



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Estudio cinético de la unión entre los factores de iniciación
IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de *Escherichia coli*
en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Victor Alejandro BARRENECHEA LOLI

ASESOR

Dr. María Mercedes SOBERÓN LOZANO

Dr. Pohl Luis MILÓN MAYER (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Barrenechea V. Estudio cinético de la unión entre los factores de iniciación IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de Escherichia coli en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Victor Alejandro Barrenechea Loli
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47354033
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6760-4915
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	María Mercedes Soberón Lozano
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07003675
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5063-1407
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08213401
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luz Dora Velásquez Ramos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07490576
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Nancy Joaquina Rojas Moran
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08401186
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.2.5.1. Bases moleculares de enfermedades multifactoriales y emergentes.
Grupo de investigación	Laboratorio de Biomoléculas. Centro de Investigación. UPC
Agencia de financiamiento	PROCIENCIA del CONCYTEC. Convenios 154-2017-FONDECYT y PE501079419-2022
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Chorrillos Lugar: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas Latitud: -12.19745 Longitud: -77.00760
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
URL de disciplinas OCDE	1.06.03 -- Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 1.06.06 -- Biofísica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.06



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE MEDICINA

Vicedecanato de Investigación y Postgrado
Sección Maestría

ACTA DE GRADO DE MAGÍSTER

En la ciudad de Lima, a los 26 días del mes de abril del año dos mil veintitrés siendo las 10:00 hrs, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda con la asistencia de las Profesoras: Mg. Luz Dora Velásquez Ramos (Miembro), Mg. Nancy Joaquina Rojas Moran (Miembro), Dra. María Mercedes Soberón Lozano (Asesora); el postulante al Grado de Magíster en Bioquímica, Bachiller en Ciencias - Biología, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis titulada: **“Estudio cinético de la unión entre los factores de iniciación IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de Escherichia coli en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina”** con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE (20)**. A continuación, la Presidenta del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA**, al postulante **VICTOR ALEJANDRO BARRENECHEA LOLI**.

Se extiende la presente Acta en dos originales y siendo las 11:20 hrs, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Mg. Luz Dora Velásquez Ramos
Profesora Asociada
Miembro

Mg. Nancy Joaquina Rojas Moran
Profesora Principal
Miembro

Dra. María Mercedes Soberón Lozano
Profesora Principal
Asesora

Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Profesora Principal
Presidenta



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD N° 019

El Vicedecano de Investigación y Posgrado y Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, deja constancia que:

La tesis (X) Proyecto de investigación () o trabajo de investigación ()

Titulada/o: **“Estudio cinético de la unión entre los factores de iniciación IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de Escherichia coli en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina”**

Presentada/o por **VICTOR ALEJANDRO BARRENECHEA LOLI**

Para optar el

Grado de Doctor () en

Grado de Magister (X) en **BIOQUÍMICA**

Título de Segunda Especialidad () en

Diplomado () en

Ha sido sometida/o a evaluación de originalidad, con el programa informático de similitudes Software TURNITIN con **Identificador de la entrega N° 2068542029**

En la configuración del detector se excluyeron:

- Textos entrecomillados
- Bibliografía
- Cadenas menores de 40 palabras
- Anexos

El resultado final de similitudes fue del 08%

Por lo tanto, el documento arriba señalado * **CUMPLE** con los criterios de originalidad requeridos.

*cumple o no cumple

Operador del software: **DR. JORGE WALTER CALDERON MORALES**

Lima, 18 de abril de 2023.



Firmado digitalmente por IZAGUIRRE
SOTOMAYOR Manuel Hernan FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.05.2023 10:17:33 -05:00

.....
Dr. MANUEL HERNAN IZAGUIRRE SOTOMAYOR

Director de la Unidad de Posgrado

Agradecimientos

A Dios, por darme la vida y el tiempo para concluir esta tesis.

A mis asesores, los doctores Pohl Milón y Mercedes Soberón, por darme la guía, oportunidad y herramientas necesarias para desarrollar este trabajo de tesis.

A mis profesores de maestría, por todas sus enseñanzas y dedicación con nosotros.

A Ana y Pablo, por toda su ayuda y orientación, así también como a los demás integrantes del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación.

La presente tesis se desarrolló con el soporte financiero del programa PROCIENCIA del CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnológico e Innovación Tecnológica) mediante los convenios 154-2017-FONDECYT y PE501079419-2022.

Dedicatoria

A mis padres, por todo su esfuerzo y apoyo constante en mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Justificación de la investigación.....	3
1.4. Objetivos de la investigación.....	4
2. CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes del problema.....	5
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. Traducción: inicio, elongación y terminación.....	8
2.2.2. Factor de iniciación 3 (IF3).....	9
2.2.3. Factor de iniciación 1 (IF1).....	10
2.2.4. Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET)..	11
3. CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	13
3.2. Técnicas de recolección de datos.....	13
3.2.1. Resuspensión de las tetraciclinas.....	13
3.2.2. Purificación de ribosomas.....	13

3.2.3. Expresión y purificación de proteínas.....	14
3.2.4. Marcación fluorescente de IF3 e IF1.....	15
3.2.5. Mediciones de cinética rápida mediante la técnica de <i>Stopped-flow</i> . 16	
3.2.6. Modelamiento <i>in silico</i>	17
3.3. Análisis e interpretación de los resultados.....	18
4. CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
4.1. Resultados.....	19
4.1.1. Determinación de las constantes cinéticas de IF3 ante la llegada de las tetraciclinas.....	19
4.1.2. Determinación de los cambios cinéticos de unión de IF1 en presencia de las tetraciclinas.....	23
4.1.2.1. Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el 30S PIC.....	27
4.1.2.2. Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el 30S IC.....	29
4.1.2.3. Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en la formación del complejo 70S IC.....	31
4.1.2.4. Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el acoplamiento de la subunidad ribosomal 50S al 30S IC.....	34
4.1.3. Interpretación de los contactos de Tigeciclina y Demeclociclina con IF1.....	36
4.2. Discusión	39
5. CONCLUSIONES.....	45
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas e IF3	7
Tabla 2. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas en el 30S PIC	15
Tabla 3. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas en el 30S IC	20
Tabla 4. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas durante la formación del 70S IC	21
Tabla 5. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas durante el acoplamiento de la subunidad 70S.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico del proceso de iniciación bacteriana.....	9
Figura 2. Superposición de espectros de la molécula aceptora y receptora.....	11
Figura 3. Titulación de las tetraciclinas.....	18
Figura 4. Titulación de las tetraciclinas en presencia de IF1.....	19
Figura 5. Dependencia de velocidades aparentes (k_{app}) de IF3 ante la llegada de (A) Demeclociclina y (B) Tigeciclina	27
Figura 6. Controles experimentales para probar el funcionamiento de la señal FRET entre la interacción de IF3 ⁴⁸⁸ e IF1 _{540Q}	35
Figura 7. Disociación de IF1 _{540Q} ante la llegada de IF1 _{WT} 10X	36
Figura 8. Disociación de IF1 _{540Q} del 30S PIC ante la unión de IF1 _{WT} 10X.....	38
Figura 9. Disociación de IF1 _{540Q} del 30S IC.....	39
Figura 10. Llegada de la subunidad ribosomal 50S al 30S IC.....	42
Figura 11. Acoplamiento de la subunidad 50S al 30S IC	43
Figura 12. Modelamiento del sitio de unión de las tetraciclinas en el 30S IC (PDB: 5LMN)	44

RESUMEN

La familia de las tetraciclinas comprende un diverso grupo de compuestos conocidos por su amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Su uso llevó a la aparición de diferentes mecanismos de resistencia a las tetraciclinas, por lo cual los científicos se enfocaron en mejorar la actividad antimicrobiana produciendo nuevos derivados. Las tetraciclinas se unen a los ribosomas bacterianos e interfieren de manera estérica con el acoplamiento del aminoacil-tRNA al sitio A durante la etapa de la elongación de la traducción de proteínas. Sin embargo, reportes previos y la proximidad al sitio de unión de IF1 podrían indicar que las tetraciclinas lograrían inhibir la iniciación de la traducción a través de un mecanismo no conocido. El objetivo de esta tesis fue estudiar la cinética de unión de IF1 e IF3 a la subunidad ribosomal 30S de *E. coli* en presencia de 2 tetraciclinas, Demeclociclina y Tigeciclina. Los datos cinéticos y estructurales obtenidos por métodos bioquímicos y computacionales determinaron el impacto de estos antibióticos en la fase de la iniciación de la traducción bacteriana. Los resultados indicaron que ambos antibióticos compactaron los dos dominios de IF3 al unirse al complejo 30S-IF3. Así como también redujeron la constante de disociación de IF1 en la mayoría de los complejos. El efecto de estabilización fue mayor en presencia de Tigeciclina debido a que redujo la velocidad de unión de la subunidad 50S al 30S IC y a su vez retuvo a IF1 en el complejo 70S IC en los últimos pasos. Sin embargo, Demeclociclina no jugó un rol muy importante en estas últimas etapas. El modelamiento estructural de ambas tetraciclinas unidas al 30S PIC y 30S IC mostraron importantes interacciones moleculares que podrían explicar la estabilización de IF1 por estos antibióticos, como es el caso de Tigeciclina, el cual expuso nuevos potenciales contactos con IF1 en el 30S IC. Estos resultados permitieron concluir que las tetraciclinas inducen a cambios conformacionales de IF3 e incrementan la afinidad de IF1, perturbando su correcta eyección durante la formación del complejo 70S y así retrasando la iniciación de la traducción bacteriana

Palabras clave: tetraciclinas, síntesis de proteínas, ribosoma, factor de iniciación, Tigeciclina.

ABSTRACT

The tetracycline family comprise a diverse group of compounds well known for their broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Since its discovery its extensive usage of led to the emergence of different mechanism of tetracycline resistance, thus, scientists focused on the enhancement of the antimicrobial activity by producing new derivatives. Tetracyclines bind to bacterial ribosomes and interfere sterically with the docking of aminoacyl-tRNA into the A-site during elongation step of protein translation. However, previous reports and the proximity to the binding site of IF1 could indicate that tetracyclines may inhibit translation initiation through an unknown novel mechanism. The aim of this thesis was to study the binding kinetics of IF1 and IF3 to the 30S ribosomal subunit of *E. coli* in presence of Demeclocycline and Tigecycline. The Kinetic and structural data, obtained by using biochemical and computational methods respectively, were used to determine the impact of these antibiotics on the translation initiation phase of bacterial protein synthesis. The results indicated that both antibiotics induced the two domains of IF3 to get closer when it binds to the 30S-IF3 complex. The presence of Tigecycline and Demeclocycline also reduced the dissociation rate constant of IF1 in most of the complexes. This stabilization effect was greater in the presence of Tigecycline. In the last steps of translation initiation, Tigecycline delayed the joining of 50S subunit to the 30S IC and retained IF1 to the resulting 70S initiation complex. On the other hand, Demeclocycline did not played an important role on 50S subunit joining. The structural modeling of both tetracyclines bound to 30S PIC and 30 IC showed important molecular interactions that could explain IF1 stabilization by these antibiotics, such as Tigecycline, which displayed new potential contacts with IF1 in the 30S IC. These data indicate that tetracyclines induce conformational changes of IF3 and enhances IF1 affinity, perturbing its correct ejection during 70S formation and thus delaying the regular translation initiation in bacteria

Keywords: tetracyclines, protein synthesis, ribosome, initiation factor, Tigecycline.

LISTA DE ABREVIATURAS

30S IC: complejo de iniciación 30S

30S PIC: pre-complejo de iniciación 30S

70S IC: complejo de iniciación 70S

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

fMet-ARNt^{fMet}: ARNt iniciador

GTP: guanósín trifosfato

GDP: guanósín difosfato

IF1: factor de iniciación 1

IF1_{WT}: factor de iniciación 1 de tipo silvestre

IF1_{540Q}: factor de iniciación 1 marcado con fluoróforo aceptor no emisor

IF3: factor de iniciación 3

IF3_{E166C}: IF3 con una mutación en la posición 166 (de ácido glutámico a cisteína)

IF3⁴⁸⁸: IF3 marcado con el fluoróforo donador en el dominio amino terminal

IF3_{540Q}: IF3 marcado con el fluoróforo aceptor no emisor en el dominio carbono terminal

IF3_{DL}: IF3 doblemente marcado con un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor

CTD: dominio carbono terminal

NTD: dominio amino terminal

K: constante de equilibrio

k : constante elemental

k_1 : constante de velocidad directa

k_{-1} : constante de velocidad inversa

k_{app} : constante aparente

k_{avg} : constante promedio

K_d : constante de disociación

FRET: Transferencia de Energía de Resonancia de Förster en tiempo real

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

En la actualidad, el rápido surgimiento de bacterias multidrogo-resistentes está amenazando las extraordinarias ventajas que se han logrado con los antibióticos hasta el momento y sumado al mínimo número de antibióticos que se están desarrollando o se están probando clínicamente, podría convertirse en una amenaza mayor en los próximos años (Bartlett et al., 2013; Matzov & Yonath, 2017; Laxminarayan, 2022). En particular, la creciente incidencia de resistencia bacteriana a las tetraciclinas ha llevado a una disminución en su uso, lo que a su vez motivó la búsqueda de nuevos derivados, como las glicilciclinas (Chopra, 2002).

