



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

Evaluación de la interacción de la proteína
ribosomal S1 de *Mycobacterium tuberculosis*
con el ácido pirazinoico y su posible relación
con el mecanismo de resistencia a la
pirazinamida

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

Katherine Jaqueline Vallejos Sánchez

LIMA - PERÚ

2018

Asesor de tesis

PhD. Mirko Zimic Peralta

Dedicatoria

A mis padres Oscar y Flora, por su apoyo incondicional y su constante motivación a ser mejor profesional.

A mi hermano José, por ser mi compañero y mejor amigo.

A Jorge por su paciencia y compañerismo.

A mis amigas, amigos de la maestría y del LID por acompañarme en este reto.

A mis queridos profesores de la Maestría en Bioquímica y Biología Molecular por su apoyo y motivación a dar lo mejor, siempre orientándome a tener un pensamiento crítico.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Mirko Zimic y Patricia Sheen por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular y brindarme su tiempo, conocimientos y confianza.

Se agradece a la Dra. Helena Maruenda Castillo y el Doctor Juan Manuel Lopez Smith de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP), quienes a través de los fondos Programa Innóvate Perú del Ministerio de la Producción (203-INNOVATEPERU-EC-2016) implementaron la metodología basada en Resonancia Magnética Nuclear utilizada en los estudios descritos en este trabajo de tesis. Todos los espectros de RMN fueron procesados y evaluados por el Dr. Juan Manuel Lopez, utilizando el instrumento Bruker Avance III HD 500 MHz disponible en el Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del Departamento de Ciencias, Sección Química, de la PUCP. En especial, se reconoce el apoyo y asesoramiento recibido del Dr. Juan Manuel Lopez en la preparación y revisión del manuscrito de esta tesis.

Al Dr. Mario Amzel y Dr. Harry Saavedra de la Escuela de Medicina de la Universidad John Hopkins, Departamento de Biofísica y Química Biofísica, por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo del experimento de microcalorimetría de titulación isotérmica.

Al Dr. Robert Gilman de la Universidad John Hopkins por su apoyo y consejos.

Al grupo NanoTemper y Laboratorio de Biofármacos recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad de Concepción de Chile,

por permitirme el uso de Monolith NT.115 pico y desarrollo de la termoforesis a microescala.

Al Dr. Pohl Milon de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Laboratorio de Biología Molecular por su apoyo en la evaluación de la eficiencia de traducción del ribosoma quimérico.

A mis colegas y amigos del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo - UPCH, por su tiempo y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Los fondos del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú con número de contrato 151-PNICP-PIAP-2015) financiaron el desarrollo de este trabajo de tesis.

INDICE

1. Introducción	1
2. Planteamiento de la investigación	5
2.1.Planteamiento del problema	5
2.2.Marco teórico	8
2.2.1. Tuberculosis y la situación actual a nivel mundial	8
2.2.1.1.Agente causal de la tuberculosis: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.2.1.2.Patogenia y mecanismo de evasión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> al sistema immune	10
2.2.2. Drogas antituberculosas	11
2.2.3. Pirazinamida (PZA)	13
2.2.3.1.Mecanismo de acción de la pirazinamida en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
2.2.3.2.Mecanismos de resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a pirazinamida	15
2.2.4. Proteína ribosomal S1 (RpsA) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.2.5. Trans-traducción, como mecanismo de salvataje de ribosomas	18

