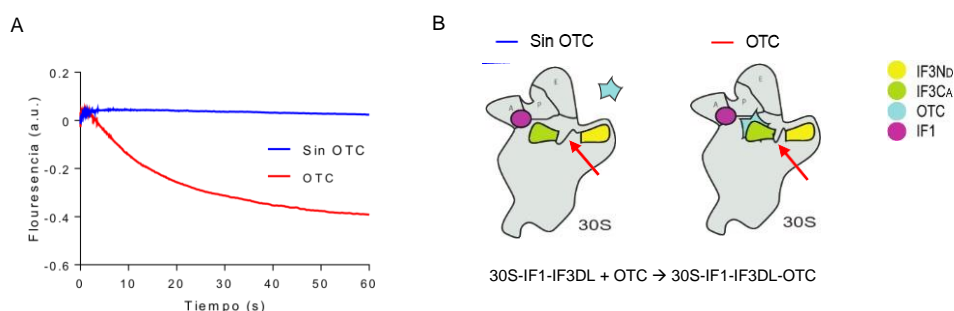


Figura 5 La presencia de IF1 en el complejo 30S-IF3DL no varía el efecto de unión de OTC a la subunidad 30S

A) Análisis mediante *Stopped Flow* de cambios de fluorescencia de 0.025 μ M IF3DL preunidos a complejos de 0.05 μ M 30S-IF1 en presencia de 100 μ M OTC (curva roja) y ausencia (curva azul). **B)** Esquema representativo del acercamiento de los dominios de IF3DL (flecha roja) en presencia de IF1.

4.3 OTC no compite con IF1

El ensayo anterior evidenció que OTC causa el acercamiento de los dominios de IF3 pre unido a la subunidad pequeña 30S inclusive en presencia de IF1. Si bien los resultados indicarían una posible coexistencia de ambos, existe también la posibilidad de una competencia entre OTC e IF1 por el mismo sitio de unión en la subunidad 30S. Para evaluar dicha posibilidad, se usó FRET entre IF1, como donador (IF1_D) e IF3 como aceptor (IF3_A) (Figura 6). Dicho FRET podría también evidenciar cambios en la interacción entre IF1 e IF3 y/o que IF1 pueda tener con OTC. Los sitios de unión de IF1 y el dominio C-terminal de IF3 son cercanos al sitio de acción de OTC (33). A complejos 30S-IF3 con fluoróforo aceptor (IF3_A) incubado con OTC o STR se evaluó la llegada de IF1 con fluoróforo donador (IF1_D), esto resultó en la disminución de la fluorescencia, similar sucedió en su control, sin OTC, que es interpretado como la unión de IF1_D a complejos 30S-IF3_D. Sin embargo, en el caso de una competencia por el mismo sitio de unión entre OTC e IF1, se plantea cómo hipótesis que OTC impida la unión de IF1 al ribosoma, como lo que se puede observar con STR (curva violeta). Se utilizó a este antibiótico (STR), como control de unión para IF1, debido a que resultados recientes del grupo de investigación sugieren que STR provoca que IF1 se disocie de la subunidad 30S. En conjunto, los resultados indican que OTC no previene la unión de IF1 a la subunidad 30S, permitiendo concluir que no existe una competición directa entre el factor de iniciación y el antibiótico.

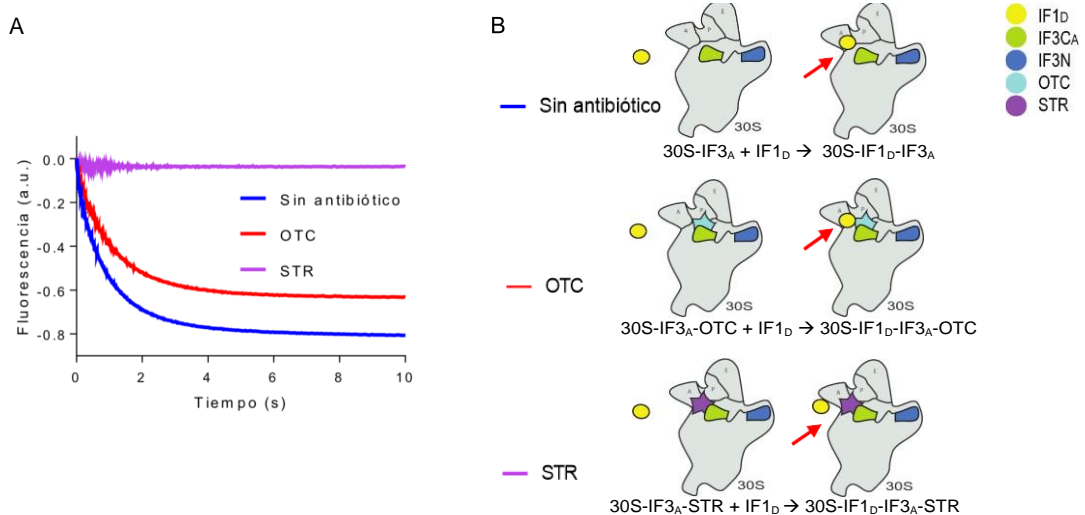


Figura 6 OTC no compite con IF1

A) Análisis de cambios de fluorescencia de 0.025 μM IF1_D en su unión a complejos de 0.05 μM 30S - 0.075 IF3_A- OTC (Curva roja), y ausencia de OTC (Curva azul). Como control positivo se reemplazó a OTC por 100 μM de STR, descrito en ensayos preliminares por su efecto en la iniciación de la traducción (Curva morada). **B)** Esquema representativo de la unión de IF1_D (flecha roja) a complejos de 30S-IF3, así como en presencia de antibióticos OTC y STR.

4.4 OTC no afecta la unión de IF3 a la subunidad 30S

Los resultados anteriores muestran perturbaciones en la conformación de IF3 inducidas por OTC. En consecuencia, OTC podría influir en la unión de IF3 a la subunidad 30S. Para verificar dicha hipótesis, se utilizó FRET entre ARNm_D previamente unido a 30S durante la unión de IF3_A. En la iniciación de traducción de las bacterias, IF3 se une rápidamente a 30S, en el rango de algunos segundos (47,50). La unión de IF3_A al complejo 30S-ARNm_D resulta en una disminución de la fluorescencia observada, debido a la aproximación de IF3_A al ARNm_D (Figura 7A, curva azul). La adición de OTC o el control STR a los complejos 30S no resultaron en grandes diferencias (Figura 7A, curvas roja y violeta) con respecto a la ausencia de los antibióticos. Esto indica que OTC no reduce la unión de IF3 a la subunidad 30S (Figura 7B). Dicha conclusión tiene en cuenta que los controles evidencian que el sistema FRET refleja la proximidad entre el ARNm e IF3 y no algún cambio de fluorescencia intrínseco del ARNm.

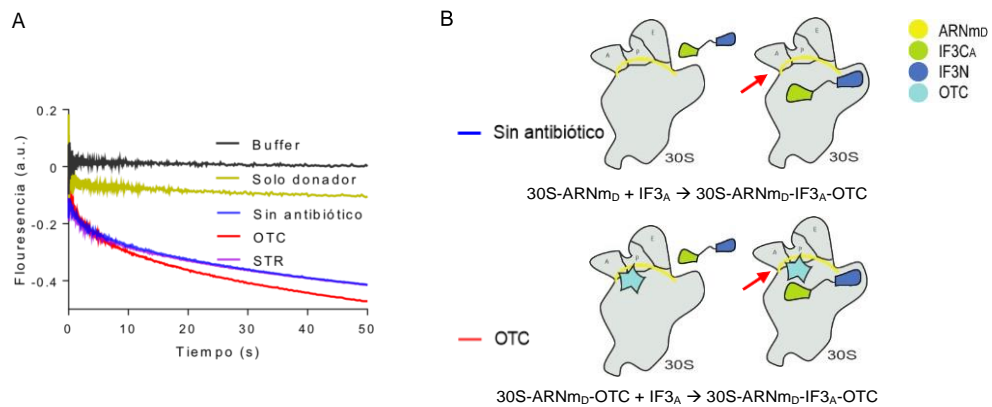


Figura 7 OTC no reduce la unión de IF3 a la subunidad 30S

A) Análisis de unión de 0.075 μ M IF3_A al complejo 0.05 μ M 30S-ARNm_D en presencia (Curva roja) o ausencia de OTC (Curva azul). Para constatar que la fluorescencia emitida sea debida a la distancia entre los reporteros fluorescentes se colocó la misma concentración de ARNm_D en presencia de IF3 (no fluorescente, Curva verde). De igual manera se incluye un control de dilución, Buffer (Curva gris) con las mismas consideraciones respecto a OTC. **B)** Esquema representativo de la unión de IF3_A (flecha roja) a complejos 30S-ARNm_D y 30S-ARNm_D-OTC

4.5 OTC promueve la reacomodación del dominio IF3C

Si bien OTC no disminuye la unión de IF3 (Figura 7), los experimentos realizados señalan que perturba los dominios de IF3 (Figura 4) aunque no indican qué dominio es afectado. Para evaluar si el dominio carboxilo de IF3 (IF3C) se reacomoda en presencia de OTC, se utilizó la pareja de FRET entre ARNm_D e IF3_A (Figura 8B), similar al experimento anterior. La diferencia yace en que ambos componentes del FRET estuvieron preunidos a la

subunidad 30S y luego fueron mezclados con OTC. La unión de OTC a dicho complejo resultó en la disminución de la fluorescencia observada, indicando el acercamiento de IF3C al ARNm (Figura 8A-curva roja). Por el contrario, los controles en ausencia del antibiótico resultaron en un ligero aumento de fluorescencia en el tiempo (curva azul). La unión de Estreptomicina, que se une al sitio A del 30S en correspondencia a IF1(51), resulta en un mayor alejamiento del dominio C de IF3 del ARNm (curva violeta), comparado al control sin antibióticos (curva azul). Este resultado indica que la unión de OTC y STR tienen efectos opuestos con respecto al posicionamiento de IF3C (Figura 8B). El resultado podría explicarse desde un punto de vista estructural, los sitios de acción de STR y OTC se encuentran en cercanía IF3C. Los efectos observados podrían resultar de la interacción directa de los antibióticos con IF3C o de lo contrario, podrían ser mediados por cambios estructurales del 30S, al cual se encuentra unido IF3C. Por otro lado, los resultados de OTC, en conjunto, indican que el dominio carboxilo terminal de IF3 se repositiona en función de la interacción de OTC con el ribosoma, acercándose al dominio N terminal (Figura 4)_y al ARNm (Figura 8B).