La mayoría de los antibióticos conocidos que se unen al ribosoma tienen como blanco, el ciclo de elongación, incluyendo antibióticos clínicamente importantes como los aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicoles y tetraciclinas. A pesar de que existe un número de inhibidores que intervienen en la fase de iniciación, estos son muy limitados en términos de la aplicación clínica, debido a problemas con la especificidad de la droga (edeína y pactamicina), toxicidad (evermicina) y baja solubilidad (tiopéptidos y termorubinas) (Wilson, 2014).

Se sabe que las tetraciclinas actúan específicamente en el sitio A de la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo el correcto acomodamiento de los aminoacil-ARNt

e inhibiendo de esa manera la fase de la elongación (Gottesman, 1967; Craven et al., 1969). Investigaciones previas han observado que antibióticos usados en la elongación como la kanamicina y estreptomicina ocasionan cambios en la conformación de IF3 en la etapa de la iniciación de la traducción (Chulluncuy et al., 2016). Sin embargo, no hay reportes sobre el impacto directo de las tetraciclinas a nivel de la iniciación, donde también actúan proteínas llamadas factores de iniciación, las cuales juegan un papel importante en el control de la velocidad y la correcta formación del Complejo de Iniciación (Wintermeyer et al., 2004; Lovmar & Ehrenberg, 2006).

Se han realizado estudios donde se ha monitoreado la dinámica de formación del Complejo de iniciación 30S mediante los cambios en la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) (Milón et al., 2007; Milón et al., 2012). El uso de esta técnica ha permitido determinar parámetros cinéticos en tiempo real y dilucidar el importante papel que cumplen los factores de iniciación en la estabilización del Complejo de iniciación para que este proceso se desarrolle de manera correcta. El presente marco experimental proporciona las bases para evaluar si las tetraciclinas ocasionan alteraciones en los complejos de iniciación. La identificación de la fase de iniciación de la síntesis de proteínas como potencial blanco de tetraciclinas brindaría nuevas perspectivas y estrategias para el desarrollo de nuevos antibióticos que exploten el mismo mecanismo.

En este contexto es necesario evaluar el mecanismo molecular de las tetraciclinas mediante el efecto cinético y conformacional en el complejo de iniciación 30S en el modelo de *E. coli* utilizando técnicas de fluorescencia y modelamiento *in silico* que permitan observar cambios en la dinámica estructural y cinética de los componentes de la iniciación.

1.2. Formulación del problema

¿Cómo es la cinética de unión entre los factores de iniciación IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de *Escherichia coli* en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina?

1.3. Justificación de la investigación

El inevitable aumento de la resistencia a los antibióticos está afectando el combate de distintas enfermedades, como la neumonía, tuberculosis, malaria, además de las distintas enfermedades nosocomiales, que cada vez son más difíciles de tratar. La búsqueda de nuevos antibióticos es crucial para hacer frente a este fenómeno natural en bacterias. Así, el conocimiento de los mecanismos de acción es un tema de gran interés y valor para buscar estrategias que combatan este problema global.

La gran mayoría de antibióticos clínicamente importantes tienen como objetivo la fase de la elongación de la traducción y no se conoce el efecto que estos antibióticos puedan tener en fases tempranas de la iniciación. La iniciación bacteriana posee una regulación altamente compleja tanto en procariontes como en eucariotes y además es el más divergente entre estos dos grupos.

Por estos motivos es importante evaluar el efecto de tetraciclinas en etapas tempranas de la síntesis de proteínas y obtener un mejor entendimiento de los efectos que podría tener la unión de las tetraciclinas en el complejo de iniciación 30S a partir de parámetros cinéticos y conformacionales. Los efectos de las interacciones del antibiótico con su entorno, ya sea en la subunidad 30S, como los factores de iniciación, podrán servir como modelo para futuros diseños de antibióticos con características necesarias que las hagan apropiadas para

enfermedades causadas por bacterias con mecanismos de resistencia a los antibióticos.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la cinética de la unión entre los factores de iniciación IF1 e IF3 con la subunidad ribosomal 30S de *Escherichia coli* en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar los cambios cinéticos ocasionados en IF3 por la presencia de Demeclociclina y Tigeciclina
- Determinar los cambios cinéticos de unión de IF1 en presencia de la Demeclociclina y Tigeciclina.
- Interpretar los cambios conformacionales en la subunidad 30S inducidos por Tigeciclina y Demeclociclina en las distintas etapas de la iniciación de la traducción bacteriana.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema

A inicios de 1940, el Laboratorio Lederle utilizó la primera tetraciclina, la aureomicina. El hallazgo de este importante antibiótico fue llevado a cabo por el profesor Benjamin Druggar, el cual le dio ese nombre por el color amarillo del compuesto y por el color de la cepa de *Streptomyces* del cual se extrajo (Nelson & Levy, 2011). Sin embargo, después de un año del descubrimiento de la aureomicina, se reportó la primera evidencia de resistencia a este antibiótico (Demerec, 1949). Esto llevó a la producción de la “segunda generación de tetraciclinas”, los cuales se obtuvieron por medio de reacciones sintéticas orgánicas. Entre ellas se encuentra la Demeclociclina, una tetraciclina que poseía grupos funcionales únicos en el C6 y C7. Posteriormente, la aparición de nuevos mecanismos de resistencia obligó más tarde a generar nuevas tetraciclinas con características químicas más eficientes para evadir este problema. Es así que los programas de descubrimiento de antibióticos llevados a cabo por la farmacéutica Wyeth realizaron modificaciones en la estructura de minociclina, específicamente en el C9, al añadir un residuo de glicina en el grupo funcional amido, generando nuevos compuestos análogos llamados glicilciclinas (Sum et al., 1994). Tiempo después, la Tigeciclina, fue aprobada por la FDA en el 2006, convirtiéndose así, en la primera tetraciclina de tercera generación, en entrar al mercado.

Tigeciclina es la primera glicilciclina derivada de minociclina y es ampliamente conocida porque su actividad resulta menos alterada ante los distintos mecanismos de resistencia a las tetraciclinas, especialmente a las bombas de eflujo y proteínas de protección ribosomal (Petersen et al., 1999; Van Ogtrop et al., 2000). La elevada afinidad de la Tigeciclina por el sitio A, se explicó, gracias a análisis estructurales a través de cristalografías de rayos X de Tigeciclina unida a la subunidad ribosomal 30S (Schedlbauer et al., 2015) y al ribosoma 70S (Jenner et al., 2013), así como también a través de ensayos de competición con tetraciclina marcada con el isótopo de hidrógeno ^3H (tritio). Más allá de su rol antimicrobiano, Tigeciclina ha sido objeto de un creciente número de estudios en el cual resaltan su efecto antitumoral al inhibir la proliferación celular y el metabolismo aeróbico, así como también en estudios relacionados a la inhibición de la traducción de proteínas en las mitocondrias, característica útil para futuros tratamientos de enfermedades mitocondriales (Xu et al., 2016; Dong et al., 2019; Pfab et al., 2021; Suarez-Rivero et al., 2021).

Si bien alrededor del 50% de los antibióticos comercialmente disponibles actúan sobre el ribosoma bacteriano, aquellos fármacos que actúan sobre la fase de la iniciación son escasos. Es por ello que, en su gran mayoría, estos afectan las fases de la elongación de la cadena polipeptídica (Giuliodori et al., 2019; Fabbretti et al., 2010). Sin embargo, muchos de estos antibióticos se unen a la subunidad menor 30S del ribosoma y podrían inhibir otras fases además de la elongación (Giuliodori et al., 2019). Utilizando la técnica de cristalografía por rayos X, se determinó con mejor definición el sitio de unión de la tetraciclina en la subunidad 30S que se sitúa en un lugar localizado en cerca del sitio aceptor del aminoacil-tRNA, entre la cabeza y el cuerpo del 30S (sitio A), lugar donde llegan los aminoacil-tRNA para la elongación. Pioletti et al (2001), por su parte, identifica 6 sitios de unión de tetraciclina en la subunidad 30S con diferentes rangos de ocupación. Tet-1, el sitio con la mayor ocupación, se localiza entre el surco menor de H34 y el stem-loop de H31, muy cerca al sitio A, donde el ARNt aminoacilado se une a la estructura 30S.

Se realizaron estudios con el antibiótico específico de iniciación GE81112 (no comercial) cuyo mecanismo de acción es desestabilizar el stem-loop del ARNt iniciador lo que genera una unión incorrecta al sitio P. A nivel estructural se observó que, en presencia del antibiótico, la interfase h44/h45/h24a, que es parte del sitio de unión de IF3, adopta una conformación desestabilizada. Sus hallazgos revelaron que la dinámica de equilibrio entre la conformación estabilizada y la desestabilizada de la interfase h44/h45/h24a regulan la progresión de la síntesis de proteínas, actuando, así como un interruptor molecular que permite la transición de un complejo de iniciación abierto a uno cerrado (Fabbretti et al., 2016).

Los aminoglucósidos, también podrían interferir con el desarrollo normal del inicio de la traducción en procariotas debido a que experimentos en estado pre-estacionario mostraron que los aminoglucósidos, kanamicina y estreptomicina separan dominios del IF3, promoviendo un estado abierto del factor. La unión de IF1, desencadena en cambio el cierre de los dominios del IF3 unido a la subunidad 30S, lo cual sugiere que estos dos antibióticos modulan el inicio de la traducción por medio de la interacción de los dominios de IF3 y la subunidad menor (Chulluncuy et al., 2016).

En la búsqueda de nuevos antibióticos, se han priorizado también las opciones que sean menos perjudiciales al momento de su uso, tal es el caso de la sareciclina, que, al ser un antibiótico de limitado espectro, los efectos adversos en la flora intestinal son mínimos (Zhanel et al., 2018). Estudios bioquímicos recientes muestran que su mecanismo de acción también podría llevarse a cabo en la etapa de la iniciación, distando así del resto de tetraciclinas comúnmente conocidas (Batool et al., 2020)

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Traducción: inicio, elongación y terminación

El inicio de la traducción establece el marco de lectura del ARNm por medio del posicionamiento del ARNt iniciador (fMet-ARNt^{fMet}) en el codón de inicio en el sitio P de la subunidad 30S. En bacterias, la iniciación es promovida por tres factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3) (Simonetti et al., 2009; Laursen et al., 2005; Gualerzi et al., 2010) (Figura 1)

Primero, los factores de iniciación, el ARNt iniciador y el ARNm son reclutados a la subunidad ribosomal 30S para que se forme el Complejo pre-iniciación 30S (30S PIC). Después, el anticodón de ARNt iniciador reconoce al codón de inicio del ARNm en el sitio P de la subunidad 30S, lo cual resulta en la formación del 30S IC (Gualerzi et al., 2010; Milon et al., 2012). Después, la subunidad mayor 50S se asocia con el 30S IC, IF2 hidroliza GTP a GDP y fosfato inorgánico (Pi), todos los factores de iniciación se liberan y el ARNt iniciador se acomoda en el sitio P del centro peptidil transferasa para participar en la formación del primer enlace peptídico (Milon et al., 2008; Goyal et al., 2015)

El proceso de terminación comienza cuando un codón de terminación del ARNm llega al sitio A. En bacterias, el reconocimiento de este codón de terminación, involucra dos factores de liberación de "clase I", RF1 y RF2. Ambos factores reconocen UAA; sin embargo, UAG es reconocida por RF1 mientras que UGA es reconocida por RF2. Al final, la proteína recién sintetizada se libera, marcando el final de esta fase (Ramakrishnan, 2002)

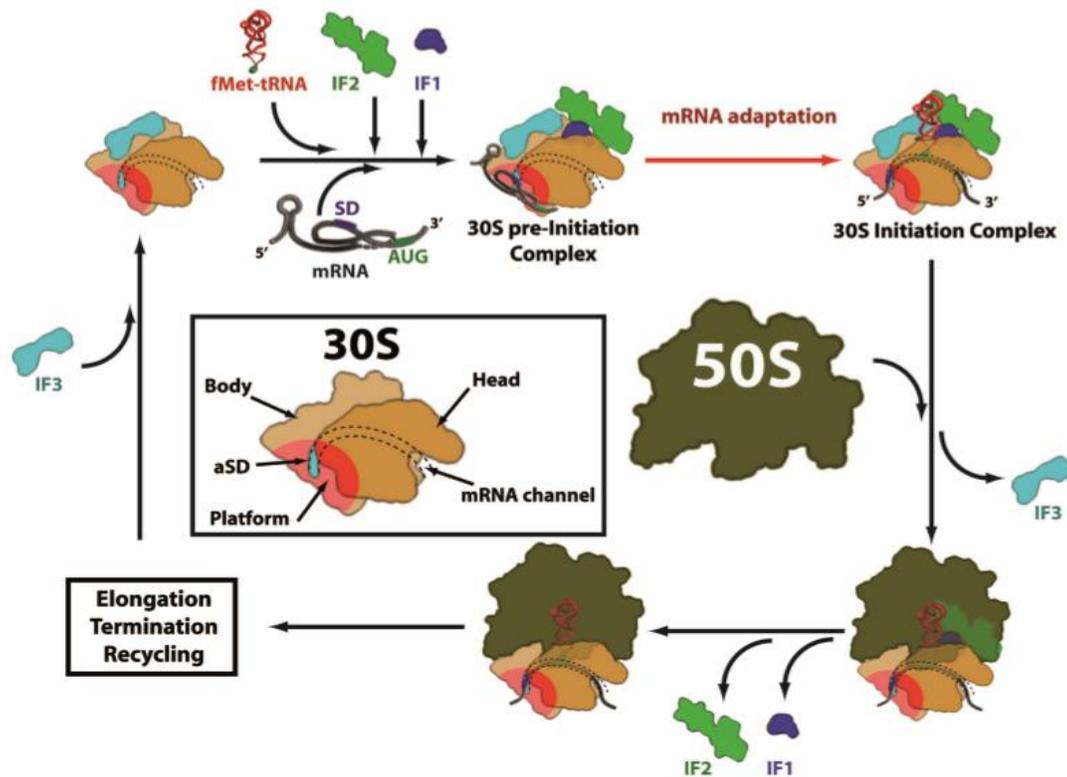


Figura 1. Gráfico del proceso de iniciación bacteriana. Vista esquemática del proceso de iniciación. Formación de los complejos de iniciación 30S y 70S, conteniendo los ribosomas, el ARNt iniciador, el ARNm y los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3. *Fuente:* Simonetti et al (2009).