2.2.6. Interacción entre RpsA, tmRNA y el ácido pirazinoico	20
2.2.7. Métodos para la evaluación de la interacción proteína ligando, aplicados a la medición de la interacción RpsA/POA y RpsA/tmRNA	23
2.2.7.1. Acoplamiento “docking” molecular	23
2.2.7.2. Cambio de movilidad electroforética (EMSA)	24
2.2.7.3. Microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC)	24
2.2.7.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	26
2.2.7.5. Termoforesis a microescala (MST)	32
2.3. Justificación del estudio	34
2.4. Objetivos	36
2.4.1. Objetivo general	36
2.4.2. Objetivos específicos	36
3. Metodología	37
3.1. Procedimientos y técnicas	38
3.1.1. Evaluación <i>in silico</i> de la capacidad de interacción del extremo C-terminal con el sitio de unión a POA en el cuarto dominio S1 en RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, por la técnica de dinámica molecular	38
3.1.2. Evaluación <i>in silico</i> de la capacidad de interacción de péptidos del extremo C-terminal de RpsA con el sitio de unión de POA mediante “docking” molecular	39

3.1.3. Diseño y síntesis de los genes codantes correspondientes a variantes de RpsA- Δ Ala438 con distintos tamaños del extremo C-terminal no-estructurado	40
3.1.4. Clonación, expresión y purificación de las variantes de RpsA	40
3.1.5. Evaluación de la interacción del tmRNA-RpsA y competencia del POA –tmRNA por RpsA mediante EMSA	41
3.1.5.1.Extracción de ADN genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
3.1.5.2.Síntesis y purificación del gen <i>ssrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para la producción de tmRNA	43
3.1.5.3.Transcripción del gen <i>ssrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para la producción de tmRNA	44
3.1.5.4.Evaluación de la interacción y competencia de tmRNA y POA por el sitio de unión en el RpsA	44
3.1.6. Evaluación de la interacción de las variantes de RpsA con POA y tmRNA mediante microcalorimetría de titulación isotérmica	45
3.1.7. Evaluación de la interacción entre RpsA y POA mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear	46
3.1.7.1.Perturbación del cambio químico (NMR-CSP)	47
3.1.7.2.Difusión (NMR-D)	47
3.1.7.3.Diferencia de la transferencia de saturación (NMR-STD)	47

3.1.8. Evaluación de la interacción del tmRNA y RpsA mediante termoforesis a microescala	48
3.1.9. Efecto de la adición del RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el ribosoma de <i>Escherichia coli</i> sobre la traducción de proteínas <i>in vitro</i>	49
3.2. Consideraciones éticas	49
3.3. Análisis de datos	50
4. Resultados	51
4.1.1. Evaluación <i>in silico</i> de la capacidad de interacción del extremo C-terminal con el sitio de unión a POA en el cuarto dominio S1 en RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, por la técnica de dinámica molecular	51
4.1.2. Evaluación <i>in silico</i> de la capacidad de interacción de péptidos del extremo C-terminal de RpsA con el sitio de unión de POA mediante “docking” molecular	54
4.1.3. Diseño y síntesis de los genes codantes correspondientes a variantes de RpsA Δ Ala438 con distintos tamaños del extremo C-terminal no-estructurado	56
4.1.4. Clonación, expresión y purificación de las variantes de RpsA	59
4.1.5. Evaluación de la interacción del tmRNA-RpsA y competencia del POA –tmRNA por RpsA mediante EMSA	61

4.1.5.1.Extracción de ADN genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
4.1.5.2.Síntesis y purificación del gen <i>ssrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para la producción de tmRNA	62
4.1.5.3.Transcripción del gen <i>ssrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para la producción de tmRNA	63
4.1.5.4.Evaluación de la interacción y competencia de tmRNA y POA por el sitio de unión en el RpsA	63
4.1.6. Evaluación de la interacción de las variantes de RpsA con POA y tmRNA mediante calorimetría de titulación isotérmica	64
4.1.7. Evaluación de la interacción entre RpsA y POA mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear	67
4.1.7.1.Perturbación del cambio químico (NMR-CSP)	67
4.1.7.2.Difusión (NMR-D)	68
4.1.7.3.Diferencia de la transferencia de saturación (NMR-STD)	71
4.1.8. Evaluación de la interacción del tmRNA y RpsA mediante termoforesis a microescala	72
4.1.9. Efecto de la adición del RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el ribosoma de <i>Escherichia coli</i> sobre la traducción de proteínas <i>in vitro</i>	73
5. Discusión	74