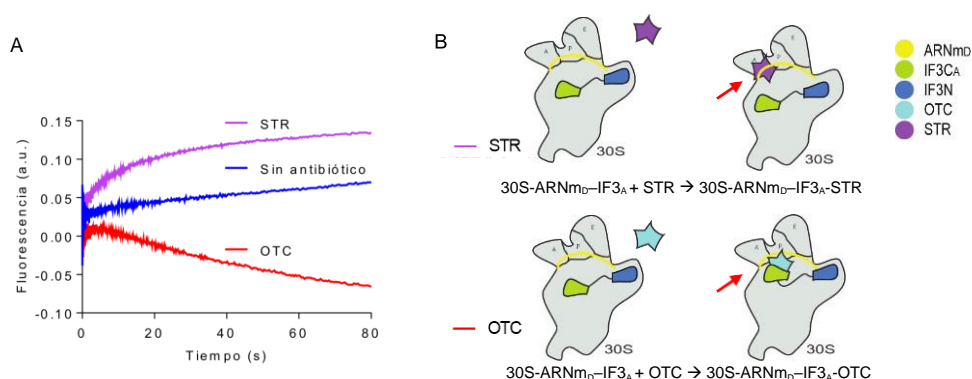


Figura 8 OTC promueve la reacomodación del dominio IF3C

A) Mediante SF se analizó los cambios de fluorescencia emitidos por $0.025 \mu M$ ARNm_D e $0.075 \mu M$ IF3_A (como pareja FRET) preunidos a $0.05 \mu M$ 30S en presencia de $100 \mu M$ OTC (Curva roja), también en su ausencia (Curva azul), control positivo (Curva violeta). **B)** Esquema representativo de la reacomodación diferente de IF3C (flecha roja) debido a la presencia OTC y STR.

4.6 OTC podría estabilizar los factores IF1 o IF3 en la subunidad 30S

El acercamiento de IF3C al ARNm y a IF3N podría resultar en una mayor estabilidad de IF1 y/o IF3 en la subunidad 30S (33). Se sugirió mediante estudios estructurales, que ambos factores interactúan durante intermedios tempranos de la iniciación (52). Por otro lado, el factor IF1 estabiliza a IF3 en la subunidad 30S (47), dicha estabilidad ha sido reportada como recíproca entre ambos factores (53). Para evaluar esta posibilidad, se utilizó la señal de FRET entre IF1_D e IF3_A (Figura 9B) para formar complejos 30S-IF1-IF3, los cuales se

mezclaron en el instrumento *Stopped Flow* con OTC, STR, o solo buffer. La mezcla de complejos 30S-IF1_D-IF3C_A con la solución control (*Buffer*) resultó en un aumento marcado de la fluorescencia en el tiempo, lo cual indica la disociación de alguno de los factores que forman la pareja de FRET debido al efecto de dilución de la mezcla (Figura 9A-curva azul). De manera similar, la mezcla con Estreptomicina resultó en una marcada disociación de alguno de los factores (Figura 9A, curva violeta). Por lo contrario, la presencia de OTC en la mezcla disminuyó notablemente dicha disociación (curva roja), indicando que OTC podría estabilizar la unión de los factores IF1 y/o IF3 en la subunidad 30S (Figura 7B).

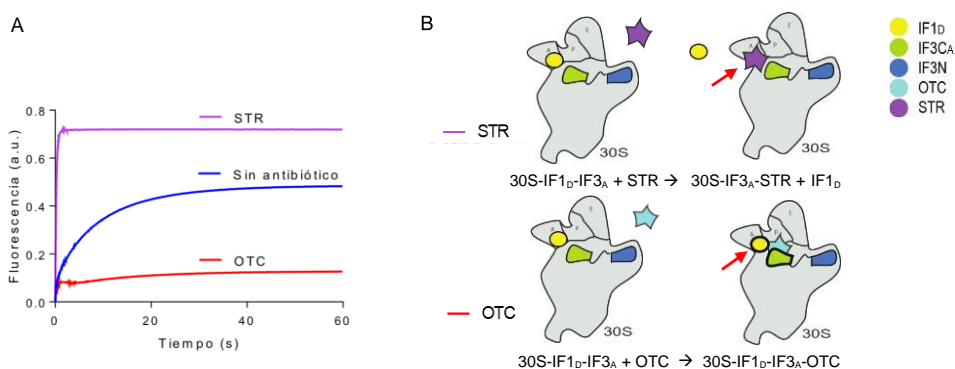


Figura 9 OTC puede estabilizar los factores de iniciación en la subunidad 30S.

A) Análisis en SF de los cambios de fluorescencia emitida de la pareja FRET, 0.025 μ M IF1_D y 0.075 μ M IF3_A, preunidos a 0.05 μ M 30S en presencia de 100 μ M OTC (Curva roja), en su ausencia (Curva azul). Asimismo, se hizo su control positivo (Curva morada) B) Esquema representativo de la diferencia de acción molecular entre STR y OTC (flecha roja) en la estabilización (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de las proteínas) de IF1 y/o IF3 en el ribosoma.

4.7 Disociación de IF1 en el complejo 30S-IF3

Los resultados de la sección 4.6 indican que OTC podría estabilizar a IF1. Para comprobar si esto ocurre, se usó el sistema FRET entre IF3_D e IF1_A, recordando que OTC actúa en el sitio A del ribosoma (32), lugar de acción IF1 (54) e cercano a IF3C (33). En los ensayos, se colocó a la pareja FRET descrita y OTC preunidos a 30S y se midió la disociación de IF1_A al mezclar el complejo preformado con diez veces de exceso de IF1_{wt} (Ver métodos). Los controles en ausencia de OTC resultaron en un aumento de fluorescencia en el tiempo, esto es debido a que el exceso de IF1 *wt*, que no contiene fluoróforos, compite con IF1_A el cual es alejado de 30S e IF3_D (Figura 10A - curva roja) (Figura 10B). En presencia de OTC la disociación de IF1_A resultó en una menor amplitud reacción. Las diferencias observadas podrían indicar que OTC provoca la disociación (limitada) de IF1. Los resultados mostrados en la Figura 7 indican que OTC no perturba la unión de IF3 y estabiliza a IF1 (Figura 9). Como consecuencia, el menor FRET observado en presencia de OTC sería explicado por

una estabilización de IF1. Efectivamente, la Figura 8 indica que OTC reposiciona el dominio C de IF3. De este modo, OTC podría estar provocando la estabilización de IF1 (Figura 10), que dé consecuencia fomenta el movimiento de IF3C.

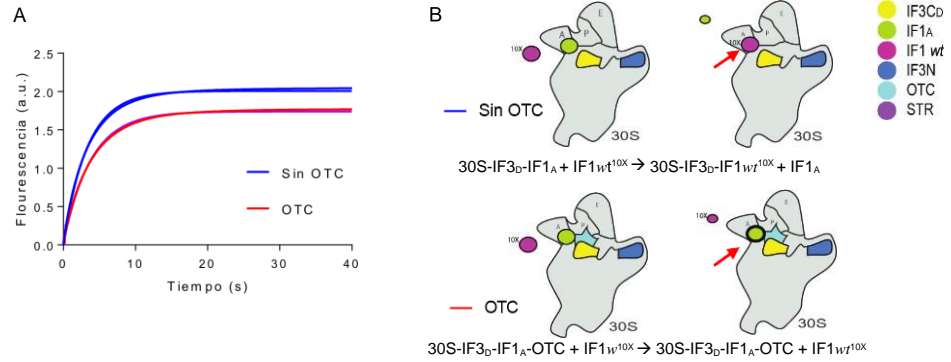


Figura 10 Disociación de IF1 en el complejo 30S-IF3

A) Análisis de disociación de IF1_A en el tiempo de complejos de 0.1 μ M 30S-IF3_D-IF1_A al mezclarse con de 1 μ M IF1 *wt*^{10X}, sinfluoróforo, en presencia de OTC (Curva roja), en ausencia de OTC (Curva azul).

B) Esquema representativo de la estabilización de IF1_A (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de la proteína) en el complejo 30S-IF3_D-IF1_A y OTC (flecheroja).

4.8 Disociación de IF3 en el complejo 30S-IF1

En otra instancia, se midió la disociación de IF3_D utilizando un exceso de IF3 *wt* en el mismo sistema FRET de la sección anterior (Figura 10), mostrando que la reacción es similar a lo reportado en exceso de IF1 (Figura 10B y 11B). Es decir, la disociación de IF3 en 30S es afectada por OTC, al igual que IF1 (Figura 11B). De manera similar, estudios previos indicaron una relación cooperativa entre IF1 e IF3, en especial la unión de STR, un antibiótico con similar sitio acción en la subunidad menor 30S (55), rompe dicha cooperación (35). Un estudio reciente sugiere que la separación de los dominios de IF3 estaría relacionado con la disociación de los factores (37). Si bien OTC promueve el acercamiento de los dominios de IF3 en la subunidad 30S, también favorecería a la relación cooperativa de IF1 con IF3, contrario al efecto de STR, pues OTC reduce la disociación de ambos factores con un patrón similar (Figura 10 y 11).