2.2.2. Factor de iniciación 3 (IF3)

El factor de iniciación 3 es uno de los factores de iniciación que mejor reportado tiene sus funciones. Su estructura está conformada por 180 aminoácidos y está codificada por el gen *InfC* (Olsson et al., 1996). La estructura tridimensional consiste en dos dominios (Fortier et al., 1994; Kycia et al., 1995) unidos por una cadena flexible rica en lisina (Moreau et al., 1997). La unión de

estos dos dominios a la superficie ribosomal ocurre de manera independiente, siendo el dominio C-terminal, el cual se une primero a la subunidad 30S (Sette et al., 1999), específicamente a la región de la plataforma (cerca del G700) de la subunidad menor. Acto seguido el dominio N-terminal se une a proximidades del sitio P (Fabbretti et al., 2007).

Una de sus principales funciones es evitar una unión prematura de la subunidad 50S a la subunidad menor 30S en la traducción de proteínas (Grunberg-Manago et al., 1975) y además discrimina entre los distintos aminoacil-tRNA en el sitio P de la subunidad menor, actuando así como un factor que garantiza la fidelidad de la traducción durante la fase de inicio (Hartz et al., 1989). IF3 también acelera la velocidad de la interacción codón-anticodón entre el fMet-tRNA^{fMet} y el triplete del ARN mensajero (Milon et al., 2008; Gualerzi et al., 2001)

2.2.3. Factor de iniciación 1 (IF1)

Es el más pequeño de los tres factores de iniciación (8.3 kDa en *E. coli*) que intervienen en la síntesis de proteína y está codificada por el gen *infA* (Sands et al., 1987). Con la ayuda de la espectroscopía de NMR se determinó que pertenece a la familia de las proteínas de plegamiento de unión a oligonucleótidos, de una estructura muy parecida a las “cold shock proteins” (Csps) (Sette et al., 1997)

El sitio de unión de IF1 se encuentra en las proximidades del sitio A de la subunidad ribosomal 30S (Carter et al., 2001). Estudios en los que se obtuvieron imágenes de alta resolución, mostraron que IF1 interactúa específicamente con dos adeninas (A1492 y A1493) del 16S (Carter et al., 2001) y además un análisis mutacional observó que un loop interno en la hélice 44 parece ser igual de importante para la unión de IF1 (Dahlquist & Puglisi., 2000). Entre sus

principales funciones se encuentra, la de estimular la disociación de IF3 del ribosoma (Gottlieb et al., 1975; Dottavio-Martin et al., 1979) e inducir cambios conformacionales a larga distancia dentro del 30S, influyendo en el equilibrio asociación-disociación de las subunidades ribosomales (Ramakrishnan, 2002; Milón et al., 2008)

2.2.4. Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET)

La transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) es un proceso físico por el cual la energía es transferida de manera no-radiante de una molécula en estado excitado (donador) a otra molécula (aceptor), el cual ocurre cuando el espectro de emisión del donador se superpone con el espectro de absorción de la molécula aceptora (Lakowicz, 1999; Förster, 1948) (Figura 3)

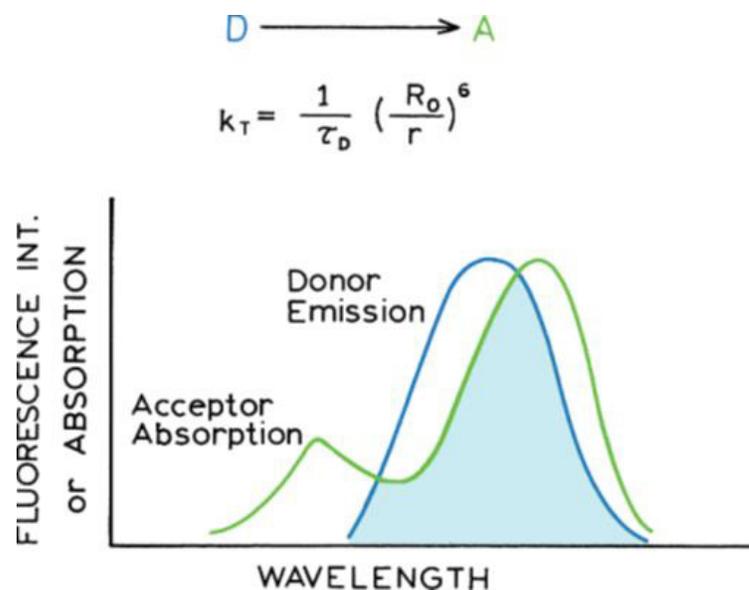


Figura 2. Superposición de espectros de la molécula aceptora y receptora. El solapamiento del espectro de emisión del donador y de excitación del aceptor permite la emisión de fluorescencia. *Fuente:* Lakowicz (1999)

La distancia entre estas moléculas necesita ser menor a aproximadamente 10 nm (100 Å). Este es un criterio importante para definir la eficiencia de FRET, el cual puede proveer información altamente sensible acerca de la orientación y distancia molecular (Clegg, 1996). Dada su utilidad, este método no ha servido solamente para poder medir los movimientos internos de la subunidad 30S (Hickerson et al., 2005), sino también ha permitido poder dilucidar la dinámica de los componentes que participan en la etapa del inicio de la traducción en bacterias (Milon et al., 2007; Milon et al., 2012)

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es cuantitativo y presenta un diseño observacional descriptivo.

3.2. Técnicas de recolección de datos

3.2.1. Resuspensión de las tetraciclinas

Se usaron Demeclociclina y Tigeciclina de la marca Abcam (Cambridge, MA, United States), las cuales se disolvieron en agua libre de nucleasas y dimetil-sulfóxido respectivamente. Luego las soluciones a una concentración final de 10 mM se almacenaron a -20°C por hasta un mes.

3.2.2. Purificación de ribosomas

Estos ribosomas fueron obtenidos del Kurchatov Institut en Gatchina, Rusia siguiendo el siguiente método: el complejo ribosomal 70S y sus respectivas subunidades se obtuvieron después de la ultracentrifugación de un lisado celular de *E. coli* a través de una gradiente de sucrosa. Esto permitió separar ribosomas intactos de las subunidades individuales. La concentración intacta de

ribosomas 70S, 50S y 30S fue medida por absorbancia a 260 nm (A_{260}). Finalmente fueron almacenados a -80°C (Milon et al., 2007)

3.2.3. Expresión y purificación de proteínas

Se cultivaron células competentes de *E. coli* BL21 transformadas (Mix & Go, Zymo Research, Irvine, CA, USA) con el vector de expresión pET24c *InfA* (codifica para IF1), pET24c *InfC* (codifica para IF3WT) o pET24c *InfC* E166C (codifica para IF3 con una cisteína en la posición 166). Los vectores pET24c que contienen los genes *wt* y mutantes se adquirieron comercialmente (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Se usaron 2 litros del medio Luria-Bertani (LB) para el cultivo de *E. coli* BL21 pET24c *InfA* o pET24c *InfC* a un $\text{OD}_{600\text{nm}}$ inicial de 0.5. La expresión de proteínas fue inducida agregando 1 mM de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (Thermo Fisher Scientific, Hvidovre, Dinamarca). Se dejó a las células expresar IF1 o IF3 por 3 h antes de someterlas a centrifugación a 5000 g a 4°C . Las células se resuspendieron luego en Buffer de Lisis (50 M Hepes pH 7, 100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 10% Glicerol, 6 mM 2-mercaptoetanol) con inhibidor de proteasas (Merck, Darmstadt, Alemania). Posteriormente las células se lisaron utilizando el método de sonicación (Fisher Scientific) por 20 ciclos (10 s encendido, 30 s apagado) a un 30 % de intensidad. Para remover los remanentes celulares, se centrifugó el lisado en 2 rondas a 11000 g por 30 minutos.

Ambos factores de iniciación fueron purificados por cromatografía de intercambio catiónico en la columna HiTrap SP HP (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia). Los sobrenadantes fueron cargados manualmente en la columna (1 mL de volumen de columna) y fueron subsecuentemente sujetos a un gradiente lineal de NH_4Cl (0,05 M -1 M) en un sistema HPLC Jasco (Jasco, Tokio, Japón). IF3 eluyó a 600 mM NH_4Cl (0.05 M Hepes pH 7, 10% glicerol, 6 mM 2-Mercaptoetanol) y se observó cualitativamente su pureza a

través de un gel SDS-PAGE usando acrilamida al 15%. IF1 fue eluido a 300 mM de NH_4Cl . Para la eliminación de contaminantes en las fracciones de IF1 se usaron filtros de centrifugación Amicon Ultra 30 kDa (Merck, Darmstadt, Alemania) por 10 min a 14000 g a 4°C.

3.2.4. Marcación fluorescente de IF3 e IF1

IF3_{E166C} (proteína sin marcar) fue sometida a una diálisis en buffer de marcación (50 mM Hepes pH: 7.1, 100 mM NH_4Cl , 10% glicerol, 0.5 mM TCEP) en un D-Tube™ Dialyzer Maxi (Merck) para remover las trazas de 2-Mercaptoetanol, este agente reductor evita la unión del grupo maleimido del fluoróforo con las cisteínas de la proteína. Primero, el Dominio C-terminal se marcó en la cisteína recombinante (C166) ya que está expuesta y reaccionó efectivamente con los derivados de maleimido (Milon et al., 2007). Se incubó en buffer de marcación a un exceso de 20 veces de Atto-540Q maleimido (Atto-Tec) sobre IF3_{E166C} por 45 minutos. La reacción se detuvo adicionando 6 mM de 2-Mercaptoetanol. Se purificó IF3_{CTD}^{540Q} (la proteína IF3 marcada con 540Q en el extremo C-terminal) del exceso de fluoróforos, utilizando una columna HiTrap SP HP. Después se lavó con 10 volúmenes de columna de Buffer_A que contengan 100 mM de NH_4Cl . Por último, se dializó IF3_{CTD}^{540Q} en buffer de marcación que contengan 2 M de úrea.

La denaturación de IF3 resultó en la exposición de la cisteína cubierta en la posición 65 del Dominio N-terminal (Nakamoto et al., 2021). La proteína parcialmente denaturada se incubó con un exceso de 20 veces la concentración molar de Atto-488 maleimido por 1 hora a temperatura ambiente. IF3 doblemente marcado (IF3_{DL}), se purificó del exceso del fluoróforo usando la columna HiTrap SP HP (Merck). Las proteínas eluidas se dializaron en buffer de storage (Hepes pH 7.1, 100 m NH_4Cl , 10 % glicerol, 6 mM 2-Mercaptoetanol) y se almacenaron en alícuotas a -80°C. La pureza y eficiencia de la marcación

se verificó mediante SDS-PAGE al 15%, donde la fluorescencia se observó bajo un trans-iluminador UV y el total de proteínas con tinción de azul Coomassie. IF1 se marcó buffer de marcado (25 mM Tris pH 7.1, 100 mM NaCl, 10% glicerol) y se usó un exceso de 20 veces de Atto-540Q maleimido (Atto-Tec GmbH, Siegen, Alemania) por 40 minutos a temperatura ambiente en movimiento. La proteína marcada fue luego purificada usando la columna HiTrap SP HP como se describió anteriormente en la etapa de la purificación de IF3.

3.2.5. Mediciones de cinética rápida mediante la técnica de Stopped-flow

Todas las reacciones de flujo detenido se realizaron en buffer TAKM₇ (50 mM Tris pH 7.5, 70 mM NH₄Cl, 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoetanol) a 25°C y las subunidades de 30S fueron activadas en TAKM₂₁ (buffer TAKM₇ con 1/10 volumen 140 mM MgCl₂) por 30 min a 37°C. Luego cada reacción se centrifugó a 15000 g por 10 min a 20°C. Las medidas de fluorescencia de flujo detenido se realizaron usando un equipo Stopped-flow SX20 (Applied Photophysics, Surrey, United Kingdom) mezclando volúmenes iguales (90 µl) de soluciones reactantes. Se usó un LED monocromático (470 nm) para excitar el fluoróforo donador Alexa-488 y fluoresceína y la emisión de la fluorescencia fue medida a través de un filtro óptico con un corte de 515 nm. Las concentraciones de cada componente usado fueron de: 0.05 µM subunidad 30S, 0.15 µM IFs, 0.15 µM fMet-tRNA^{fMet}, 0.3 µM ARNm, 0.2 µM GTP en TAKM₇. Los distintos experimentos realizados se llevaron a cabo con 100 µM de tetraciclina. De manera específica, para los experimentos de disociación de IF1_{540Q}, se usó un exceso de 10 veces de IF1 sin marcador fluorescente. Para los experimentos de “light scattering” se usó luz monocromática a una longitud de onda de 430 nm y la luz dispersada se midió en un ángulo de 90° en ausencia de filtro. Las medidas de fluorescencia y luz dispersa se obtuvieron en mil puntos entre 20 a 200 s para cada medida. Se registraron de 6 a 8 repeticiones por cada reacción y se promediaron subsecuentemente.