6. Conclusiones	84
7. Recomendaciones	85
8. Referencias bibliográficas	86
Anexos	

LISTA DE TABLAS

Tabla 01. Perfil de tuberculosis en el Perú.	9
Tabla 02. Dosis recomendadas de drogas anti-tuberculosas de primera línea para adultos.	12
Tabla 03. Propiedades magnéticas de núcleos comúnmente estudiados por NMR.	29
Tabla 04. Secuencia de péptidos que interferirían estéricamente con POA y propuesta para la generación de variantes de RpsA Δ Ala438.	54
Tabla 05. Constante de difusión y radio hidrodinámico del RpsA nativo, POA y RpsA nativo-POA mediante NMR-D.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Reacción química de la reacción de Wayne.	6
Figura 02. Mapa global de la incidencia de la tuberculosis en el mundo.	9
Figura 03. Drogas de primera línea y sus blancos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	12
Figura 04. Conversión de nicotinamida y PZA a ácido nicotínico y POA.	13
Figura 05. Mecanismo de conversión de la nicotinamida por acción de la nicotinamidasa micobacterial.	14
Figura 06. Modo de acción de la pirazinamida.	15
Figura 07. Mutaciones en el gen <i>pncA</i> asociadas a resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a pirazinamida.	16
Figura 08. Esquema de la proteína ribosomal S1 de <i>Escherichia coli</i> , relación dominios – función.	17
Figura 09 Esquema de la proteína ribosomal S1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	17
Figura 10. Cristal de RpsA-S1-nativo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	18
Figura 11. Rescate de ribosomas mediante trans-traducción.	19
Figura 12. Alineamiento múltiple del RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> DHM444 y <i>M smegmatis</i> .	20

Figura 13 . Comparación de cristales de RpsA-S1-nativo y RpsA-S1- Δ Ala438.	21
Figura 14. Cristal del cuarto dominio de RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en complejo con POA.	22
Figura 15. Cristal RpsA-S1-nativo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mostrando los sitios de interacción comunes para tmRNA/POA.	22
Figura 16. Esquema de microcalorímetro de titulación isotérmica - Esquema de un experimento de ITC.	26
Figura 17. Esquema de la detección de la señal por NMR.	28
Figura 18. Esquema de un experimento de difusión.	31
Figura 19. Esquema del espectro 1D de la diferencia de la transferencia de saturación por NMR.	32
Figura 20. Óptica utilizada en MST y señal de un experimento típico.	33
Figura 21. Equipo de termoforesis y marcaje de proteínas.	48
Figura 22. Predicción de las regiones altamente flexibles de la RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	51
Figura 23. Visualización de la estabilidad de estructuras secundarias mediante cálculos de dinámica molecular.	53
Figura 24. Análisis de la variación de la distribución del extremo carboxilo terminal de RpsA con respecto al sitio de unión (cuarto dominio S1) con el POA.	55

Figura 25. Esquema de cortes propuestos <i>in silico</i> para la generación de proteínas truncadas en el extremo C-terminal de RpsA.	56
Figura 26. Secuencia primaria RpsA Δ Ala438_CUT1.	57
Figura 27. Secuencia primaria de aminoácidos de RpsA Δ Ala438_CUT2.	57
Figura 28. Secuencia primaria de aminoácidos de RpsA Δ Ala438_CUT3.	58
Figura 29. Esquema de proteínas recombinantes producidas en el presente estudio.	58
Figura 30. Clonación y expresión de variantes de RpsA.	59
Figura 31. Proteína recombinante purificada del extracto celular.	60
Figura 32. Cuantificación y evaluación de la integridad del DNA genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	62
Figura 33. Amplificación del gen <i>ssrA</i> .	62
Figura 34. tmRNA del gen <i>ssrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	63
Figura 35. Competencia entre tmRNA y POA por RpsA.	64
Figura 36. Parámetros termodinámicos de la interacción RpsA nativo - tmRNA determinado por ITC.	65
Figura 37. Evaluación de la interacción RpsA nativo-POA determinado por ITC.	66
Figura 38. Espectro de NMR del ^1H en una dimensión de POA y RpsA.	67
Figura 39. Espectro de NMR del ^1H en una dimensión de POA-CSP.	68