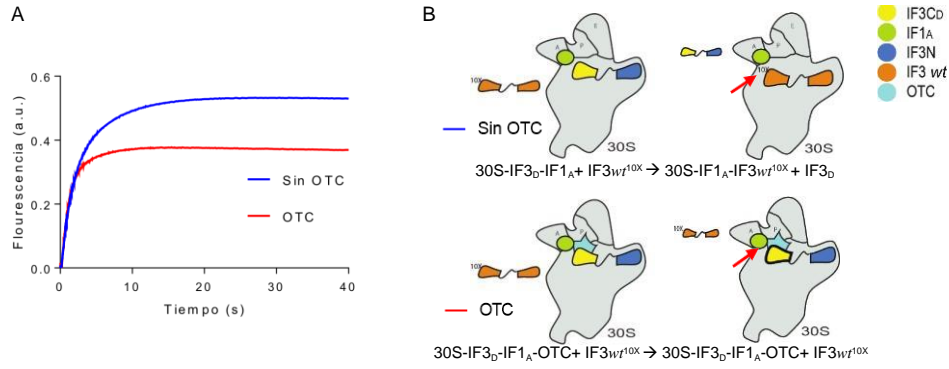


Figura 11 Disociación de IF3 en el complejo 30S-IF1

A) Análisis de disociación de IF3_D de complejos 30S-IF3_D-IF1_A durante la mezcla con 1 μM IF3 wt^{10X}, sin fluoróforo, en presencia de OTC (Curva roja) o en ausencia de OTC (Curva azul) **B)** Esquema representativo de la estabilización de IF3_D (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de la proteína) en el complejo 30S-IF3_D-IF1_A y OTC (fleche roja).

4.9 Disociación de IF1 en el Pre Complejo de Iniciación por OTC

La afinidad de IF3 al ribosoma, es mayor que IF1, sin embargo, es esta proteína la que la estabiliza (28). Por ello, la relación cooperativa de ambas proteínas a la que contribuye OTC, puede ser ocasionado principalmente por IF1 (48). Así, la disociación de IF1, comparada a IF3 tendría mayor protagonismo. Para evaluar el efecto de OTC en la disociación de IF1 en otros complejos intermedios, se utilizó el FRET entre IF3_D e IF1_A, de manera similar a los experimentos anteriores utilizando un exceso de IF1 sin fluoróforo para medir la disociación del factor. El complejo de pre-reiniciación (PIC) requirió la incubación de los complejos 30S-IF1-IF3 con ARNm e IF2-GTP. IF2 se encarga de promover la unión del ARNt de iniciación y de la unión de la subunidad 50S. Durante este último paso, IF2 hidroliza el GTP en GDP y fosfato (56,57). Dichas funciones de IF2, en conjunto con IF1 e IF3, previenen la unión prematura de la subunidad 50S (49,58). Además de ello, la unión del ARNm proporciona al ribosoma el substrato para decodificar la información genética de los codones en aminoácidos de la cadena peptídica (20). La disociación de IF1 en el complejo 30S PIC en presencia de OTC resulta en una menor amplitud de fluorescencia, comparado a la ausencia de OTC, curva azul (Figura 12A). Dicha observación reafirma que OTC contribuye con la estabilización de IF1_A también en el complejo 30S PIC (Figura 12B). La presencia de IF2 puede no afectar las conformaciones del complejo (33), contrario al ARNm, ya que sus movimientos son influenciados por IF3C, para que este sea ubicado en el sitio A del ribosoma (59) que también es cercano a IF1(49,60). Sin embargo, ensayos de cinéticas rápidas sugirieron que IF2 disminuye la velocidad de disociación de IF1 (47). Es así que la

presencia del ARNm y/o IF2 podrían contribuir en la estabilización de IF1 si se comparan complejos de 30S PIC a complejos 30S-IF1-IF3. En ambas instancias, OTC actúa disminuyendo la disociación de IF1.

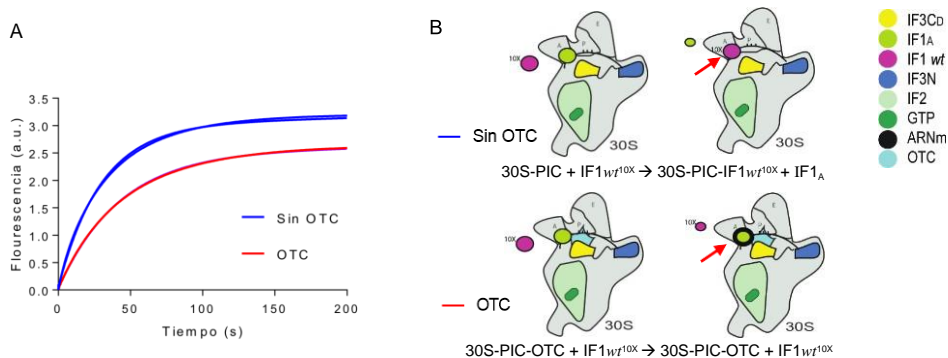


Figura 12 Disociación de IF1 en el Pre Complejo de Iniciación

A) Análisis de disociación de IF1_A de complejos 30S de pre-Iniciación mediante SF. Se analizaron los cambios de fluorescencia de la pareja FRET IF3_D e IF1_A en complejos de 30S PIC (0.1 μM) con OTC (Curva roja) y sin OTC (Curva azul) al mezclarse con 1 μM IF1^{10X}, sin fluoróforo. **B)** Esquema representativo de la estabilización de IF1_A (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de la proteína) en el complejo 30S PIC y OTC (fleche roja).

4.10 Disociación de IF1 en el Complejo de Iniciación por OTC

Al complejo 30S PIC se agregó fMet -ARNt para formar complejos de iniciación 30S (30S IC, por sus siglas en inglés *initiation complex*). La aceleración del reclutamiento del fMet-tRNA hacia la subunidad 30S, esta mediada por IF2 (61). En este proceso, el reconocimiento del codón – anti codón del fMet-tRNA y ARNm resulta en complejos 30S IC listos para aceptar la subunidad mayor 50S (52). Para verificar si OTC actuaría también en el 30S IC, se midió la disociación de IF1 de dichos complejos, de manera similar a los experimentos arriba descritos (Figuras 10 y 12). La disociación de IF1 se reporta de manera proporcional, al aumento de fluorescencia emitido por cada complejo intermediario de iniciación. Es decir, a mayor aumento de fluorescencia, mayor es la disociación de IF1 (Figura 13). En esta vía, la disociación máxima, medida a partir de la emisión de fluorescencia, es de aproximadamente de 2.9 a.u. para el complejo 30S PIC, mientras que para el 30 IC fue de 1.9 a.u (Figura 13). Dicha diferencia podría ser ocasionada por la incorporación de fMet-ARNt, que está modulado por IF2 e induce a cambios conformacionales del ribosoma (30S)(58,62). Se ha reportado que, la formación de este complejo 30S IC provoca que la disociación de IF1 sea menor comparada a sus complejos previos(47), probablemente porque

se encuentran en su proceso de formación. No obstante, uno de estos complejos, 30S-IF1-IF3, presenta cambios de fluorescencia similar a 30S IC, lo que puede estar relacionado con el reposicionamiento de IF3C en el ribosoma que cambia en función a la llegada de IF1 y fMet-ARNt (34). Por lo tanto, OTC influye en la disociación de IF1 en complejos 30S IC (Figura 14), sin embargo la formación de estos complejos puede ser influenciado por fMet-ARNt de tal modo que la disociación de IF1 sea menor comparada a 30S PIC (Figura 13).

Figura 13 Comparación de la amplitud (cambio de fluorescencia) entre los complejos de iniciación

Se promedió las últimas mediciones de la disociación de IF1 (N=10) en los complejos intermedios de la iniciación. Barras de error indican la desviación estándar.

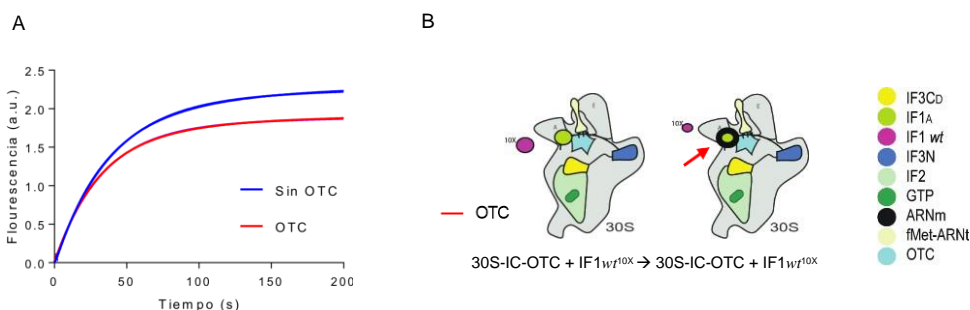
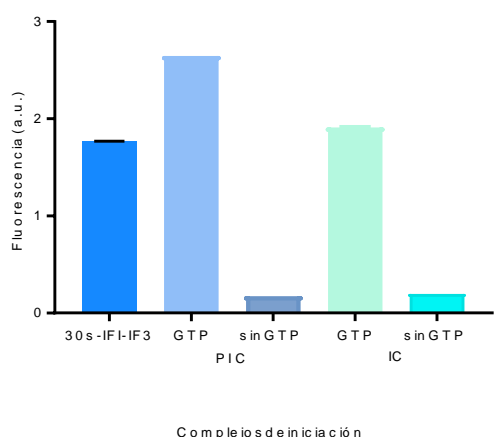


Figura 14 Disociación de IF1 en el Complejo de Iniciación por OTC.