3.2.6. Modelamiento *in silico*

Los antibióticos Demeclociclina y Tigeciclina fueron modelados en el ribosoma de *Thermus thermophilus* utilizando como herramienta el programa MOE, el cual permitió reconocer las distintas interacciones Ligando-Proteína en el sitio de unión. Para ello, se minimizó la energía dentro del sitio de unión y se categorizó mediante cálculos de energía libre de unión y afinidad. Una de las estructuras utilizadas fueron el cristal obtenido del PDB ID: 4YHH, en el que se encuentra a Tigeciclina unida a la subunidad ribosomal 30S. Esta estructura se sometió a una reparación general de su estructura, utilizando la opción de QuickPrep, la cual permitió resolver problemas de protonación, reconstrucción de puentes de hidrógeno y minimización de energía. Luego a partir de esta estructura corregida, se editó manualmente los átomos del antibiótico Tigeciclina, para la obtención de Demeclociclina y se minimizó la estructura nueva para corregir distintos choques estéricos existentes. Una vez corregidas ambas estructuras, se utilizó la herramienta LigPlot, el cual genera un diagrama en 2D de las interacciones moleculares del ligando con su sitio de unión. Para analizar las interacciones moleculares de las tetraciclinas en etapas de formación de complejo de iniciación, se alinearon las estructuras previamente modeladas, con estructuras en pre-iniciación y en el complejo de iniciación (con los PDBs 5LMQ y 5LMV respectivamente), utilizando el programa Pymol (Delano Scientific, EE.UU.)

3.3. Análisis e interpretación de los resultados

Para el análisis e interpretación de los resultados se utilizó el programa Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). Las curvas promediadas fueron analizadas con ecuaciones exponenciales de regresión no lineal (ecuación 1, 2)

$$F = F_0 + F_1 * \exp (-k_{app1} * t) \quad (1)$$

$$F = F_0 + F_1 * \exp (-k_{app1} * t) + F_2 * \exp (-k_{app2} * t) \quad (2)$$

Para los experimentos de unión de Dem y Tig al complejo 30S-IF3_{DL} se calcularon las constantes k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} a partir de la suma y el producto de las constantes aparentes k_{app1} y k_{app2} para cada titulación. Mientras la constante de disociación (K_D) fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$K_D = (k_{-1} \times k_{-2} \times k_1^{-1}) / (k_{-2} + k_2)$$

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Determinación de las constantes cinéticas de IF3 ante la llegada de las tetraciclinas

IF3 evita la asociación de la subunidad 30S con la subunidad 50S, suministrando de esta forma, subunidades ribosomales 30S libres para iniciar la traducción (Pon & Gualerzi., 1984). Por tal motivo, es el primer factor de iniciación en unirse a la subunidad ribosomal 30S (Wintermeyer & Gualerzi, 1983; Milon et al., 2012). Esta proteína está conformada por dos dominios, que se encuentran unidos por un conector altamente flexible rico en lisina, y actuando independientemente con la subunidad 30S (Sette et al., 1999; Laursen et al., 2005). Para poder observar el efecto de la unión de las Tetraciclinas en la estructura de IF3 pre-unido a la subunidad 30S, se utilizó IF3_{DL}, marcado con el fluoróforo donador en el NTD (Dominio N-terminal) y el fluoróforo receptor no emisor en el CTD (Dominio C-terminal). La subunidad 30S pre-unido a IF3_{DL} se mezcló en un *Stopped-flow* con diferentes concentraciones de Demeclociclina y Tigeciclina. Para descartar que los cambios en la conformación de IF3 se deban al efecto de la dilución al momento de mezcla con los componentes de la jeringa B, se utilizó el buffer únicamente. De esta manera el aumento o disminución de la fluorescencia resultante de la mezcla, estará en función del alejamiento o acercamiento de los dominios respectivamente (Figura 4).

Al mezclar cada tetraciclina con el complejo 30S-IF3_{DL} se observó una disminución de la fluorescencia (Figura 4), indicando así el acercamiento de ambos dominios de IF3. Los ensayos de titulación mostraron que esta reducción dependía de la concentración de cada tetraciclina.

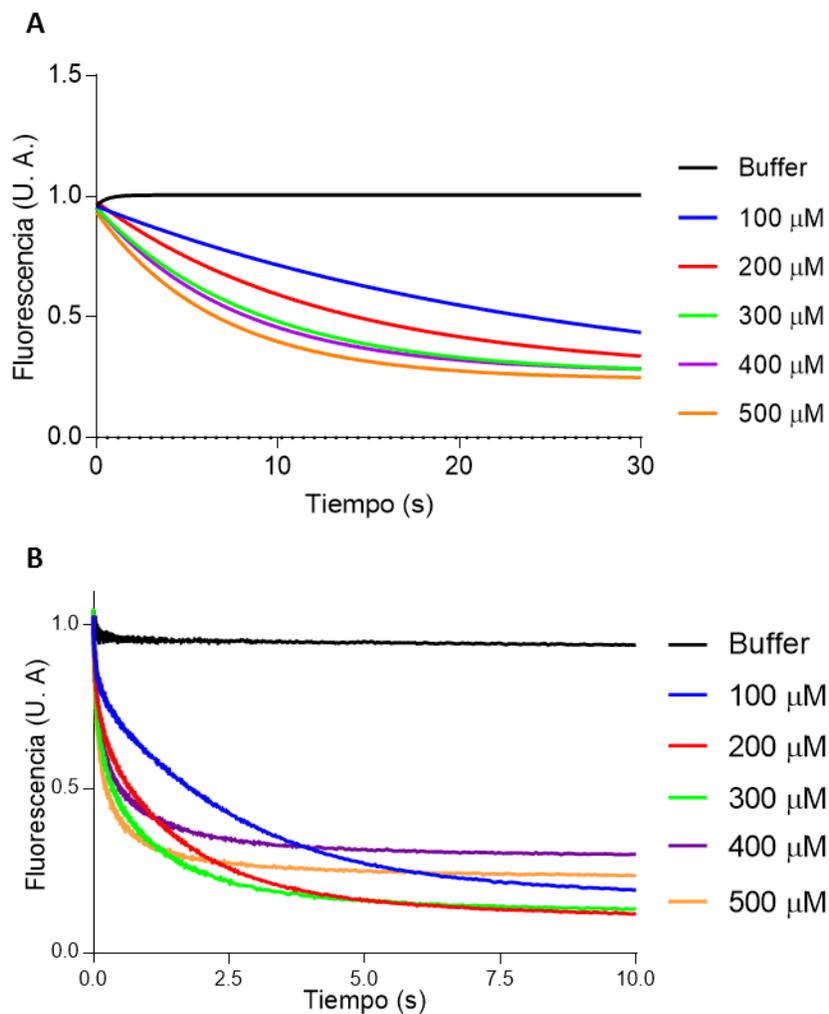


Figura 3. Titulación de las tetraciclinas. Curvas de fluorescencia de obtenidas por la llegada de distintas concentraciones de (A) Demeclociclina (100 a 500 μM) y (B) Tigeciclina (100 a 500 μM) al Complejo 30S-IF3_{DL}.

Luego, se realizó el mismo experimento, pero con el factor IF1 pre-unido al complejo 30S-IF3 y se observó que las señales de fluorescencia disminuyeron en el tiempo (Figura 5), evidenciando el acercamiento de los dominios de IF3. Sin embargo, las amplitudes de las señales fueron menores y más lentas a las observadas en los complejos ausentes de IF1 (Figura 4).

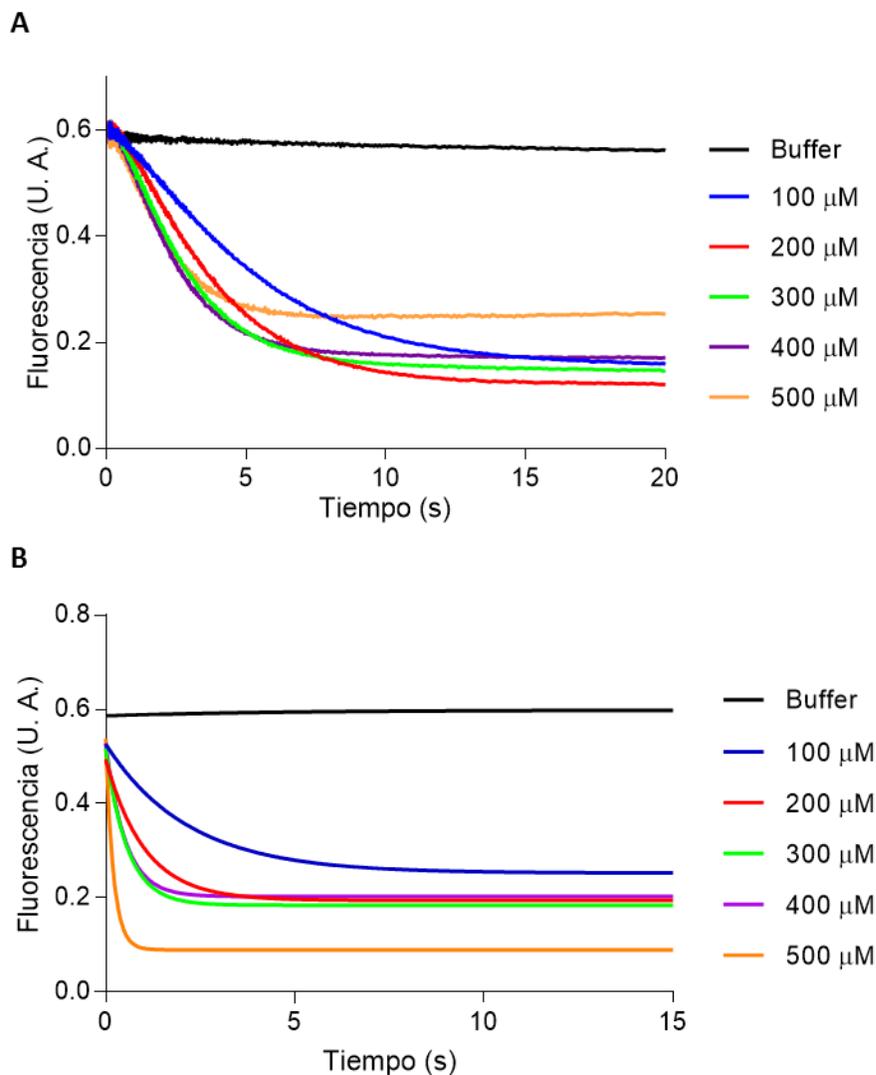


Figura 4. Titulación de las tetraciclinas en presencia de IF1. Curva de fluorescencia de la llegada de distintas concentraciones de (A) Demeclociclina (100 a 500 μM) y (B) Tigeciclina (100-500 μM) al Complejo 30S-IF3_{DL}-IF1.

Para las pruebas cinéticas con Dem, en el complejo 30S-IF3_{DL} se obtuvo un $k_1=0.0007\pm 2.23\times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que en presencia de IF1 fue $k_1=0.0005\pm 6.48\times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Las constantes de velocidad de la reacción reversa, k_{-1} , indicadas por intersección de la recta con el eje y, mostraron valores cercanos a cero. Se calculó un $k_{-1}=0.10\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ para el complejo en ausencia de IF1, sin embargo, la presencia de IF1 hizo disminuir el k_{-1} en un 80% obteniéndose $0.02\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$. Cuando se usó Tig, se obtuvo $k_1=0.009\pm 0.001 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el complejo 30S-IF3_{DL} y $k_1=0.005\pm 0.001 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el complejo con IF1. Además, la constante $k_{-1}=2.932\pm 0.353 \text{ s}^{-1}$ que se obtuvo del complejo sin IF1, mostró una disminución considerable en presencia de IF1 ($k_{-1}= -0.02\pm 0.22 \text{ s}^{-1}$).