Figura 40. Espectro NMR-D del ^1H en una dimensión de POA (A) y RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (B).	69
Figura 41. Determinación de la constante de difusión del RpsA nativo, POA y RpsA nativo-POA mediante NMR-D.	70
Figura 42. Espectro NMR del ^1H en una dimensión de POA- STD.	71
Figura 43 Evaluación de la interacción entre RpsA nativo y tmRNA por MST.	72
Figura 44. Efecto de la adición de RpsA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en la traducción <i>in vitro</i> del gen malato deshidrogenasa de <i>E. coli</i> en un sistema libre de células.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

TB	: tuberculosis
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
MDR-TB	: multidrogo resistencia
XDR-TB	: extrema resistencia a drogas
PZA	: pirazinamida
<i>pncA</i>	: gen que codifica la pirazinamidasa
PZasa	: pirazinamidasa
POA	: ácido pirazinoico
MIC	: concentración mínima inhibitoria
<i>rpsA</i>	: gen que codifica la proteína ribosomal S1
RpsA	: proteína ribosomal S1
<i>ssrA</i>	: gen que codifica el tmRNA
tmRNA	: ácido ribonucleico con regiones tipo mensajero y de transferencia
EMSA	: ensayo de cambio de la movilidad electroforética
¹ H	: protón de hidrógeno
NMR	: resonancia magnética nuclear
NMR-CSP	: perturbación del cambio químico
NMR-D	: difusión
NMR-STD	: Transferencia de saturación
MST	: termoforesis a microescala

ITC : calorimetría de titulación isotérmica

ADN : ácido desoxirribonucleico

ARN : ácido ribonucleico

Kd : constante de disociación

pb : pares de base

SAF : sulfato de amonio ferroso

sMLD : dominio tipo RNA del tmRNA

RESUMEN

La pirazinamida (PZA) es una pro-droga de primera línea utilizada en la lucha contra la tuberculosis, su importancia radica en el acortamiento del tiempo de tratamiento y su acción sobre micobacterias persistentes no replicantes. Hasta la fecha los mecanismos de acción y resistencia a PZA en *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) no son conocidos completamente. Se postuló que PZA podría inhibir el proceso de trans-traducción, debido a que el ácido pirazinoico (POA), forma activa de PZA, puede unirse al RpsA y competir con el tmRNA, cofactor natural de la proteína. La delección en alanina 438 en el extremo carboxilo terminal de RpsA (Δ A438) fue asociada a la pérdida de afinidad por POA, causando resistencia a PZA.

El objetivo del estudio fue entender la manera en que Δ Ala438 en RpsA estaría asociada a la resistencia a PZA en MTB. Para esto se expresaron RpsA nativa, RpsA Δ Ala438, RpsA Δ A438 truncadas en distintos niveles hacia el extremo carboxilo terminal y se sintetizó *in vitro* tmRNA. Se midieron y compararon las interacciones entre RpsA-tmRNA, RpsA-POA y se evaluó la competencia entre tmRNA y POA por la unión con el RpsA.

Los experimentos revelaron la ausencia de afinidad entre RpsA nativo y variantes con el POA; así como la incapacidad del POA de competir y desplazar el tmRNA una vez formado el complejo RpsA-tmRNA. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el RpsA no sería un blanco de POA y la Δ A438 en RpsA no estaría asociada a la resistencia a PZA.

Palabras clave: tuberculosis, pirazinamida, ácido pirazinoico, RpsA, trans-traducción.

ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) is a first-line pro-drug used against tuberculosis, its importance lies in the shortening of treatment time and its action on non-replicating persistent mycobacteria. Currently, the mechanism of action and resistance to PZA in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) are not completely known.

It was postulated that PZA could inhibit the trans-translation process, because pyrazinoic acid (POA), an active form of PZA, can bind to RpsA and compete with the tmRNA, the natural cofactor of the protein. Deletion in alanine 438 at the carboxyl terminal end of RpsA (Δ A438) was associated with loss of affinity for POA, causing resistance to PZA.

The aim of the study was to understand the way in which Δ Ala438 in RpsA would be associated with resistance to PZA in MTB. For this, native RpsA, RpsA Δ Ala438, RpsA Δ A438 were truncated at different levels towards the carboxyl terminus and tmRNA was synthesized *in vitro*. The interactions between RpsA-tmRNA, RpsA-POA were measured and compared, the competition between tmRNA and POA was evaluated for binding with RpsA.

The experiments revealed the absence of affinity between native RpsA and variants with POA and the inability of the POA to compete and displace the tmRNA once the RpsA-tmRNA complex was formed. In conclusion, our results suggest that RpsA would not be a target of POA and Δ A438 in RpsA would not be associated with resistance to PZA.

Keywords: Tuberculosis, pyrazinamide, pyrazinoic acid, RpsA, trans-translation.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad altamente contagiosa, causada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); responsable de 1.4 millones de muertes a nivel mundial y 10.4 millones de nuevos casos anuales (WHO 2017). Esta enfermedad tiene un impacto social y económico elevado, que incluye discriminación y pobreza.

El ingreso de las micobacterias a nuestro organismo puede generar una enfermedad activa o una infección latente, dependiendo de la respuesta inmune del hospedero (WHO 2016). Los casos de TB activa son diagnosticados por manifestaciones clínicas como tos persistente por más de dos semanas, fiebre, sudoración nocturna, lesiones fibróticas pulmonares, pérdida de peso, entre otras. Es importante señalar que se calcula que la tercera parte de la población mundial está infectada por MTB en un estado metabólico latente; sin presencia de manifestaciones clínicas, pero con el riesgo de contraer TB activa a lo largo de su vida con un estimado de 5 - 10% (Dye *et al.* 1999).

La infección con MTB drogo-susceptible se trata con antibióticos de primera línea, que incluyen rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida, durante un tiempo aproximado de seis meses. La resistencia a drogas como la isoniacida o rifampicina genera fenotipos multidrogo resistentes (MDR-TB) y Perú forma parte de los 30 países con mayores índices de pacientes con MDR-TB, con un incremento del 1% anual de estos casos (WHO 2017).

La pirazinamida (PZA), es una droga utilizada en esquemas de primera y segunda línea, su importancia radica en que es el único antibiótico antituberculoso que disminuye el

tiempo de tratamiento de nueve a seis meses y reduce la tasa de recaídas, actuando sobre micobacterias semidormantes (Zhang and Mitchison 2003). El mecanismo de acción y resistencia a esta droga no se conoce completamente (Steele and Des Prez 1988; Zhang 2005; Zhang *et al.* 2013). Se ha propuesto que PZA actúa en un microambiente ácido generado por la inflamación existente en el granuloma. La PZA ingresa por difusión pasiva al citoplasma de la micobacteria, donde es transformada por la nicotinadimasa micobacterial (PZAasa) a ácido pirazinoico (POA), la forma activa de la droga mediante la hidrólisis de un grupo amino.

Se sospecha que la acción de la PZA/POA podría estar dándose a través de múltiples mecanismos incluyendo la alteración de la producción de energía de la membrana (Zhang *et al.* 2003), inhibición de la trans-traducción (Shi *et al.* 2011. Yang *et al.* 2015), posible inhibición de la biosíntesis de pantotenato y CoA (Dillon *et al.* 2014); entre otros mecanismos aún no confirmados.