A) Mediante SF, se analizaron los cambios de fluorescencia de la pareja FRET IF3_D e IF1_A en 0.1 μ M complejos de 30S IC con OTC (Curva roja) y sin OTC (Curva azul) en contra de otra mezcla de 1 μ M IF1^{10X}, sin fluoróforo. B) Esquema representativo de la estabilización de IF1_A (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de la proteína) en el complejo 30S IC y OTC (flecha roja).

4.11 Disociación de IF1 en ausencia de GTP

La formación del complejo de iniciación requiere GTP (*guanosine triphosphate*, por sus siglas en inglés), pues es esencial para IF2 (56). Además, la hidrólisis del GTP facilita la salida de los factores de iniciación luego de la unión del 50S (52). Para evaluar si la disociación de IF1 en los complejos PIC e IC es afectada por ausencia de GTP se utilizó el sistema de FRET anteriormente descrito, (Figura 14) con IF3_D e IF1_A. La fluorescencia

emitida debido a la disociación de IF1 del 30S PIC-OTC y 30S IC-OTC sin GTP aumenta comparada al que no tiene OTC (Figura 15). De manera invertida sucede cuando GTP es incubado en el 30S PIC e IC, ya que la fluorescencia total relativa a la disociación de IF1 es menor con OTC (Figura 12 y 14). En ausencia de GTP, se observa mayor disociación de IF1 en el 30S PIC e IC en presencia de OTC. Sin embargo, el cambio de fluorescencia en ambos complejos sin GTP son menores (0.2 a.u. y 0.3 a.u. respectivamente) si son comparados a los otros complejos con GTP (Figura 13). En general, dicha observación indicaría que la capacidad de disociación de IF1 es menor en ausencia de GTP (Figura 13). IF2 es dependiente de GTP, pues se une a su dominio G2 y este sumado a G3 permite la unión del factor a la subunidad 30S (63). Asimismo, en ausencia de este nucleótido trifosfato, IF2 puede bloquear a IF1, pues su dominio G e IF1 son cercanos (33). Si bien no existen diferencias marcadas entre los dos complejos (30S PIC y 30S IC), la pequeña variación del IC sin GTP puede deberse a la incorporación del fMet-ARNt, pues IF2-CTD presenta cambios conformacionales a través de su dominio G (lugar de acción de GTP) con el fin de optimizar el alineamiento de fMet-ARNt en el ribosoma (64). Por ello, en ausencia de GTP, IF2 puede desestabilizarse o provocar un efecto a lo largo de la subunidad 30S, llevando a una menor o mayor disociación de IF1, lo cual no se ha podido definir con este experimento. Cabe recalcar que no se han encontrado estudios que determinen la interacción de IF1 e IF2 en el ribosoma en ausencia de GTP. Experimentos futuros ayudarían a interpretar a profundidad esta interacción.

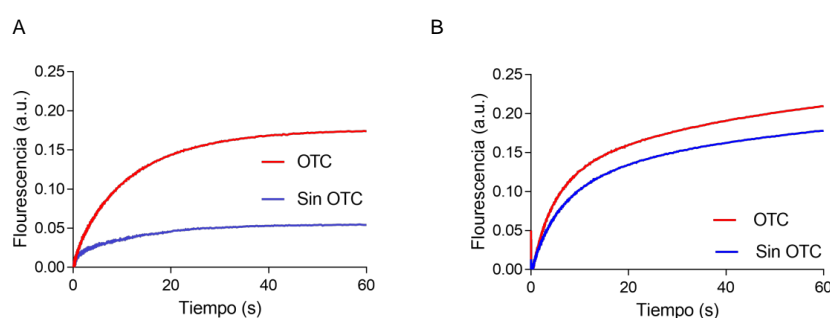


Figura 15 La ausencia de GTP y el efecto de OTC

A) Análisis mediante SF de la disociación de IF1 a partir de complejos formados en ausencia de GP. Se mezcló 0.1 μ M 30S PIC formados con IF3_D, IF1_A y 100 μ M OTC (curva roja) o sin OTC (curva azul) con 3 μ M IF1 10X *wt*. **B)** Se agregó 0.2 μ M fMet-ARNt a la mezcla A (curva roja) sin OTC (curva azul)

4.12 OTC inhibe la formación del complejo de iniciación 70S.

Mediciones de todos los pasos intermedios de la formación de complejos 30S IC, previos a la unión de la subunidad 50S, indicaron que OTC aumenta la unión de IF1 por la subunidad 30S. Dicha estabilización acumulada debería resultar en una reducida capacidad de formación de complejos 70S capaces de traducir el ARNm. Para evaluar directamente dicho supuesto, se utilizaron dos métodos; el primero usó *Light Scattering* (ver métodos) para medir la asociación de las subunidades ribosomales. Por una parte, se incubaron los componentes necesarios para la formación de 30S IC y luego se mezcló con la subunidad 50S en el instrumento *Stopped Flow*. Cuando se observa mayor emisión de luz se debe a la formación de algún complejo de mayor tamaño con respecto a los reactivos iniciales, en este caso el aumento se debe a la formación de complejos 70S (42). En presencia de OTC, (Figura 16A, curva roja) se observa una menor emisión de luz comparada a la curva azul en la que no está presente OTC (Figura 16A) que resulta en 41% de inhibición final en la formación del complejo 70S (Figura 17B). El método LS, también fue aplicado a estudios de STR, similar al experimento con OTC pero en variaciones de concentraciones de IF1, evidenciando la disminución de la afinidad de este factor, que fue apoyado por otros experimentos FRET (35) y que resultaron en una formación rápida de complejos de iniciación 70S. Una vez que la subunidad mayor se une al complejo de iniciación 30S IC, los factores deben disociarse para permitir la traducción del ARNm (52). Nuestros experimentos previos indicaron que OTC estabilizaría IF1 en la subunidad 30S, lo cual resultaría en una menor disociación del factor luego de la unión del 50S (58). Con el mismo fin de medir dicho supuesto, se utilizó una señal de FRET entre el fMet-ARNt (de iniciación) como donador e IF1 como aceptor (Figura 16B). En este diseño experimental, el fMet-tRNA_D queda como parte del complejo final 70S mientras que el factor IF1_A se disocia, como resultado se espera un aumento de fluorescencia observada. En la curva azul de la figura 16A, en ausencia de OTC, se aprecia un aumento de fluorescencia que evidencia la disociación de IF1, lo cual permite la formación del complejo 70S. Sin embargo, en presencia de OTC se observa un menor aumento de la fluorescencia, indicando así que IF1 se estabiliza en el ribosoma (70S). Dichos efectos a través de estos distintos métodos, resultan en una menor formación de complejos 70S de iniciación capaces de traducir el ARNm.

En resumen, OTC perturba los dominios de IF3; específicamente el dominio C-terminal que se reposiciona en presencia del antibiótico y resultara en la disociación de 30S. De manera

cooperativa el reposicionamiento de IF3C e IF1 puede estar mediado principalmente por IF1, probablemente por su cercanía a OTC. En los diferentes complejos intermedios, OTC estabiliza a IF1 teniendo efectos acumulativos que incrementan desde complejos 30S-IF1-IF3 (15%) hasta la formación el complejo de iniciación 30S IC (40%) (Figura 17A). A esto se le denominó la estabilización acumulada de IF1, que es similar a lo reportado en la inhibición final de la formación del complejo 70S (Figura 17B).