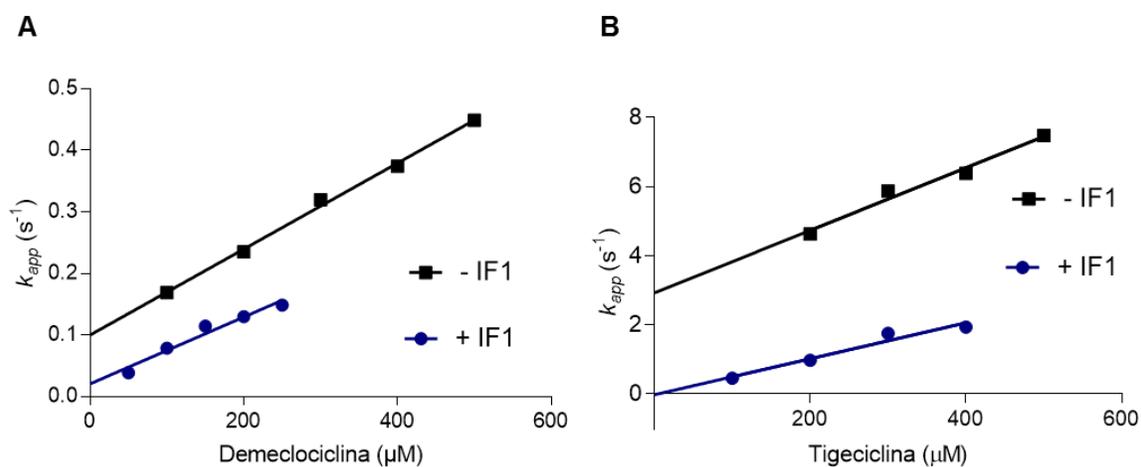


Figura 5. Dependencia de velocidades aparentes (k_{app}) de IF3 ante la llegada de (A) Demeclociclina y (B) Tigeciclina. Para ambos antibióticos estos ensayos se realizaron en ausencia (cuadrados negros) y presencia de IF1 (círculos azules)

4.1.2. Determinación de los cambios cinéticos de unión de IF1 en presencia de las tetraciclinas

Como se observó en los resultados anteriores, tanto IF1 como ambas tetraciclinas ocasionan respuestas similares en la conformación de IF3_{DL} (acercamiento de los dominios) al momento de unirse a la subunidad ribosomal 30S. Dado que ambos se unen al sitio A del subunidad 30S, las tetraciclinas podrían actuar como IF1, promoviendo una unión más eficiente de IF3 y por tanto estimulando su unión.

Para estudiar si la presencia de tetraciclinas ocasiona cambios en la afinidad de IF1 por la subunidad ribosomal 30S, se realizaron pruebas en las cuales se determinaron las constantes de disociación de IF1 en el equipo *Stopped-Flow*. Para ello, se formó el complejo 30S-IF3⁴⁸⁸-IF1_{540Q}-Tetraciclina y se mezcló con IF1_{WT} a 10 veces la concentración de la del IF1_{540Q} unido al complejo. Dado que ambos IF1 tienen afinidad por el mismo sitio de unión, IF1_{WT} al estar en exceso, tiende a unirse al sitio A, mientras que IF1_{540Q} se disocia del complejo. Esta disociación resulta en un aumento fluorescencia por el alejamiento del fluoróforo no emisor unido en el IF1. Este sistema de señal FRET sirvió para observar si la presencia del antibiótico afecta la velocidad (constante de disociación) a la cual IF1 se disocia del complejo formado.

Para validar que la señal FRET se deba estrictamente al alejamiento de ambas proteínas marcadas, se diseñaron 3 pruebas. En el primer experimento se mezcló el complejo 30S-IF3⁴⁸⁸ contra IF1_{540Q}, observándose una disminución en la fluorescencia ante el acercamiento de IF1 al complejo formado (Figura 7). Para afirmar que esta disminución de señal FRET se deba netamente al acercamiento de IF1_{540Q} a IF3⁴⁸⁸ y no a un efecto estérico, se realizó un segundo

ensayo en el cual se usó IF1_{WT} en lugar de IF1_{540Q}, lo cual resultó en ninguna variación de fluorescencia que fue lo esperado. Dado que se comprobó la variación señal FRET ante la interacción de estas 2 proteínas, el tercer experimento fue demostrar lo contrario, es decir, el aumento de fluorescencia ante la disociación de IF1_{540Q}. Para ello se mezcló el complejo 30S- IF3⁴⁸⁸- IF1_{540Q} con IF1 en 10 veces de exceso, dando como resultado un aumento de fluorescencia debido a que la asociación de IF1_{WT} se ve favorecido por su alta concentración.

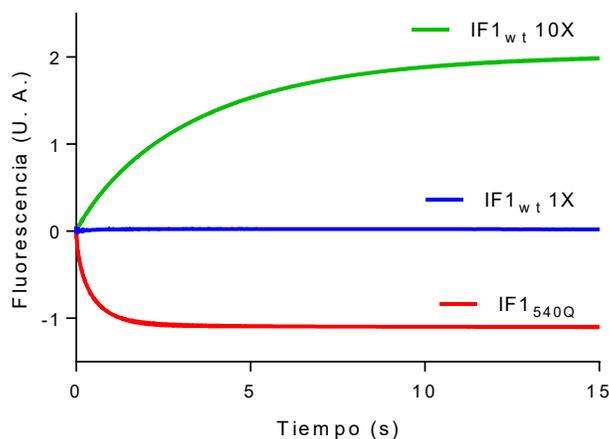


Figura 6. Controles experimentales para probar el funcionamiento de la señal FRET entre la interacción de IF3⁴⁸⁸ e IF1_{540Q}. El control con IF1_{540Q} (rojo) indica el efecto *quenching* o desactivación fluorescente sobre IF3⁴⁸⁸. El control con IF1_{WT}1X (azul) indica que los cambios no se deban a efectos estéricos y el control con IF1_{WT}10X (verde) indica que su exceso favorece su asociación al sitio de unión por sobre el IF1_{540Q} en menor concentración.

Para evaluar si la presencia de Demeclociclina y Tigeciclina ocasionaban cambios en la afinidad de IF1, se mezclaron los complejos 30S-IF3⁴⁸⁸-IF1_{540Q} en ausencia y presencia de cada una de las tetraciclinas, contra IF1_{WT} a una concentración de 10 veces de exceso molar con respecto a IF1 marcado fluorescentemente. Como se observa en la Figura 8, la presencia de IF1_{WT} en exceso compite por el mismo sitio de unión con IF1_{540Q}, lo cual resulta en la disociación de IF1_{540Q} y asociación de IF1_{WT}. No obstante, las distintas amplitudes en el aumento de la fluorescencia mostraron el efecto de cada antibiótico en la disociación de IF1 es distinta. Se evidenció por ejemplo que la presencia del antibiótico Tigeciclina en el 30S PIC ocasiona que el cambio de señal de fluorescencia sea considerablemente menor en comparación a Demeclociclina.

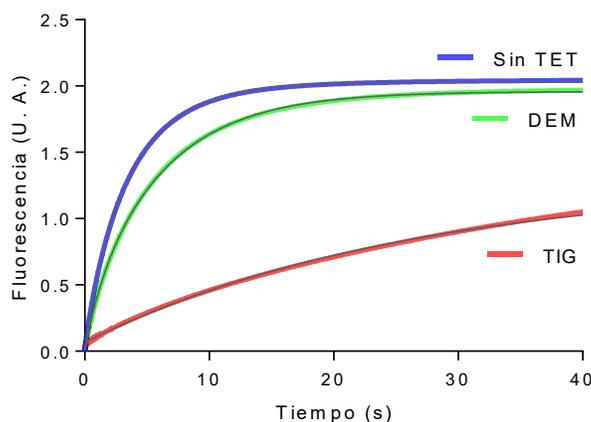


Figura 7. Disociación de IF1_{540Q} ante la llegada de IF1_{WT} 10X. Se midieron las velocidades de disociación de IF1_{540Q} tanto en ausencia de tetraciclinas (azul), como en presencia de cada una (verde y rojo)

Las señales de disociación de IF1_{540Q} tuvieron una dependencia de 2 fases en el tiempo. La aplicación de un análisis de regresión permitió obtener las velocidades aparentes para cada complejo, de las cuales se calculó las velocidades promedio. Se obtuvo que ante la llegada de IF1_{WT} 10X en el complejo sin tetraciclinas, la constante promedio a la cual IF1_{540Q} se disocia es $0.361 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$. Cuando en el complejo se encontraba unido Demeclociclina y Tigeciclina, las constantes de velocidad promedio fueron $0.252 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ y $0.059 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Este análisis muestra que la presencia de Tigeciclina en el complejo, ocasiona que la velocidad de disociación de IF1_{540Q} disminuya 6 veces a cuando se encuentra ausente en el complejo. Aunque la presencia de Demeclociclina ocasionó que la velocidad de disociación de IF1_{540Q} disminuya, el efecto de este antibiótico en la afinidad de IF1_{540Q} no llega a ser tan notorio como con Tigeciclina. Por tanto, la presencia de Tigeciclina en esta etapa en la formación del complejo de iniciación podría estar afectando la afinidad de IF1, causando que aumente considerablemente.

Tabla 1. Constantes de velocidad de la disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas e IF3

A	B	$k_{app1} (\text{s}^{-1})$	$k_{app2} (\text{s}^{-1})$	$k_{avg} (\text{s}^{-1})$
30S-IF3 ⁴⁸⁸ -IF1 _{540Q}	IF1 10X	1.09 ± 0.02	0.252 ± 0.001	0.361 ± 0.004
30S-IF3 ⁴⁸⁸ -IF1 _{540Q} - TIG	IF1 10X	0.022 ± 0.001	0.409 ± 0.013	0.059 ± 0.001
30S-IF3 ⁴⁸⁸ -IF1 _{540Q} - DEM	IF1 10X	0.784 ± 0.012	0.165 ± 0.001	0.252 ± 0.003

4.1.2.1. **Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el 30S PIC**

Uno de los eventos importantes que atraviesa el inicio de la traducción bacteriana, es la formación del Complejo de pre-iniciación 30S (30S PIC), el cual está conformado por la subunidad ribosomal 30S, los tres factores de iniciación, el ARNm y fMet-ARNt^{fMet}, estos dos últimos unidos de manera independiente a la interacción codón-anticodón (Gualerzi & Pon., 2015). Para estudiar si Tigeciclina y Demeclociclina afectan la afinidad de IF1 en el Complejo de pre-iniciación, se procedió a mezclar en *Stopped-flow* el PIC 30S con el antibiótico, pero en ausencia de fMet-ARNt^{fMet} para evitar la interacción codón-anticodón, siendo nuestra señal FRET, la interacción de IF3⁴⁸⁸ e IF1_{540Q}, contra 10 veces de exceso de IF1_{WT}.

A partir de los resultados obtenidos se observa que la disociación de IF1 disminuye cuando ambas tetraciclinas se encuentran unidas en el 30S PIC (Figura 9). La amplitud de la fluorescencia disminuyó a la mitad cuando Tigeciclina se encontraba unida al complejo, lo cual nos indica que este antibiótico ocasiona que a la mitad de IF1_{540Q} les cueste disociarse a diferencia cuando el antibiótico se encuentra ausente. Además, el tiempo en el cual la disociación ocurre es el más largo, esto podría deberse a la estabilidad a la cual IF1 ha alcanzado en este paso.

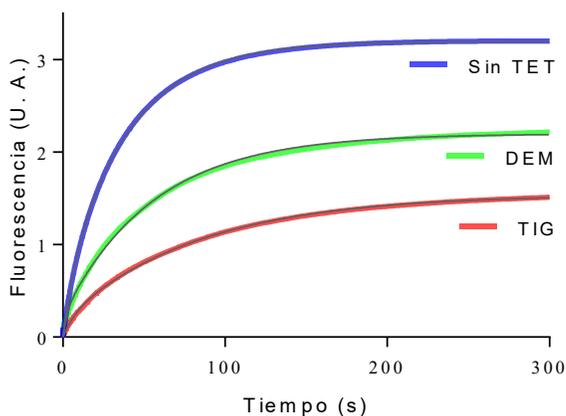


Figura 8. Disociación de IF1_{540Q} del 30S PIC ante la unión de IF1_{WT} 10X. Se obtuvieron aumentos de fluorescencia más lentos en presencia de Tigeciclina (rojo) y Demeclociclina (verde) que en ausencia del antibiótico (azul).

El incremento de fluorescencia tuvo una naturaleza bifásica y al realizarse un análisis de regresión no lineal, se obtuvo dos exponenciales correspondientes para las constantes aparentes (k_{app1} y k_{app2}) a partir de las cuales se calculó una constante promedio (k_{avg}). De acuerdo a los datos numéricos, la constante de velocidad a la cual IF1 se disocia de PIC en ausencia de las tetraciclinas es $k_{avg}=0.041\pm 0.001$. Este valor disminuye a aproximadamente a la mitad cuando la tetraciclina de tercera generación, Tigeciclina, ya se encuentra unida al PIC. Demeclociclina posee un $k_{avg}=0.061\pm 0.001$, el cual es más alto al del PIC con tetraciclina ausente.

Tabla 2. Constantes de velocidad de la disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas en el 30S PIC.

A	B	k_{app1} (s ⁻¹)	k_{app2} (s ⁻¹)	k_{avg} (s ⁻¹)
PIC	IF1 10X	0.026±0.001	0.133±0.001	0.041±0.001
PIC+TIG	IF1 10X	0.012±0.001	0.145±0.003	0.028±0.001
PIC+DEM	IF1 10X	0.018±0.001	0.424±0.014	0.061±0.001

4.1.2.2. ***Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el 30S IC***

Para estudiar los efectos de las tetraciclinas en esta etapa del inicio de la traducción, se mezcló en *Stopped-flow* el Complejo de Iniciación 30S incubado con cada antibiótico contra IF1 en 10 veces de exceso molar. Como donador de la señal FRET se volvió a usar IF3⁴⁸⁸ e IF1_{540Q} como aceptor no emisor. De tal modo que al disociarse IF1_{540Q} del 30S IC, se pudiera registrar cambios en la fluorescencia.