La propuesta de RpsA como blanco del POA, surgió al detectar una interacción entre ambas moléculas, producto de la inmovilización de POA en una matriz durante una cromatografía de afinidad, donde se mostró que esta podía retener RpsA luego de pasar un extracto crudo de MTB (Shi *et al.* 2011).

Las funciones atribuidas a esta proteína ribosomal en bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) están relacionadas a la interacción con diferentes tipos de ARN, traducción y trans-traducción.

La trans-traducción, es el proceso por el cual los ribosomas atascados con un mRNA que no cuenta con un codón de término, logran ser recuperados. Se postula que el POA puede interactuar con el RpsA y de esta manera interferir con el mecanismo de trans-traducción, probablemente debido a que la PZA actúa sobre micobacterias en estado de latencia, donde la optimización de energía y reducción de la síntesis de proteínas son un factor vital.

Además, Andini y Nash (2011), reportaron que en el género *Mycobacterium*, una de las moléculas involucradas en la trans-traducción, el tmRNA, se incrementa en presencia de antibióticos cuyo blanco es el ribosoma, sin embargo en dicho estudio no se evaluó el efecto de la PZA sobre RpsA.

Al mismo tiempo, Shi *et al.* (2011), reportaron una cepa clínica DHM 444 resistente a PZA, que alberga una delección de alanina en la posición 438 (Δ Ala438) en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) no estructurado de RpsA, a la que se le atribuyó el cambio de fenotipo resistente a PZA. El mismo grupo planteó que el sitio de la delección podría estar relacionado con el sitio de interacción entre RpsA-POA. Sin embargo, Yang *et al.* (2015) postularon que dicha interacción ocurría en el cuarto dominio S1 de RpsA, y que los aminoácidos fenilalanina 307 (Phe 307), fenilalanina 310 (Phe 310), histidina 322 (His 322) y arginina 357 (Arg357) involucrados en la interacción entre RpsA-POA, también estaban involucrados en la interacción RpsA-tmRNA, por lo que se postuló que POA estaría bloqueando el mecanismo de trans-traducción de manera letal de MTB.

En base a la evidencia descrita, en la presente investigación se buscó entender el posible mecanismo por el cual la delección Δ Ala438 de RpsA de MTB se asocia a una pérdida de afinidad por POA, lo cual explicaría la capacidad de bloquear el mecanismo de trans-traducción y finalmente la aparición de resistencia a PZA.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PZA, es una droga anti-tuberculosa que viene siendo usada por más de 60 años (Yeager *et al.* 1952), sin embargo el mecanismo de acción y resistencia son poco entendidos hasta la actualidad. El mayor porcentaje de resistencia a PZA en MTB está explicado por mutaciones en el promotor (Sheen *et al.* 2013) o el gen (Tan *et al.* 2013; Alexander *et al.* 2012; Simons *et al.* 2012) de *pncA* que regula la expresión y codifica la PZAsa, respectivamente. Las diferentes mutaciones reportadas disminuyen o anulan la conversión de PZA a POA, por lo que la forma activa de la droga no estaría disponible.

Sin embargo, hay un porcentaje de cepas que son resistentes a PZA y no presentan las mutaciones reportadas (aproximadamente 3-10 %), por lo que los estudios fueron dirigidos a la búsqueda de nuevos blancos de esta droga (Bhujy *et al.* 2013), como el gen *panD* (Shi *et al.* 2014) y la proteína ribosomal S1 (RpsA) (Shi *et al.* 2011; Peñuelas-Urquides *et al.* 2013; Yang *et al.* 2015).

Shi *et al.* (2011), reportaron interacción entre RpsA-POA con una constante de disociación (Kd) de 2.81 μM , además que la delección ΔAla438 en el extremo C-terminal de RpsA generaba pérdida de afinidad por el POA y resultó en resistencia a PZA.