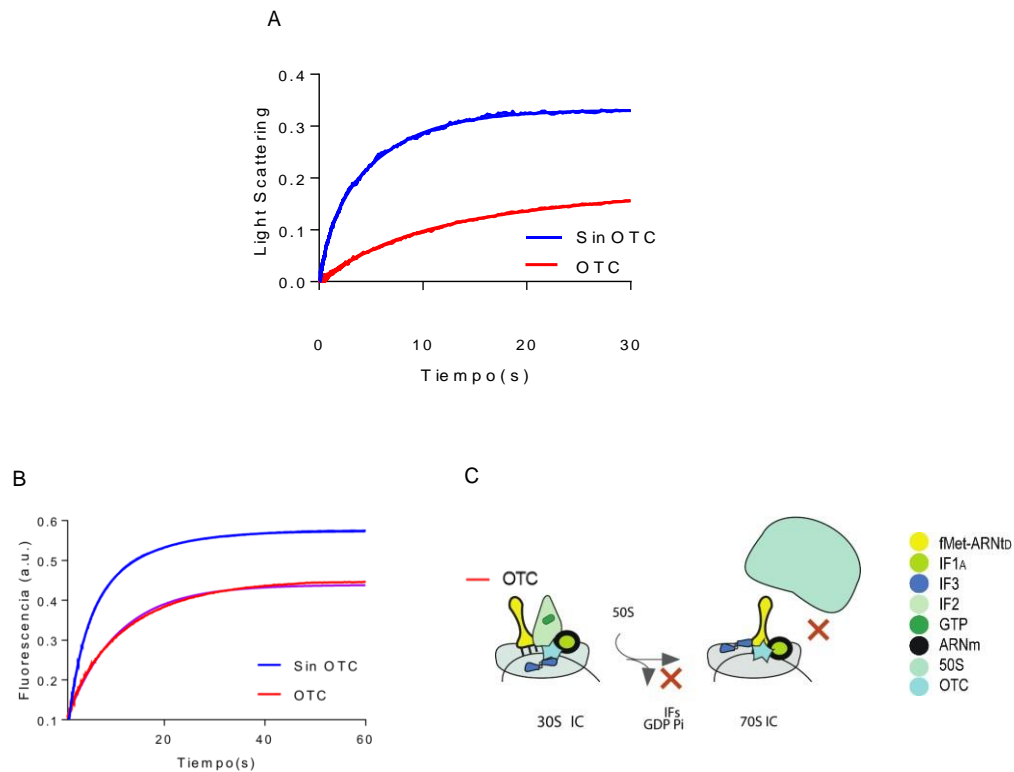


Figura 16 OTC reduce la velocidad de asociación de 70S

A) Análisis cinético de formación del complejo de iniciación 70S mediante el método *Light Scattering*. Se mezclaron $0.1 \mu\text{M}$ de 30S IC, en presencia de $100 \mu\text{M}$ de OTC (Curva roja) o en ausencia (Curva azul) con $0.2 \mu\text{M}$ 50S en el equipo *Stopped Flow*. **B)** Análisis de la disociación de IF1_A durante la asociación de $0.1 \mu\text{M}$ de 50S a $0.1 \mu\text{M}$ de complejos 30S IC. Los cambios de fluorescencia emitidos reflejan el FRET entre $0.1 \mu\text{M}$ fMet-ARN_{td} y $0.2 \mu\text{M}$ IF1_A, en presencia de $100 \mu\text{M}$ de OTC (Curva roja) o en ausencia (Curva azul). **C)** Esquema representativo de la estabilización de IF1 mediada por OTC durante la llegada del 50S.

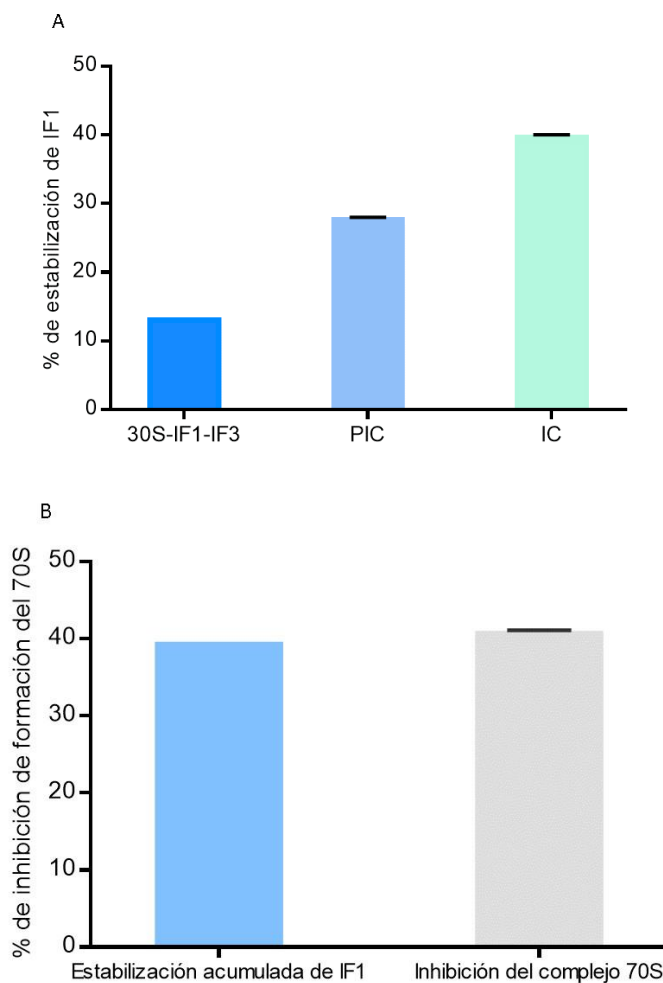


Figura 17 Inhibición de la formación del complejo 70S como resultado de la estabilización de IF1 en los complejos intermedios de la iniciación.

A) Análisis de inhibición relativa en los complejos intermedios respecto a la estabilización de IF1 **B)** Comparación de la estabilización acumulada de IF1 proveniente de todos los complejos (A) y la inhibición final reportada durante la llegada del 50S.

4.13 Titulación de las concentraciones de OTC en presencia de IF3 DL

Como un método para evaluar la especificidad y verificar si los resultados expuestos son coherentes a las señales observadas, se eligió uno de los experimentos FRET realizados para evaluar si los efectos observados dependen de la concentración del antibiótico y con ello obtener su titulación. Se decidió colocar diversas concentraciones de OTC, que iban desde 5 a 200 μM , pues no se ha encontrado publicaciones con la concentración mínima de acción. Así, se usaron concentraciones crecientes de OTC (5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM) en el sistema de FRET IF3DL y se observaron los cambios de fluorescencia. Dos efectos se evidenciaron al aumentar la concentración de OTC, un aumento de la magnitud de cambio (amplitud, hasta 0.5 a.u de fluorescencia a 100 μM de OTC) y un aumento de velocidad de cambio (Figura 18A). También se quiso evaluar si el cambio estructural reportado en IF3 varía en presencia de IF1. Los resultados evidenciaron que en concentraciones menores (5 μM , curva roja, 10 μM , curva verde) producen inicialmente que los dominios de IF3 DL se separen, pero concentraciones mayores (50 μM , curva amarilla, 100 μM , curva negra) tienen

un efecto opuesto (Figura 18B). Estas dos titulaciones concluyen que los resultados son indicadores de que los efectos observados son específicos a OTC y también que, con 100 μM se alcanza máxima acción de OTC.

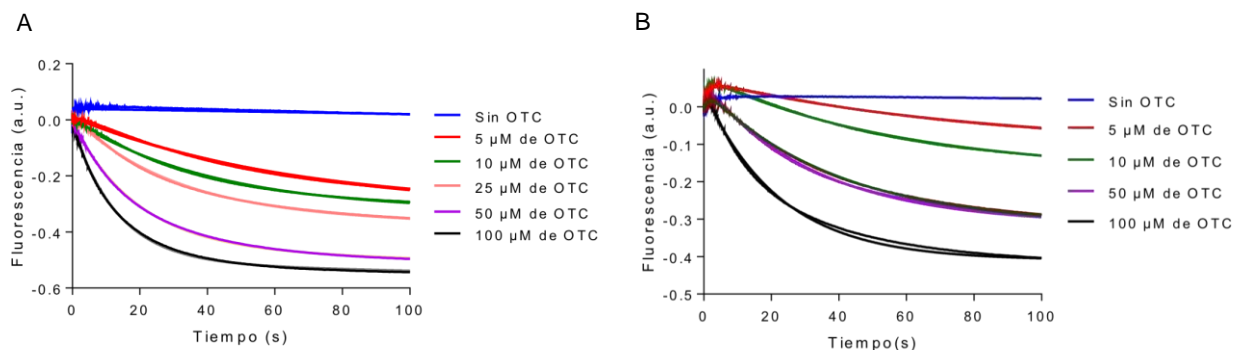


Figura 18 Los cambios conformacionales de IF3 dependen de la concentración de OTC

A) Titulación de la acción de OTC en complejos 30S-IF3DL. Se mezcló 0.025 μM IF3 DL pre unido a 0.05 μM 30S en diferentes concentraciones. **B)** De la acción de OTC en complejos 30S-IF3DL-IF1 se mezcló 0.025 μM IF3 DL pre unido a 0.05 μM 30S y 0.2 μM IF1 en contra de diversas concentraciones de OTC.

4.14 Modelo estructural del complejo 30S-IF1-IF3-OTC

Otro método para validar la especificidad de la interacción OTC con complejos de iniciación 30S se realizó través de programas informáticos PyMOL y MOE a partir de estructuras atómicas reportadas (33,44) (Ver métodos). Estructuras de OTC unido a la subunidad 30S no han sido reportadas aún. Por primera vez, se ha modelado la estructura de OTC en la subunidad menor 30S, este diseño se hizo por modificaciones de Tigeciclina (PDB:4YHH), también de la familia de Tetraciclinas (44). A este se modelo se agregó la estructura molecular de los factores de iniciación IF1 e IF3 reportados en otros estudios (PDB:5LMN)(33)(ver métodos). Los resultados cinéticos refieren a cambios de IF1 e IF3C debido a la presencia de OTC, que resultan en la inhibición de la formación del complejo 70S. Para evaluar una posible relación estructural en las mediciones cinéticas, se estudiaron las estructuras tridimensionales de 30S, IF1, IF3 junto a OTC (Ver métodos). Según estudios previos, indican que el trabajar con la estructura rígida del receptor es mejor para el acoplamiento de su ligando (65). Por ello, se usó el modelo de 30S-OTC con la subunidad (30S) rígida y así se obtuvo una estructura óptima donde OTC se acopla al 30S. Los resultados indican que, OTC se une cerca de IF1, IF3C, todo ello observado en la estructura de la subunidad 30S unida a los factores y OTC (Figura 19A). La cercanía de IF1 e IF3C ha sido reportada recientemente por estudios estructurales (33), pero no en presencia de OTC. Con la subunidad 30S modelado en forma rígida, es decir no habrá ningún movimiento de

30S ni de su ligando, se observa que OTC dista de IF1 a 6.9 Å (Figura 19B). Dichas distancias, relativamente cercanas sugieren que OTC podría interactuar con IF1 resultando una mayor afinidad y estabilidad de este factor. Por otro lado, OTC se posiciona a casi 16 Å de IF3C lo cual podría excluir una interacción directa (Figura 19B). Sin embargo, la posición de IF1 podría favorecer una mayor interacción con IF3C. Un hecho relevante es que la aproximación estructural que se utilizó fue el modelo con la subunidad 30S rígida y no semi flexible, la cual podría limitar una posible evidencia de interacciones directas entre IF3C y OTC (Figura 19A-B), pues en este modelo, los factores podrían moverse en la subunidad 30S.