En presencia de todos los componentes del 30S IC, el efecto de los antibióticos sobre la disociación de IF1 cambió. Los resultados mostraron un aumento de fluorescencia en todas las pruebas realizadas, lo cual indica la asociación de IF1_{WT} en exceso y disociación de la proteína IF1_{540Q} del complejo formado. La presencia de Tigeciclina en el complejo tiene un efecto en los primeros segundos al disminuir la velocidad de disociación de IF1_{540Q}, sin embargo, se observa que aproximándose a los 300 segundos la amplitud de fluorescencia se acerca al aumento obtenido en ausencia de tetraciclinas en el complejo (Figura 10). En tanto, al estar Demeclociclina unida en el complejo, se registró también un aumento de fluorescencia, lo cual evidencia disociación de IF1, no obstante, fue más lento y de menor amplitud.

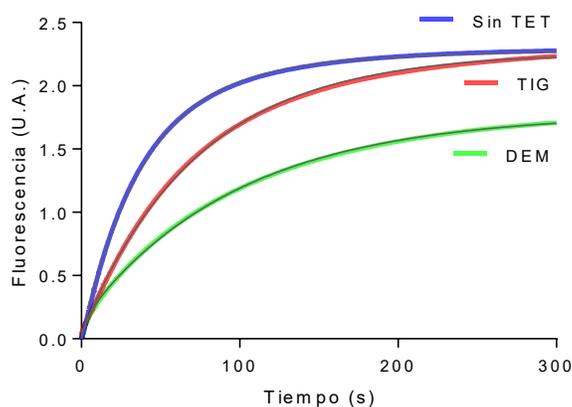


Figura 9. Disociación de IF1_{540Q} del 30S IC. Esto se realizó ante la unión de IF1_{wt} 10X en ausencia de cada tetraciclina pre unida al 30S IC.

Las señales de aumento de fluorescencia se ajustaron con una ecuación exponencial de una fase, obteniéndose así las constantes aparentes de velocidad para cada mezcla. Las constantes aparentes para Demeclociclina y Tigeciclina fueron $k_{app1}=0.012 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app1}=0.014 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ respectivamente, mientras que en ausencia de tetraciclina fue de $k_{app1}=0.024 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$. Estos resultados numéricos indicaron que efectivamente la presencia de ambas tetraciclinas, disminuyeron la velocidad a la cual IF1_{540Q} se está disociando. No obstante, al estar unido Demeclociclina al 30S IC, a IF1 le estaría costando más disociarse ya que es dos veces más lenta que en condiciones de ausencia de antibiótico. Tigeciclina por su parte, a pesar de ser una tetraciclina de tercera generación, no ejerce un efecto tan marcado en la disociación de IF1, como si lo había hecho en etapas anteriores del inicio de la traducción

Tabla 3. Constantes de velocidad de la disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas en el 30S IC.

A	B	k_{app} (s⁻¹)
30SIC	IF1 10X	0.024±0.001
30SIC + TIG	IF1 10X	0.014±0.001
30SIC + DEM	IF1 10X	0.012±0.001

4.1.2.3. Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en la formación del complejo 70S IC

En el último paso en la iniciación de la síntesis de proteínas muestra que el complejo de iniciación 30S se asocia con la subunidad ribosomal 50S para formar por último el complejo de iniciación 70S (Milon & Rodnina, 2012). Este proceso comprende también la disociación de los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3 de la subunidad ribosomal 30S. Por tal motivo, en este ensayo, para determinar si IF1 se está disociando ante la llegada de la subunidad ribosomal 50S, se mezcló en *Stopped Flow* el Complejo de iniciación 30S incubado con cada antibiótico contra la subunidad ribosomal 50S. Como donador se usó fMet-ARNt^{fMet} marcado con fluoresceína y como aceptor no emisor se usó a IF1_{540Q}, de modo tal que al acoplarse la subunidad ribosomal 50S al 30SIC, IF1_{540Q} termine por disociarse del complejo de iniciación 30S para así obtener una señal de aumento de fluorescencia.

En los resultados se observó que la llegada de la subunidad 50S ocasiona una señal de aumento de fluorescencia obtenida en condiciones sin antibiótico (Figura 11), confirmando así que el factor de iniciación IF1 se está disociando,

alejándose del fMet-ARNt^{fMet} marcado con fluoresceína. Cuando Demeclociclina se encuentra unida al complejo de iniciación 30S, el resultado muestra la misma tendencia de disociación de IF1, es decir, en ese estadio Demeclociclina parece no ejercer ningún efecto sobre IF1. No obstante, se registró una disminución de fluorescencia cuando la subunidad ribosomal 50S llega al complejo de iniciación 30S ante la presencia de Tigeciclina. Esto se puede traducir como un acercamiento mutuo entre ambos componentes marcados (IF1_{540Q} y fMet-ARNt^{fMet}) o como un acercamiento llevado a cabo solamente por uno de estos componentes marcados

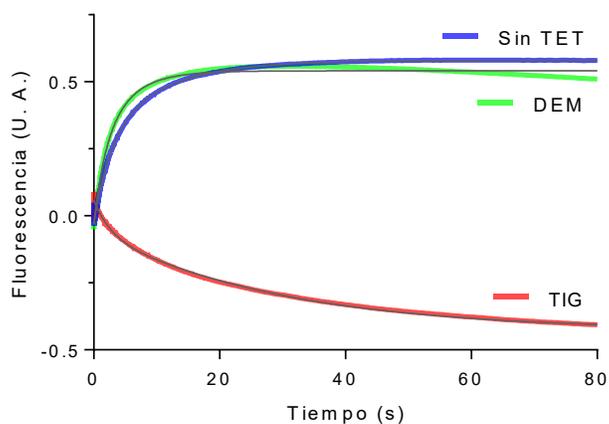


Figura 10. Llegada de la subunidad ribosomal 50S al 30S IC. La disociación de IF1_{540Q} en presencia de Demeclociclina (verde) se produce a similar velocidad cuando está ausente el antibiótico (azul). Por otra parte, se produjo un acercamiento de IF1_{540Q} y fMet-ARNt^{fMet} cuando Tigeciclina se encontraba unido al 30S IC.

La señal obtenida por IF1 se estudió mediante un análisis de regresión no lineal usando una curva exponencial de dos exponentes. A partir de las constantes aparentes halladas se calcularon las constantes promedio. En condiciones de ausencia de antibiótico, la constante de velocidad promedio fue $k_{avg}=0.231\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, mientras que en presencia de Tigeciclina y Demeclociclina fueron $0.122\pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ y $0.363\pm 0.064 \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Se evidencia que la Demeclociclina acelera 1.5 veces más rápido la disociación de IF1 a la llegada de la subunidad ribosomal 50S. Tigeciclina por su parte, ocasiona que la velocidad disminuya a la mitad, pero no por causa de una disociación, sino por una disminución de distancia entre IF1_{540Q} y fMet-ARNt^{fMet}.

Tabla 4. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas durante la formación del 70S IC

A	B	$k_{app1} (\text{s}^{-1})$	$k_{app2} (\text{s}^{-1})$	$k_{avg} (\text{s}^{-1})$
IC	50S	0.358 ± 0.009	0.099 ± 0.003	0.231 ± 0.010
IC+ TIG	50S	0.400 ± 0.013	0.034 ± 0.001	0.122 ± 0.004
IC + DEM	50S	0.216 ± 0.015	0.561 ± 0.053	0.363 ± 0.064

4.1.2.4. ***Efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en el acoplamiento de la subunidad ribosomal 50S al 30S IC***

Uno de los métodos llevados a cabo para monitorear la asociación y disociación de las subunidades ribosomales es a través de la técnica de dispersión de luz (*light scattering*) (Grunberg-Manago et al., 1975). Por tal motivo, para estudiar el efecto de Tigeciclina y Demeclociclina en la formación del complejo ribosomal 70S, utilizando un equipo *Stopped Flow*, se mezcló el complejo de iniciación 30S incubado previamente con cada tetraciclina contra la subunidad ribosomal 50S. La señal registrada corresponde a la luz que se dispersa al formarse el complejo ribosomal 70S.

Se observó que la señal de luz dispersa registrada aumenta exponencialmente en el tiempo para ambos ensayos (Figura 12). Esto indica que ambas subunidades se están asociando formando el 70S IC. La asociación registrada en condiciones normales (sin tetraciclinas) y en presencia de Tigeciclina alcanzan amplitudes parecidas. Sin embargo, la constante de velocidad obtenida al ensamblarse la subunidad 50S a la menor en presencia de Tigeciclina fue menor. Esto podría deberse al efecto estabilizador previamente observado de Tigeciclina en la proteína IF1, el cual debe desacoplarse de la subunidad menor, junto con los otros factores de iniciación para un correcto acoplamiento de la subunidad 50S.

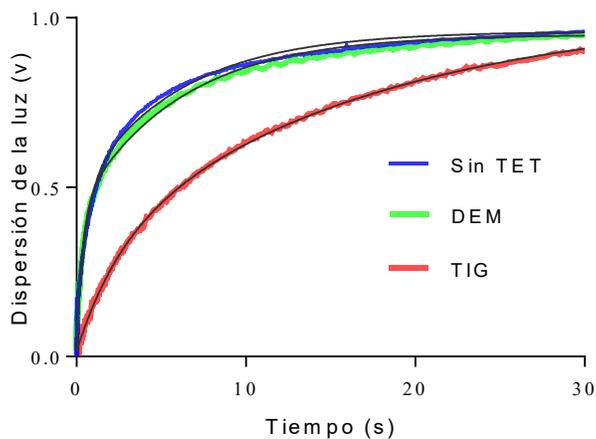


Figura 11. Acoplamiento de la subunidad ribosomal 50S al 30S IC. Curvas obtenidas por el aumento de la dispersión de la luz ocasionada por la formación del 70S IC en ausencia (azul) y presencia de las tetraciclinas (verde y rojo)

Las señales de acoplamiento de las subunidades ribosomales se ajustaron a una curva exponencial de dos fases y mediante un análisis no lineal se obtuvieron las constantes aparentes y amplitudes de dispersión de la luz. En ausencia del antibiótico la constante aparente promedio fue $k_{avg}=0.803\pm 0.014\text{ s}^{-1}$, mientras que en presencia de Tigeciclina se obtuvo $k_{avg}=0.157\pm 0.003\text{ s}^{-1}$. Esto indica que Tigeciclina ocasiona que la velocidad de asociación de ambas subunidades ribosomales disminuya 5 veces en relación a las condiciones en las cuales el antibiótico de tercera generación se encontraba ausente.

Tabla 5. Constantes de velocidad de disociación de IF1 en presencia de tetraciclinas durante el acoplamiento de la subunidad 70S

A	B	$k_{app1} (s^{-1})$	$k_{app2} (s^{-1})$	$k_{avg} (s^{-1})$
IC	50S	1.868±0.040	0.170±0.003	0.964±0.023
IC+ TIG	50S	0.284±0.005	0.061±0.001	0.185±0.004
IC + DEM	50S	2.842±0.054	0.168±0.002	1.336±0.061

4.1.3. Interpretación de los contactos de Tigeciclina y Demeclociclina con IF1

Los ensayos de cinética rápida realizados a ambas tetraciclinas mostraron cómo pueden impactar en la conformación estructural de IF3, en la estabilidad de la proteína IF1 a lo largo de las distintas etapas de la iniciación de la traducción y en la formación de la Complejo 70S. Aunque los datos mostrados brindan información aproximada de lo que sucede a nivel cinético, no informa acerca de las disposiciones estructurales ni de los posibles contactos entre los antibióticos y los factores de iniciación IF1 e IF3.

A partir de los estudios mencionados se modelaron las interacciones entre los dos antibióticos en dos complejos del inicio de la traducción, el complejo 30S PIC (PDB ID 5LMQ) y el Complejo 30S IC (PDB ID 5LMV) (Hussain et al., 20126) y también se utilizaron estructuras donde solamente se encontraba la subunidad 30S con Tigeciclina (PDB ID 1I97) y tetraciclina (PDB ID 4YHH) (Pioletti et al., 2001; Schedlbauer et al., 2015).

Los datos estructurales obtenidos a partir del 30S PIC y del 30S IC mostraron que tanto Tigeciclina como Demeclociclina interactúan con las siguientes estructuras ribosomales: h31 (963-966) y h34 (1052-1055, 1195-1199). Estas interacciones fueron reportadas en estudios previos en los cuales dichas hélices (h) de la subunidad 30S, suelen ser las principales estructuras con las cuales las tetraciclinas establecen contacto en el sitio A de la subunidad ribosomal 30S (Boelen & Gualerzi, 2002). En el modelamiento obtenido a partir de la subunidad ribosomal 30S y las tetraciclinas se observó que no hubo grandes diferencias en las interacciones entre antibióticos. Estaban presentes enlaces puente de hidrogeno con los nucleótidos G1053, C1195 y G1197, además de la importante interacción areno con C1054 (Figura 13).