Por ello, se usaron ambos modelos, para estudiar con mayor detalle las interacciones del 30S con OTC. Las interacciones son similares a lo reportado en los cristales de Tetraciclinas (44,66) comparados al cristal con la subunidad rígida. Por otro lado, la comparación del modelo rígido y ligeramente flexible de 30S postula tres diferencias basadas en los movimientos de las bases nitrogenadas G966, A965, (h31) C1195, U1196, G1197 (h34) (Figura 19C-D). Esto podría estar indirectamente afectado por Mg^{2+} y su interacción con el grupo fosfato con algunas de las bases nitrogenadas (U1996) (44). El movimiento del A965 supone una interacción de aceptor de cadena lateral cuando la subunidad pequeña de las bacterias se encuentra en movimiento (Figura 19C) y cercano a esta base, está G966, que se ha observado apilado al anticodón del ARNm con IF3C e IF1 en 30S (33). El análisis también permitió calcular la afinidad (Ver métodos), el resultado de la energía libre de unión a ligando, que en ambos modelos muestran valores similares que podrían estar dentro de una desviación estándar (67). Pues para la subunidad 30S de modelo semi flexible se obtuvo la afinidad de 9.5 kcal/mol y para el modelo 30S rígido, 8.7 kcal/mol; estos valores indican la afinidad de OTC a 30S. Este modelo estructural supone que OTC se posiciona cerca de IF1 e IF3C, pero con mayor acercamiento a IF1 (Figura 19). En conjunto, todos estos resultados brindan una explicación estructural de los cambios de cinética reportados en FRET y LS.

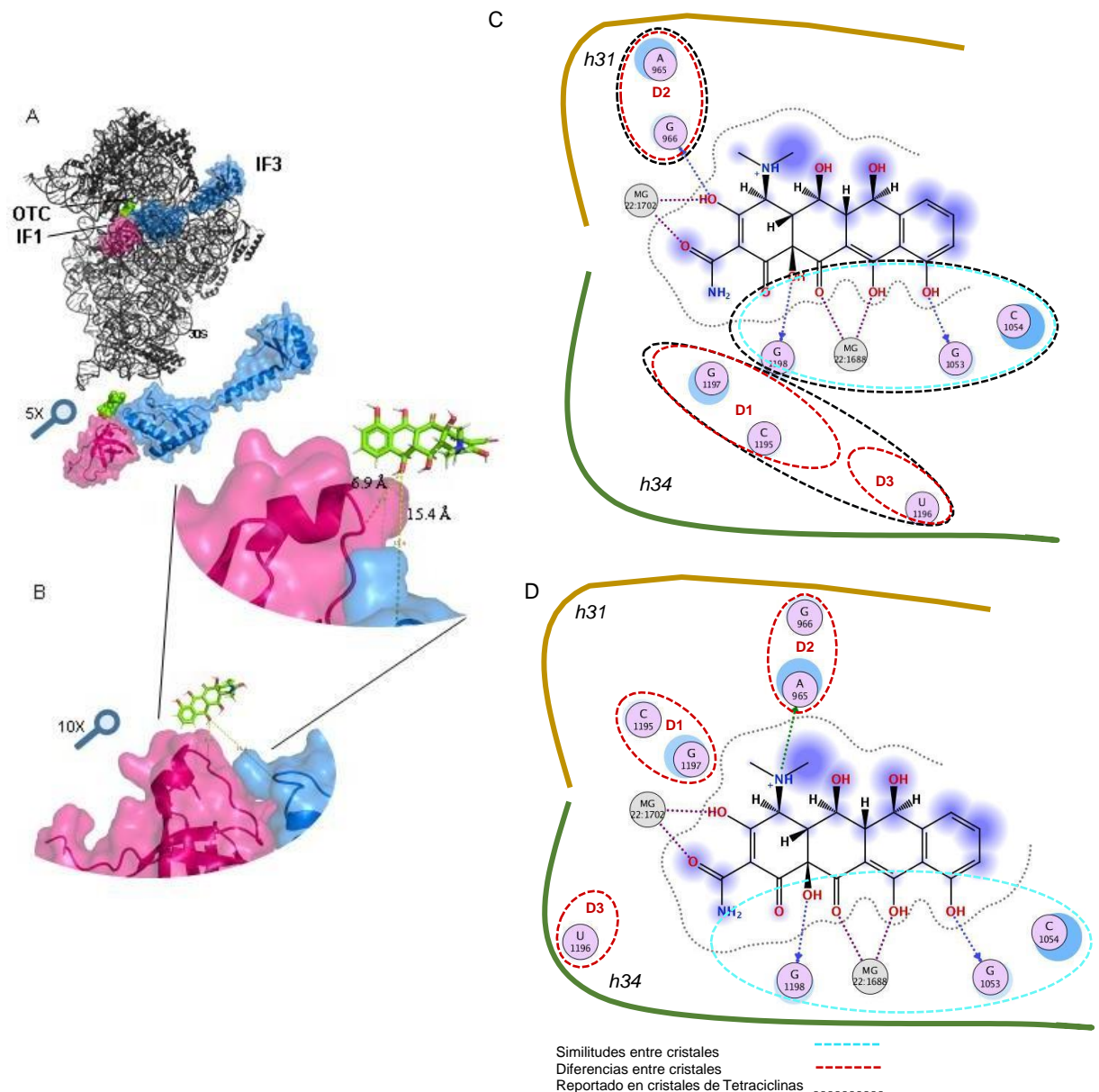


Figura 19 OTC se posiciona cerca de IF1 e IF3C

A) Análisis de la estructura 30S-IF1-IF3 (código PDB: 5MLN) y modelamiento de la estructura de OTC (PDB: 4YHH) (Ver métodos). **B)** Aproximaciones del modelo 30S-IF1-IF3-OTC en el que se observa la cercanía de los factores de iniciación a OTC. **(C y D)** Minimización energética de las interacciones de OTC con el complejo de iniciación 30S ilustran detalles de las interacciones de OTC en modelos del 30S semi flexible **(C)** y rígido **(D)**

5 DISCUSIÓN

La formación del complejo 70S se ralentiza en presencia de OTC. Por otro lado el efecto acumulativo de estabilización del factor de iniciación IF1 alcanza un 40% en el complejo 30S IC, muy similar al porcentaje de inhibición del complejo 70S, 41%. De esta manera, en presencia de OTC hay menor formación de complejos 70S y que además los complejos que se pueden formar en el porcentaje restante (59%) presentarían reacciones lentas por la estabilización de IF1, que puede afectar a cerca de la mitad de esos complejos formados (Figura 20). Se han reportado otros antibióticos que afecten la formación del 70S. Entre ellos los macrólidos que se unen al sitio P de la subunidad grande 50S, con acción inhibitoria en la elongación (68). Por otro lado, se ha reportado que el antibiótico GE81112 al impedir la formación del 30S IC previene la unión de la subunidad 50S (69). No se han reportado antibióticos con mecanismos de acción similares a los observados en el presente estudio, mediados por una estabilización de alguno de los factores de iniciación.

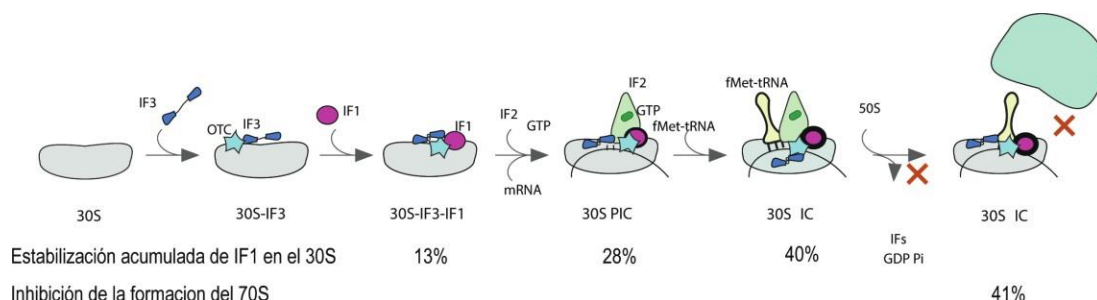


Figura 20 Diagrama de iniciación de la síntesis de proteínas y representación de los pasos afectados por OTC

Efecto de OTC en cada complejo intermedio de la iniciación de la síntesis de proteínas de las bacterias, la estabilización de IF1_D (representada como aumento del grosor del borde del dibujo de la proteína) y la inhibición del complejo 70S (equis de color rojo).

La formación del complejo 70S está regulado por los factores de iniciación que, como se ha evidenciado, son afectados también por OTC, uno de ellos es IF3. Se sabe que el OTC actúa en el sitio Tet -1, pero refieren que hay seis sitios de unión en la subunidad 30S y que no tienen un rasgo estructural común (32), por lo que es posible que este antibiótico actúe en otros lugares de la subunidad 30S, como el denominado sitio P, que está junto al C terminal de IF3. Esto, pues, abre un debate, ya que los dominios de IF3 pueden desplazarse en la subunidad 30S (70). Por su parte, IF3C se une de manera consistente a la subunidad menor y es el dominio más perturbado por OTC, a diferencia de IF3N (71). Pero esto no lo hace imprescindible, ya que se necesita la acción de ambos dominios para el correcto funcionamiento (72).

La disociación afectada de IF1 y la perturbación de IF3C por OTC podría deberse a su posición estructural en la subunidad 30S. Mientras que IF1 actúa en el sitio A del 30S, IF3

probablemente lo hace en ambos, P y A (33). IF1 estimula la formación del complejo de iniciación, y se cuestiona si puede prevenir la unión temprana de 70S como lo hace IF3 (52). Dicha acción puede ser respaldada por su posición cercana en el sitio A del 30S (33). Así, la interacción observada de IF1 con IF3, puede deberse a su cercanía traducida en acciones similares o dependencia de ambos factores (33,73). Existen ciertas dependencias como se ha evidenciado al encontrar que la unión de IF3 al 30S dependía de las concentraciones IF1 (52). Asimismo, se denota una función de fidelidad al observar que en ausencia de IF1, la formación de 70S prematuro aumentaba, es decir la función de IF3 se veía afectada (35). Es claro que IF1 e IF3C interactúan tal y como lo han demostrado los resultados cinéticos y de modelamiento.

La menor disociación de IF1 en complejos 30S PIC con respecto al 30S IC pueden deberse a la presencia del ARNm, efectivamente estudios evidencian que los distintos tipos de ARNm, como los no canónicos reportaban diferencias en la disociación de IF1 (35). Los resultados muestran que OTC produce un acercamiento entre IF3-C y ARNm. El lado C terminal del factor de iniciación 3 (IF3) es cercano al extremo proximal 3' cerca del anti-Shine – Dalgarno (anti-SD), secuencia que lo conecta al ARNm (74).

Reportes recientes sugieren la existencia de al menos dos vías de iniciación (31,75). La primera y más utilizada por las bacterias usa tres factores de iniciación, IF1, IF2 y IF3, para promover la unión del ARNm mediante la secuencia Shine – Dalgarno (SD) y el ARNt de iniciación (76). La diferencia de cambios de fluorescencia emitidos por complejos 30S PIC e IC (Figura 11), puede deberse a la incorporación del ARNt, ya que el dominio C de IF3 es desplazado con su llegada. Además sería la única diferencia de estos complejos 30S e IC, ya que incluso ambos complejos fueron formados con el mismo de ARNm. La segunda vía de iniciación, en donde la unión del ARNt y ARNm es directa al ribosoma 70S, el mensajero carece de secuencias líderes como SD, también llamado *Leaderless* (LL) (77). Dicha vía, de preferencia, no requiere los factores de iniciación durante el reclutamiento del ARNm a la subunidad 30S o al ribosoma 70S, aunque se ha visto necesaria la presencia de IF1 e IF2. (30).

La OTC estaría afectando a las dos vías de iniciación, pues uno de sus metabolitos, 4-epi-OTC, por un lado, afecta a los Bacteroidetes, Actinobacteria que presentarían la vía *Leaderless*, por el otro, a Firmicutes, la vía clásica donde se necesitan todos los factores de iniciación y Proteobacterias, que probablemente use ambas vías de iniciación (27,31). Si bien OTC estabiliza a IF1 con mayor protagonismo en la vía clásica, se ha visto también

necesaria en la vía *Leaderless*. Esto último reportado de IF1 en la vía *Leaderless*, es cuestionado pues solo promovería la traducción en caso de concentraciones bajas de fMet-ARNt (30). Últimos reportes evidencian que, esta vía está siendo estudiada a detalle, pues algunos grupos de bacterias lo presentan, pero en porcentajes promedios de 15%, lo cual no es representativo si se desea concluir que tipo de vía es la más usada en las bacterias. Así, esta inusual vía, sería el resultado de una evolución que va decreciendo (75). De esta manera, OTC podría inhibir a las dos vías de iniciación mediante la estabilización de IF1, factor usado en ambas vías.

Por otro parte, las diversas sensibilidades de las bacterias debido a la presencia de uno de los metabolitos de OTC, principalmente Firmicutes y Bacteroidetes, resultaría en una disbiosis, desequilibrio de los microorganismos, este caso de la microbiota intestinal. Un análisis, desde el punto de vista de dosificación usada en animales ayudaría a entender cómo es que OTC provocaría disbiosis. Los experimentos muestran que la concentración de OTC de mayor efecto fue, 100 uM, equivalente a 54.2 µg/ml, que representa su forma activa en sangre y es similar a lo reportado en diversos estudios de animales, pues en algunos casos se encontraron concentraciones de 0.1 a 20 µg µg/ml y 134.1 µg/ml de metabolitos de OTC en sangre (78,79). OTC junto a otros antibióticos de su familia Tetraciclinas se usan frecuentemente en dosis excesivas, esto representa un problema pues se necesitan similares dosis usadas en la industria agroalimentaria para su efecto que probablemente presente efectos colaterales (80,81). De manera específica, OTC se usa excesivamente en diversos animales (82–87), se ha asociado al brote de una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) (88) y se han hallado residuos de OTC en alimentos de mayor consumo como la leche y huevo (24,89). De este modo, los consumidores estarían expuestos a un consumo indirecto de OTC y/o algunos de sus metabolitos con un riesgo potencial para su salud (90). Estudios que vinculen el consumo indirecto de OTC y disbiosis aún no se han realizado. Nuestros datos muestran que OTC en dosis similares al uso habitual altera la iniciación de la síntesis de proteínas en bacterias. El consumo directo o indirecto de OTC se podría traducir en cambios de la microbiota. Este efecto, si bien es un daño colateral (90), se agrega a otros factores como la resistencia a los antibióticos (80). Este último factor, está llevando a una disminución de antibióticos efectivos (91). La identificación de un nuevo mecanismo de acción de OTC podría llevar a la búsqueda de nuevos antibióticos que actúen de manera similar a OTC.

6 CONCLUSIONES

La presente investigación a través de análisis cinéticos y de modelamiento estructural demuestran que OTC actúa en la iniciación de la síntesis de proteínas en bacterias debido a que:

- OTC produce cambios en los dominios de IF3.
- OTC estabiliza a IF1.
- La estabilización acumulada de IF1 incrementa según la formación de cada complejo.
- La estabilización acumulada de IF1 y /o los cambios de IF3 en los complejos intermedios de iniciación, puede resultar en la inhibición de complejos 70S.
- OTC coexiste y podría interactuar con IF1 en el ribosoma.

7 REFERENCIAS

1. Jirillo TM and E. The Interplay between the Gut Immune System and Microbiota in Health and Disease: Nutraceutical Intervention for Restoring Intestinal Homeostasis. Vol. 19, Current Pharmaceutical Design. 2013. p. 1329–42.
2. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. Engineering. 2017;3(1):71–82.
3. Liu W, Zhang J, Wu C, Cai S, Huang W, Chen J, et al. Unique Features of Ethnic Mongolian Gut Microbiome revealed by metagenomic analysis. Sci Rep. 2016;6.
4. Silverman M, Kua L, Tanca A, Pala M, Palomba A, Tanes C, et al. Protective major histocompatibility complex allele prevents type 1 diabetes by shaping the intestinal microbiota early in ontogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(36):9671–6.
5. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Sahay B, et al. Gut microbiota dysbiosis is linked to hypertension. Hypertension. 2016;65(6):1331–40.
6. Scher J, Abramson S. The microbiome and rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011;7(10):569–78.
7. Ding R xue, Goh WR, Wu R na, Yue X qing, Luo X, Khine WWT, et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. J Food Drug Anal. 2019;27(3):623–31.

8. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688–93.
9. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol.* 2017;8.
10. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology.* 2010;156(11):3216–23.
11. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012;488(7410):178–84.
12. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(6):458–78.
13. Flohr C, Pascoe D, Williams HC. Atopic dermatitis and the “hygiene hypothesis”: too clean to be true? *Br J Dermatol.* 2005;152(2):202–16.
14. Risnes KR, Belanger K, Murk W, Bracken MB. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *Am J Epidemiol.* 2011;173(3):310–8.
15. Nørgaard M, Nielsen RB, Jacobsen JB, Gradus JL, Stenager E, Koch-Henriksen N, et al. Use of penicillin and other antibiotics and risk of multiple sclerosis: A population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2011;174(8):945–8.
16. Zeissig S, Blumberg RS. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol.* 2014;15(4):307–10.
17. Modi SR, Collins JJ, Relman DA, Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota Find the latest version : Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Investig.* 2014;124(10):4212–8.
18. Lin J, Zhou D, Steitz TA, Polikanov YS, Gagnon MG. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annu Rev Biochem.* 2018;87(6):451–78.
19. Hong W, Zeng J, Xie J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm Sin B.* 2014;4(4):258–65.