Dado que Demeclociclina ocasionaba cambios en la afinidad de IF1 en distintas etapas de la iniciación, se modeló este antibiótico en el complejo 30S PIC y se reportaron interacciones iónicas entre el grupo NH del C4 de Demeclociclina y el C1054 (de la subunidad 30S). Mientras que en el 30S IC, el C1054 de la subunidad menor establecía enlaces puentes de hidrógeno con los grupos OH y CO de C10 y C11 respectivamente. Además, en esta etapa la retención de IF1 podría justificarse al notarse dos interacciones exclusivas de Demeclociclina, observándose así que el residuo A1397 de la hélice 28 establece un enlace puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del C12.

Tigeciclina presenta cercanía al nucleótido U40 del ARNr, el cual a su vez se encuentra cerca del dominio carbono terminal de IF3 en la estructura del 30S PIC. Además, presenta interacciones particulares en el 30S IC con hélice 18. Sin embargo, la figura 13(b), muestra posibles contactos con 6 aminoácidos de IF1 (Lys39, Met42, His43, Tyr44, Ile45 y Arg70) en el 30S IC, explicando así el efecto potente de Tigeciclina sobre la afinidad de IF1, el cual es mayor que

Demeclociclina, que solo muestra 3 posibles contactos. De manera adicional al efecto del residuo tert-butilamidoglicol, exclusivo de Tigeciclina, este residuo interactúa químicamente con el grupo funcional imidazol de la histidina 43, siendo estos contactos adicionales importante para explicar el comportamiento de este antibiótico a lo largo del inicio de la traducción.

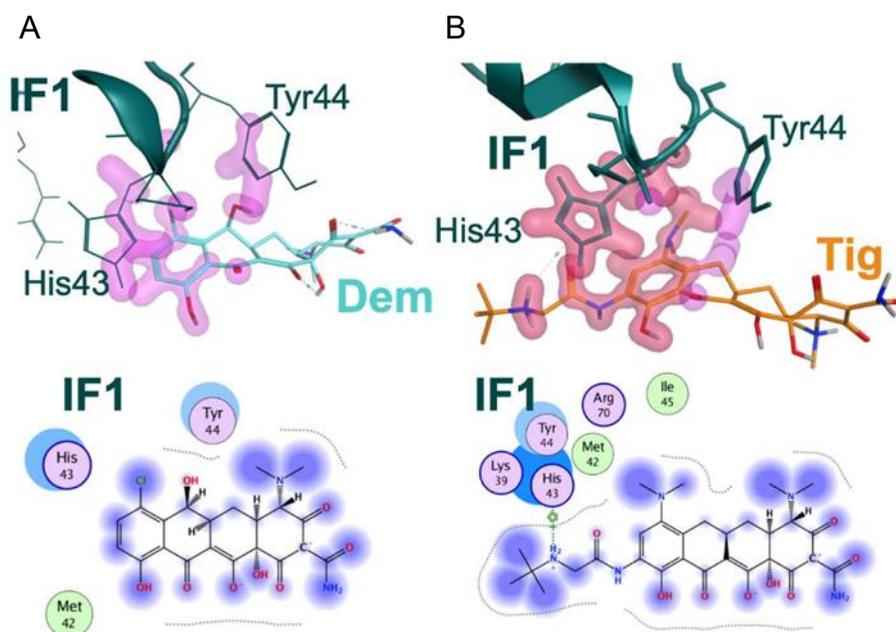


Figura 12. Modelamiento del sitio de unión de las tetraciclinas usadas en el 30S IC (PBD: 5LMN). Acercamiento a los sitios de unión de (A) Demeclociclina y de (B) Tigeciclina, detallándose un mapa de interacción en la parte inferior de cada una. Los residuos de IF1 que se aproximan a las tetraciclinas están representadas en círculos. Las líneas punteadas que rodean a las tetraciclinas corresponden a la distancia al interior del sitio de unión. La interacción areno-catiónica está representada en color verde. Fuente: Barrenechea et al (2021)

4.2. Discusión

El nuevo grupo de tetraciclinas fueron llamadas glicilciclinas, por el grupo glicilo en el C9 del anillo D del núcleo de su estructura (Chopra, 2002). Entre las más conocidas y estudiadas de este nuevo grupo, se tiene a la Tigeciclina, la cual posee una mejor actividad antimicrobiana (Rasmussen et al., 1994; Bergeron et al., 1996) debido a la mayor afinidad que le confiere el residuo glicilo en el C9 (Bauer et al., 2004). Si bien el mecanismo de acción conocido señala su unión a la subunidad ribosomal 30S para impedir la unión del aminoacil-tRNA (Commancher and Mandel, 1965; Suzuka et al., 1966) en la etapa de la elongación, la cercanía de su sitio de unión (sitio A) con otros componentes como IF1, podrían develar posibles efectos no conocidos en la etapa más temprana de la traducción bacteriana.

Las primeras pruebas cinéticas fueron llevadas a cabo en un complejo temprano de traducción (30S-IF3_{DL}) ante la llegada de cada tetraciclina. Las señales mostraron disminución de la fluorescencia ante la llegada de ambas tetraciclinas al complejo 30-IF3_{DL}, indicando así que los dominios de IF3 (amino y carbono terminal) se están aproximando por el acoplamiento de las tetraciclinas a la subunidad menor (Figura 4, 5). Este primer efecto sobre la conformación estructural en IF3 ya da luz del gran impacto que estos antibióticos tienen el inicio de la traducción, debido a que IF3 se encuentra presente en todas las etapas del inicio hasta llegar a conformar 70S IC (Milón et al., 2008; Takahashi et al., 2013). Si bien estos cambios sucedieron en ambas tetraciclinas, Tigeciclina ocasionó que el acercamiento de los dominios sea más rápido en comparación a Demeclociclina (Figura 4)

Por otro lado, siguiendo el curso hacia la formación del Complejo 70S, el presente trabajo probó los cambios de la conformación de IF3 en el Complejo 30S-IF1-IF3_{DL}. Se observó que al igual que en el experimento anterior, la fluorescencia disminuye, sin embargo, las amplitudes obtenidas para ambas tetraciclinas fueron menores y más lentas en el tiempo a las observadas en los complejos en ausencia de IF1 (Figura 5). El cambio conformacional de abierto a cerrado de IF3, ocurre también al unirse IF1 al Complejo 30S-IF3 (Elvekrog and Gonzalez, 2013; Chullunkuy et al., 2016), por lo que se podría inferir que Tetraciclinas estaría ocasionando los mismos efectos que IF1 al unirse al complejo. Por tanto, la disminuida amplitud obtenida en estos experimentos, corresponden a un previo acercamiento de los dominios de IF3 por causa de IF1. Dado que IF1 y las tetraciclinas ocasionan el mismo resultado en IF3, se podría evidenciar que las tetraciclinas actuarían como los IF1 en etapas tempranas del inicio de la traducción. Los datos cinéticos muestran que tanto Demeclociclina, como Tigeciclina ocasionaron que la constante de velocidad de disociación (k_{-1}) de IF3 disminuyera cuando IF1 se encontraba presente (Figura 5), lo cual indica como IF1 y las tetraciclinas actúan cooperativamente para estabilizar más el Complejo 30S-IF3-IF1. Esta función de cooperación podría explicarse principalmente debido al hecho de que ambas se unen en el sitio A de la subunidad menor (Carter et al, 2001; Chopra, 1985). Si comparten similares funciones, las tetraciclinas podrían también influir en la afinidad de IF3 y viceversa, esto debido a que estudios previos mostraron que ambos factores, IF1 y IF3, de iniciación actúan de manera cooperativa incrementando la afinidad uno del otro (Milon et al., 2012; Takahashi et al., 2013). Por otra parte, de acuerdo a estructuras obtenidas por criomicroscopía electrónica, este efecto cooperativo sería explicado por contactos entre el CTD de IF3 e IF1 en etapas tempranas de la iniciación (30S-IFs) (Hussain et al., 2016).

Las constantes cinéticas obtenidas nos revelan importantes hallazgos acerca de la estabilidad de IF1 en el complejo 30S-IF3-IF1, en presencia de las tetraciclinas. Como se observa en la Figura 5, 6 la ausencia o presencia de IF1 parece no afectar la k_1 en presencia de Demeclociclina. Solamente los valores de las constantes de velocidad reversa mostraron una diferencia en el cual, k_{-1} en presencia de IF1 es cercano a cero. Dicho resultado podría evidenciar el efecto estabilizador de IF1 sobre el cambio estructural de IF3 en etapas tempranas de la formación del complejo de iniciación. Esta estabilización podría traducirse como un cambio en la estructura de IF3, que mejora la afinidad por la subunidad ribosomal 30S.

En el caso de Tigeciclina, la disminución de señal fue visiblemente más rápida que a la llegada de Demeclociclina. La amplitud obtenida fue cercana a la unidad en el complejo con ausencia de IF1, mientras que en presencia de IF1 la amplitud disminuye menos de la mitad. Además, la constante $k_{-1}=2.932 \pm 0.353 \text{ s}^{-1}$ que se obtuvo del complejo sin IF1, mostró una disminución considerable en presencia de IF1 ($k_{-1}= -0.02 \pm 0.22 \text{ s}^{-1}$). Esto muestra la cómo la afinidad de IF3 por la 30S se ve mejorada por la presencia de IF1 en el Complejo. El presente ensayo postula que dicho efecto en la disociación sobre IF1 podría asociarse a un posicionamiento del antibiótico en el sitio A del ribosoma que favorecería algún tipo de interacción con IF1, ocasionando así que la eyección de la proteína se vea afectada. Adicionalmente, el análisis cinético permite apuntar a que los grupos químicos propios de Tigeciclina podrían hacer más lento el proceso de disociación de IF1.

Dado el efecto de las tetraciclinas sobre IF1, al realizarse un seguimiento a los cambios de velocidad de disociación de este importante factor de iniciación en las distintas etapas hasta la formación del 70S IC, se observó que, de manera general, disminuye la velocidad a la cual se disocia IF1 de cada complejo (Figura 8, 9, 10). Ya en el 30S PIC se observó cómo Tigeciclina consiguió aumentar al doble el tiempo en que IF1 se disociaba, la presencia de Demeclociclina por su parte también ocasionó una disminución de la disociación, aunque en menor medida en comparación con Tigeciclina. Desde el punto de vista estructural, la principal diferencia entre Demeclociclina y Tigeciclina es el residuo 9-t-butilglicilamido unido al anillo D de Tigeciclina, y cuyo átomo glicil nitrógeno establece una interacción por apilamiento con el orbital π de la nucleobase C1054 del ARNr 16S, esto a su vez parece mejorar el apilamiento entre C1054 y U1196 (Jenner et al, 2013). Esta diferencia estructural explicaría no solo que Tigeciclina tenga una afinidad aproximada de 10 a 100 veces más alta por el ribosoma (Schedlbauer et al, 2015), sino también el incremento de estabilidad de IF1 por su sitio de unión. No obstante, al analizar los resultados estructurales, en esta etapa no se observó contactos adicionales de Tigeciclina que sustenten los datos cinéticos (Ver Figura 5 del material suplementario de Barrenechea et al, 2021). Caso contrario a Demeclociclina, que a pesar de no tener el mismo efecto cinético sobre IF1, a nivel estructural destaca por la formación de enlaces puente de hidrogeno entre el residuo U1196 y los C6 y C11 de la tetraciclina.

En contraste con el comportamiento cinético de Tigeciclina en el 30S PIC, los resultados mostraron que la presencia de Demeclociclina ocasionó la mayor disminución de la velocidad de disociación de IF1 en el 30S IC. Este paso es seguido por una mayor estabilización entre la interacción del ARNm y el 30S, el cual es atribuido a la unión codón-anticodón en el sitio P (Matsuda et al., 2012). Esta transición (de 30S PIC a 30S IC) representa el primer punto de control traduccional llevada a cabo por los factores de iniciación. Por tanto, estos

cambios de afinidad de IF1 observados por los datos cinéticos, indicarían que Demeclociclina (y Tigeciclina en menor medida), podría afectar también afectar la tarea de IF1 en el control de acoplamiento ligandos canónicos en el centro de decodificación, debido a que IF1 podría contribuir con la selección fiel del sitio de inicio del ARNm (Moazed et al., 1995). Los datos obtenidos por el modelamiento mostraron por otra parte que Tigeciclina formó contactos exclusivos en el 30S IC con la hélice 18 y contactos adicionales, específicamente a la interacción areno con His43 y a los potenciales contactos con Lys39, Tyr44 o Met42 (Figura 13).

En las últimas etapas de la iniciación bacteriana, a partir de los experimentos cinéticos de FRET y *Light scattering*, se observó que solamente Tigeciclina ocasionaba un visible retraso en la asociación de la subunidad 50S. Las señales FRET mostraron la retención de IF1 en el complejo que podría estar alterando el sitio de unión del aminoacil-tRNA (Figura 11), mientras que en el siguiente ensayo el acoplamiento 50S es lento por el retraso de eyección de IF1 causado por Tigeciclina (Figura 12). Estudios realizados por Ramakrishnan (2002) y Milón et al. (2008), presentaron que IF1 promueve cambios a larga distancia dentro de la subunidad 30S. Estos cambios, que son cruciales para el equilibrio asociación-disociación de las subunidades ribosomales, pueden ser drásticamente afectados por la retención o demora de disociación de IF1 como se comprobó en el estudio presente. Esto sumado al hecho de que IF3 impide estéricamente la formación de puentes entre las subunidades, disminuyendo el acoplamiento del 50S (Julian et al., 2011; Dallas & Noller, 2001). En condiciones normales durante la transición de 30 IC a 70S IC, ocurre la disociación de IF1, el cual también es producido por la disociación de IF3, cuya presencia incrementa su afinidad por el 30S (Celano et al., 1988). Las tetraciclinas, como se acaba de reportar en este trabajo, podrían impactar el correcto desenvolvimiento de las funciones de IF1. Así ésta etapa se estaría sumando como blanco de un mecanismo alternativo

premature de inhibición, mostrando de esta manera que aún hay funciones que hasta el momento no son del todo conocidas en el grupo de las tetraciclinas.

5. CONCLUSIONES

1. La unión de las tetraciclinas al complejo 30S-IF3, ocasiona que los dominios de IF3 se acerquen, adquiriendo así una conformación cerrada.
2. La unión de las tetraciclinas al complejo 30S-IF3-IF1, ocasiona que los dominios de IF3 se acerquen, resultando en un aumento de la afinidad de IF1 por su sitio de unión. Dicho efecto varía a lo largo de la progresión del mecanismo de inicio de la traducción en bacterias.
3. La transición de 30S IC a 70S IC es perturbada por Tigeciclina al impedir la disociación eficiente de IF1 y ralentizando el acoplamiento del 50S.
4. Los análisis estructurales explicaron las posibles razones del aumento de afinidad de IF1 en los distintos complejos, al revelar contactos no reportados entre Tigeciclina e IF1 en el Complejo 30S IC.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batool, Z.; Lomakin, I.B.; Polikanov, Y.S.; Bunick, C.G. Sarecycline interferes with tRNA accommodation and tethers mRNA to the 70S ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2020), *117*, 20530–20537
- Barrenechea, V., Vargas-Reyes, M., Quiliano, M., & Milón, P. (2021). A Complementary Mechanism of Bacterial mRNA Translation Inhibition by Tetracyclines. *Frontiers in microbiology*, *12*, 682682. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682682C>
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *56*(10), 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Boelens, R., & Gualerzi, C. O. (2002). Structure and function of bacterial initiation factors. *Current protein & peptide science*, *3*(1), 107-119
- Brodersen DE, Clemons, W. M., Jr, Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, *103*(7), 1143–1154. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00216-6)
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., MorganWarren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T, and Ramakrishnan, V. (2001) Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* *291*, 498 – 501
- Chopra I. (2002). New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug Resist Updates* *5*:119–125

- Chulluncuy, R., Espiche C., Nakamoto, J. A., Fabbretti, A., & Milón, P. (2016). Conformational Response of 30S-bound IF3 to A-Site Binders Streptomycin and Kanamycin. *Antibiotics*, 5(4), 38.
- Clegg, R. M. (1996). Fluorescence resonance energy transfer. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Herman, B & Wang, X. F., eds), vol. 137, pp. 179-215, Wiley, New York.
- Craven, G.R., R. Gavin & T. Fanning. (1969). The transfer RNA binding site on the 30S ribosome and the site of tetracycline inhibition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34: 129–134.
- Dahlquist, K. D., and J. D. Puglisi. (2000). Interaction of translation initiation factor IF1 with the E. coli ribosomal A site. *J. Mol. Biol.* 299:1–15.
- Demerec, C M. (1949). Pattern of bacterial resistance of penicillin, aureomycin and streptomycin. *J. Clin. Invest.* 28: 891-893
- Boelens, R., & Gualerzi, C. O. (2002). Structure and Function of Bacterial Initiation Factors. *Current Protein and Peptide Science*, 3(1), 107–119. <https://doi.org/10.1023/A:1016100000000>
- Dong, Z., Abbas, M. N., Kausar, S., Yang, J., Li, L., Tan, L., & Cui, H. (2019). Biological Functions and Molecular Mechanisms of Antibiotic Tigecycline in the Treatment of Cancers. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3577. <https://doi.org/10.3390/ijms20143577>
- Dottavia-Martin, D., Suttle, D.P., and Ravel, J.M. (1979). The effects of initiation factors IF-1 and IF-3 on the dissociation of Escherichia coli 70 S ribosomes. *FEBS Lett.* 97, 105–110.
- Fabbretti, A., Pon, C. L., Hennelly, S. P., Hill, W. E., Lodmell, J. S., & Gualerzi, C. O. (2007). The real-time path of translation factor IF3 onto and off the ribosome. *Molecular cell*, 25(2), 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.011>

- Fabbretti, A., Schedlbauer, A., Brandi, L., Kaminishi, T., Giuliadori, A. M., Garofalo, R., Ochoa-Lizarralde, B., Takemoto, C., Yokoyama, S., Connell, S. R., Gualerzi, C. O., & Fucini, P. (2016). Inhibition of translation initiation complex formation by GE81112 unravels a 16S rRNA structural switch involved in P-site decoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(16), E2286–E2295
- Fortier, P. L., Schmitter, J. M., Garcia, C. and Dardel, F. (1994) The N-terminal half of initiation factor IF3 is folded as a stable independent domain. *Biochimie* 76, 376 – 383
- Föster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 2, 55-75
- Gottesman, M.E. (1967). Reaction of the ribosome-bound peptidyltransfer ribonucleic acid with aminoacyl transfer ribonucleic acid or puromycin. *J. Biol. Chem.* 242: 5564– 5571.
- Gottlieb, M., Davis, B., & Thompson, R. (1975). Mechanism of Dissociation of Ribosomes of *Escherichia coli* by Initiation Factor IF-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(11), 4238-4242
- Goyal, A., Belardinelli, R., Maracci, C., Milón, P., & Rodnina, M. V. (2015). Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. *Nucleic acids research*, 43(22), 10700–10712. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv869>
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387.
- Grunberg-Manago, M., Dessen, P., Pantaloni, D., Godefroy-Colburn, T., Wolfe, A. D., & Dondon, J. (1975). Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of molecular biology*, 94(3), 461–478.

- Harzt, D., McPheeters, D. S., & Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes & development*, 3(12A), 1899–1912.
- Hickerson, R., Majumdar, Z. K., Baucom, A., Clegg, R. M., & Noller, H. F. (2005). Measurement of internal movements within the 30 S ribosomal subunit using Förster resonance energy transfer. *Journal of molecular biology*, 354(2), 459–472
- Jenner L., Starosta A. L., Terry D. S., Mikolajka A., Filonava L., Yusupov M., et al. (2013). Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 3812–3816. [10.1073/pnas.1216691110](https://doi.org/10.1073/pnas.1216691110)
- Kycia, J. H., Biou, V., Shu, F., Gerchman, S. E., Graziano, V., & Ramakrishnan, V. (1995). Prokaryotic translation initiation factor IF3 is an elongated protein consisting of two crystallizable domains. *Biochemistry*, 34(18), 6183–6187
- Lakowicz, J. R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd edit, Kluwer Academic/ Plenum Press, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
- Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 69(1), 101–123. [doi:10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005](https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005)
- Laxminarayan, R. (2022). The overlooked pandemic of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 606–607. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00087-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00087-3)
- Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2006). Rate, accuracy and cost of ribosomes in bacterial cells. *Biochimie*, 88(8), 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.019>
- Matzov, D., Bashan, A., & Yonath, A. (2017). A Bright Future for Antibiotics?. *Annual review of biochemistry*, 86, 567–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044617>

- McCormick, J., Sjolander, N., Hirsch, U., Jensen, E., and Doerschuk, A. (1957). A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4561–4563. doi: 10.1021/ja01573a089
- Myasnikov, A.G., Simonetti, A., Marzi, S., Klaholz, B.P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol* ; 19:300–309
- Milon, P., Konevega, A. L., Peske, F., Fabbretti, A., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. V. (2007). Transient kinetics, fluorescence, and FRET in studies of initiation of translation in bacteria. *Methods in enzymology*, 430, 1-30. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)30001-3](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)30001-3)
- Milón, P., Konevega, A. L., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. v. (2008). Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation. *Molecular Cell*, 30(6), 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.014>
- Milón, P., Maracci, C., Filonava, L., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. v. (2012). Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2285>
- Milón, P., & Rodnina, M. v. (2012). Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(4), 334–348. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.678284>
- Moreau, M., de Cock, E., Fortier, P.-L., Garcia, C., Albaret, zChristine, Blanquet, S., Lallemand, J.-Y., & Dardel, F. (1997). Heteronuclear NMR studies of E. coli translation initiation factor IF3. Evidence that the inter-domain region is disordered in solution 1 1 Edited by K. Nagai. *Journal of Molecular Biology*, 266(1), 15–22. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0756>
- Nelson, N. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241, 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>

- Nguyen, F., A., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanism. *Biol Chem* 395: 559-575
- Olson, C. L., Graffe, M., Springer, M., & Hershey, J. W. (1996). Physiological effects of translation initiation factor IF3 and ribosomal protein L20 limitation in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics: MGG*, 250(6), 705–714
- Petersen, P. J., Jacobus, N. V., Weiss, W. J., Sum, P. E., & Testa, R. T. (1999). In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylicycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4), 738–744. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.738>
- Pfab, C., Schnobrich, L., Eldnasoury, S., Gessner, A., & El-Najjar, N. (2021). Repurposing of Antimicrobial Agents for Cancer Therapy: What Do We Know? *Cancers*, 13(13), 3193. <https://doi.org/10.3390/cancers13133193>
- Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., et al. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 20, 1829–1839
- Pon, C. L. and Gualerzi, C. O. (1984) Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30S initiation complex formation. *FEBS Lett.* 175, 203–207
- Petrelli, D., LaTeana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C. L., & Gualerzi, C. O. (2001). Translation initiation factor IF3: Two domains, five functions, one mechanism? *EMBO Journal*, 20(16), 4560–4569. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4560>
- Polikanov, Y. S., Steitz, T. A., Gagnon, M. G., Zhou, D., & Lin, J. (2018). Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>

- Rodnina, M. v. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A032664>
- Rozenblum, G. T., Lopez, V. G., Vitullo, A. D., & Radrizzani, M. (2016). Aptamers: current challenges and future prospects. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(2), 127–135. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1126244>
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572
- Sands, J. F., Cummings, H. S., Sacerdot, C., Dondon, L., Grunberg-Manago, M., & Hershey, J. W. (1987). Cloning and mapping of *infA*, the gene for protein synthesis initiation factor IF1. *Nucleic acids research*, 15(13), 5157–5168. <https://doi.org/10.1093/nar/15.13.515>
- Sette, M. Spurio, R., van Tilborg, P., Gualerzi, C. O., & Boelens, R. (1999). Identification of the ribosome binding sites of translation initiation factor IF3 by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(1), 82–92. <https://doi.org/10.1017/s1355838299981487>
- Schedlbauer, A., Kaminishi, T., Ochoa-Lizarralde, B., Dhimole, N., Zhou, S., López-Alonso, J. P., Connell, S. R., & Fucini, P. (2015). Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to the bacterial ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2849–2854. <https://doi.org/10.1128/AAC.04895-14>
- Suarez-Rivero, J. M., Pastor-Maldonado, C. J., Povea-Cabello, S., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Talaverón-Rey, M., Suárez-Carrillo, A., Munuera-Cabeza, M., & Sánchez-Alcázar, J. A. (2021). Mitochondria and Antibiotics: For Good or for Evil?. *Biomolecules*, 11(7), 1050. <https://doi.org/10.3390/biom11071050>
- Sum, P. E., Lee, V. J., Testa, R. T., Hlavka, J. J., Ellestad, G. A., Bloom, J. D., Gluzman, Y., & Tally, F. P. (1994). Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *Journal of medicinal chemistry*, 37(1), 184–188. <https://doi.org/10.1021/jm00027a023>

- Wilson, D. N. (2009). The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(6), 393–433. <https://doi.org/10.3109/10409230903307311>
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wintermeyer, W., & Gualerzi, C. (1983). Effect of Escherichia coli Initiation Factors on the Kinetics of N-AcPhe-tRNAPhe Binding to 30S Ribosomal Subunits. A Fluorescence Stopped-Flow Study. *Biochemistry*, 22(3), 690–694. <https://doi.org/10.1021/bi00272a025>
- Wintermeyer, W., Peske, F., Beringer, M., Gromadski, K. B., Savelsbergh, A., & Rodnina, M. V. (2004). Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 5), 733–737
- Zavala-Flores, E., Salcedo-Matienzo, J., Zavala-Flores, E., & Salcedo-Matienzo, J. (2020). Medicación prehospitalaria en pacientes hospitalizados por COVID-19 en un hospital público de Lima-Perú. *Acta Médica Peruana*, 37(3), 393–395. <https://doi.org/10.35663/AMP.2020.373.1277>
- Xu, Z., Yan, Y., Li, Z., Qian, L., & Gong, Z. (2016). The Antibiotic Drug Tigecycline: A Focus on its Promising Anticancer Properties. *Frontiers in pharmacology*, 7, 473. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.004>
- Zhanel, G., Critchley, I., Lin, L. Y., & Alvandi, N. (2018). Microbiological Profile of Sarecycline, a Novel Targeted Spectrum Tetracycline for the Treatment of Acne Vulgaris. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(1), e01297-18