20. Rodnina M V. Translation in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(9):1–22.
21. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem.* 2014;395(5):559–75.
22. Redding LE, Cubas-Delgado F, Sammel SD, Smith G. The use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. *Prev Vet Med.* 2015;113(1):88–95.
23. Omija B, Mitema ES, Maitho TE. Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens. *Food Addi Contam.* 1994;11(6):641–7.
24. Fritz JW, Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2007;105(3):1297–301.
25. SENASA. Residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios. SENASA. 2013;45:1–132.
26. Jung J, Jee SC, Sung JS, Park W. High concentration of red clay as an alternative for antibiotics in aquaculture. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;26(1):130–8.
27. Han H, Xiao H, Zhang K, Lu Z. Impact of 4-epi-oxytetracycline on the gut microbiota and blood metabolomics of Wistar rats. *Sci Rep.* 2016;6.
28. Gualerzi CO, Pon CL. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry.* 1990;29(25):5881–9.
29. Grill S, Gualerzi CO, Londei P, Bläsi U. Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: Evolutionary implications for translation. *EMBO J.* 2000;19(15):4101–10.
30. Udagawa T, Shimizu Y, Ueda T. Evidence for the Translation Initiation of Leaderless mRNAs by the Intact 70 S Ribosome without Its Dissociation into Subunits in Eubacteria. *J Biol Chem.* 2004;279(10):8539–46.
31. Nakagawa S, Niimura Y, Miura KI, Gojobori T. Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6382–7.
32. Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühmann M, Avila H, et al. Crystal

- structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 2001;20(8):1829–39.
33. Hussain T, Llacer JL, Wimberly BT, Kieft JS, Ramakrishnan V. Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation. *Cell.* 2016 Sep;167(1):133-144.
 34. Nakamoto JA, Spurio R, Konevega A, Fabbretti A, Milon P. The complete, functional and dynamic cycle of the bacterial Initiation Factor 3. *bioRxiv.* 2019;35.
 35. Milon P, Konevega AL, Gualerzi CO, Rodnina M V. Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation. *Mol Cell.* 2008;30(6):712–20.
 36. Noller HF, Woese CR, et al. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucli Acids Res* 1981 ;8(10):2275-93
 37. Noller HF, Woese CR, et al. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucli Acids Res* 1981 ;8(10):2275-93
 38. 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. First Edit. *Methods Enzymol.* 2007;430(8):1–30.
 39. Gomez-Hens A, Perez-Bendito D. The stopped-flow. *Anal Chim Acta.* 1991;242:147–77.
 40. Förster T. Delocalized excitation and excitation transfer. *US At Energy Comm F Full J Title.* 1965;1(18):61 -70
 41. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3th. ed. 1999.
 42. Antoun A, Pavlov MY, Tenson T, Ehrenberg M. Ribosome formation from subunits studied by stopped-flow and Rayleigh light scattering. *Biol Proced Online.* 2004;6(1):35–54.
 43. Godefroy-Colburn T, Wolfe AD, Dondon J, Grunberg-Manago M, Dessen P, Pantalon D. Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of Escherichia coli ribosomes. *J Mol Biol.* 1975;94(3):461–78.

44. Schedlbauer A, Kaminishi T, Ochoa-Lizarralde B, Dhimole N, Zhou S, López-Alonso JP, et al. Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2849–54.
45. Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group ULC; 2019.
46. PyMOL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. Schrödinger, LLC; 2009.
47. 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.
48. Cummings HS, Hershey JWB. Translation initiation factor IF1 is essential for cell viability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1994;176(1):198–205.
49. Gualerzi CO, Pon CL. Initiation of mRNA translation in bacteria: Structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(22):4341–67.
50. Grigoriadou C, Marzi S, Pan D, Gualerzi CO, Cooperman BS. The translational fidelity function of IF3 during the Transition from 30s to 70s initiation complex. *J Mol Biol*. 2007;373(3):551–61.
51. Demirci H, Murphy IV F, Murphy E, Gregory ST. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. *Nat Commun*. 2013;234–5.
52. Goyal A, Belardinelli R, Maracci C, Milón P, Rodnina M V. Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(22):10700–12.
53. Zucker FH, Hershey JWB. Binding of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*. 1986;25(12):3682–90.
54. Carter AP, Clemons W.M. J, 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.
55. Ogle JM, Carter AP, Ramakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(5):259–66.

56. Rodnina M, Stark H, Savelsbergh A, Wieden H, D M, B MN, et al. GTPase Mechanisms and Functions of Translation Factors on the Ribosome. *Bio Chem.* 2000;381(5):377-87.
57. Roll-Mecak A, Cao C, Dever TE, Burley SK. X-Ray Structures of the Universal Translation Initiation Factor IF2/eIF5B. *Cell.* 2000;103(5):781–92.
58. Milón P, Rodnina M V. Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012;47(4):334–48.
59. Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell.* 2000 1;102(5):615–23.
60. La Teana A, Gualerzi CO, Brimacombe R. From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA.* 1995;1:772–82.
61. Milon P, Carotti M, Konevega AL, Wintermeyer W, Rodnina M V., Gualerzi CO. The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Rep.* 2010;11(4):312–6.
62. Guenneugues M, Caserta E, Brandi L, Spurio R, Meunier S, Pon CL, et al. Mapping the fMet-tRNA(f)(Met) binding site of initiation factor IF2. *EMBO J.* 2000;19(19):5233–40.
63. Caserta E, Ferrara C, Milon P, Fabbretti A, Rocchetti A, Tomsic J, et al. Ribosomal interaction of *Bacillus stearothermophilus* translation initiation factor IF2: characterization of the active sites. *J Mol Biol.* 2010 ;396(1):118–29.
64. Wienk H, Tishchenko E, Belardinelli R, Tomaselli S, Dongre R, Spurio R, et al. Structural dynamics of bacterial translation initiation factor IF2. *J Biol Chem.* 2012;287(14):10922–32.
65. Baumgartner MP, Camacho CJ. Choosing the Optimal Rigid Receptor for Docking and Scoring. *J Chem Inf Model.* 2016;34(5):352–9.
66. Kaminishi T, Schedlbauer A, Ochoa-Lizarralde B, Astigarraga E de, Çapuni R, Yang F, et al. The third-generation tetracycline KBP-7072 exploits and reveals a new potential of the primary tetracycline binding pocket. *bioRxiv.* 2018;12:210–8.
67. Lee HS, Zhang Y. A Blind Low-Resolution Ligand-Protein Docking Approach Using

- Predicted Protein Structures. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
68. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, et al. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs*. 2001;61(4):443–98.
 69. 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):2286–95.
 70. Petrelli D, La Teana A, Garofalo C, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO. Translation initiation factor IF3: Two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J*. 2001;20(16):4560–9.
 71. Weiel J, Hershey JW. Fluorescence polarization studies of the interaction of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor 3 with 30S ribosomal subunits. *Biochemistry*. 1981;20(20):5859–65.
 72. Ohsawa H, Gualerzi C. Structure-function relationship in *Escherichia coli* initiation factors. Identification of a lysine residue in the ribosomal binding site of initiation factor by site-specific chemical modification with pyridoxal phosphate. *J Biol Chem*. 1981;256(10):4905–12.
 73. Julián P, Milon P, Agirrezabala X, Lasso G, Gil D, Rodnina M V, et al. The Cryo-EM Structure of a Complete 30S Translation Initiation Complex from *Escherichia coli*. *PLOS Biol*. 2011;9(7):1001-095.
 74. Tedin K, Moll I, Grill S, Resh A. Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs. *Mol Microbiol*. 1999;1(1):67–77.
 75. Zheng X, Hu GQ, She ZS, Zhu H. Leaderless genes in bacteria: Clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics*. 2011;12(1):361.
 76. Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009;461(7268):1234–42.
 77. Moll I, Grill S, Gualerzi CO, Bläsi U. Leaderless mRNAs in bacteria: Surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Mol Microbiol*. 2002;43(1):239–46.

78. Ueno R. Determination of oxytetracycline in blood serum by high-performance liquid chromatography with direct injection. *J Chromatogr.* 1992;573:333–5.
79. Reja A, Moreno L, Serrano JM, Santiago D, Soler F. Concentration-time profiles of oxytetracycline in blood, kidney and liver of tench (*Tinca tinca* L) after intramuscular administration. *Vet Hum Toxicol.* 1996;38(5):344–7.
80. Granados-Chinchilla F, Rodríguez C. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *J Anal Methods Chem.* 2017.
81. Chattopadhyay MK. Use of antibiotics as feed additives: A burning question. *Front Microbiol.* 2014;5(2):1–3.
82. Björklund H V., Råbergh CMI, Bylund G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture.* 1991;97(1):85–96.
83. Sharafati-Chaleshtori R, Mardani G, Rafieian-Kopaei M, Sharafati-Chaleshtori A, Drees F. Residues of oxytetracycline in cultured rainbow trout. *Pak J Biol Sci.* 2013;16(21):1419–22.
84. Aalipour F, Mirlohi M, Jalali M, Azadbakht L. Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran. *J Environ Heal Sci Eng.* 2015;13(1):1–7.
85. Kimera ZI, Mdegela RH, Mhaiki CJN, Karimuribo ED, Mabiki F, Nonga HE, et al. Determination of oxytetracycline residues in cattle meat marketed in the Kilosa district, Tanzania. *Onderstepoort J Vet Res.* 2015;82(1):911.
86. Odore R, De Marco M, Gasco L, Rotolo L, Meucci V, Palatucci AT, et al. Cytotoxic effects of oxytetracycline residues in the bones of broiler chickens following therapeutic oral administration of a water formulation. *Poult Sci.* 2015;94(8):1979–85.
87. Barman A, Hossain M, Rahim M, Hassan M, Begum M. Oxytetracycline residue in Tilapia. *Bangladesh J Sci Ind Res.* 2018;53(1):41–6.
88. Díaz OMÁ, Díaz GPL, Rodríguez CEC, Montañó VLA, Medina AMI, González PGI, et al. Caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella* Typhimurium variante 5- asociada a un brote de enfermedad transmitida por alimentos en el municipio de Paz

- de Río, Boyacá, 2010. *Iatreia*. 2014;27(1):23–30.
89. Giraldo OF. Seguridad alimentaria y producción pecuaria campesina: el caso de la localidad de Sumapaz. *Luna Azul*. 2008;2474(1909):104–12.
90. Gallo A, Landi R, Rubino V, Di Cerbo A, Giovazzino A, Palatucci AT. Oxytetracycline induces DNA damage and epigenetic changes: a posible risk for human and animal health. *PeerJ*. 2017;14.
91. Mobarki N, Almerabi B, Hattan A. Antibiotic Resistance Crisis. *Int J Med Dev Ctries*. 2019;40(4):561–4