Con esta investigación, se pretende entender el mecanismo por el que la delección ΔAla438 de RpsA genera dicha pérdida de afinidad, debido a que esta delección se encuentra distante del sitio de interacción entre RpsA-POA y su ubicación no pudo ser

apreciada en el cristal reportado previamente por Yang *et al.* (2015); probablemente debido a que se encuentra en un sitio intrínsecamente desordenado y se desconoce si esta delección genera nuevas interacciones o cambios estructurales, que resultan en la pérdida de afinidad con el POA.

Con el nuevo planteamiento de RpsA como blanco de POA y la necesidad de hallar una técnica que permita comprender cómo la Δ Ala438 genera la pérdida de afinidad con el POA, se hizo un ensayo preliminar en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular-LID-UPCH basado en la reacción de Wayne modificado (Zimic *et al.* 2012). El fundamento del método colorimétrico de Wayne, se basa en el uso de sulfato de amonio ferroso y su capacidad de coordinar con dos moléculas de POA a través del Fe^{+2} y dar origen a un compuesto coloreado (Figura 01) cuantificable por medición de absorbancia a 450 nm. Se adaptó de modo tal que se pudiese evaluar POA libre en el sobrenadante en presencia y ausencia de RpsA nativa. Los ensayos mostraron una pequeña disminución de la cantidad de POA libre en presencia de RpsA nativo ($p < 0.05$) (datos no publicados, Reynoso y col. 2013), sugiriendo que POA interactuaba con RpsA y la técnica era capaz de detectar dicha interacción.

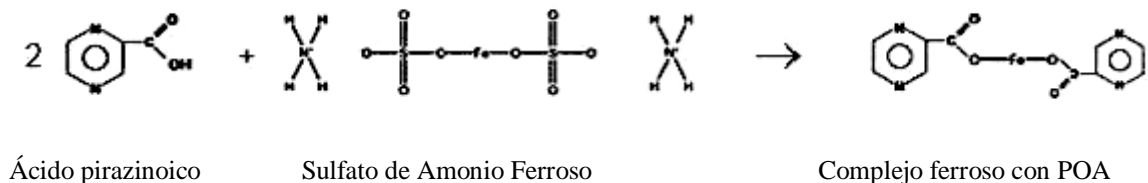


Figura 01. Reacción química de la reacción de Wayne.

De manera limitante, la realización de este ensayo necesita la producción de cantidades mayores a 200 μM de proteína recombinante lo cual dificultaba realizar estudios posteriores en suficiente número de repeticiones.

Ante esta limitante se procedió a buscar otras técnicas que pudiesen medir la afinidad entre RpsA y POA, en donde se emplearan concentraciones menores de proteína y que nos permitieran evaluar mecanismo de interacción entre POA y el tmRNA por el RpsA.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1 Tuberculosis y la situación actual a nivel mundial

La TB es una enfermedad causada por la infección con MTB; responsable de más muertes que el VIH y la malaria (Figura 02, WHO 2017). En el 2016, se reportaron aproximadamente 10.4 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1.4 millones de personas fallecidas debido a la enfermedad, sin embargo a pesar de las cifras tan altas el porcentaje de mortalidad por TB ha disminuido en un 22% entre los años 2000-2015.

La infección con MTB puede variar por el fenotipo de la cepa entre drogo-susceptible, multidrogo resistentes (MDR) y extremadamente resistente a drogas (XDR). Las cepas drogo susceptible son sensibles a rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida, las MDR son cepas resistentes a rifampicina e isoniazida y las XDR son cepas MDR-TB con resistencia adicional a fluoroquinolona y un agente inyectable como kanamicina, amikacina, viomicina o capreomicina, esta clasificación está orientada al espectro de drogas que se utilizan para el tratamiento de la infección. Para el 2015, un estimado de 480 000 personas desarrollaron MDR-TB y en 9.5% de personas con MDR-TB fueron XDR-TB. En Perú, se ha reportado una tasa de mortalidad de 4.9 % y 11% de TB-MDR/RR (Tasa por 100 000 habitantes por año) (Tabla 01, WHO 2017).

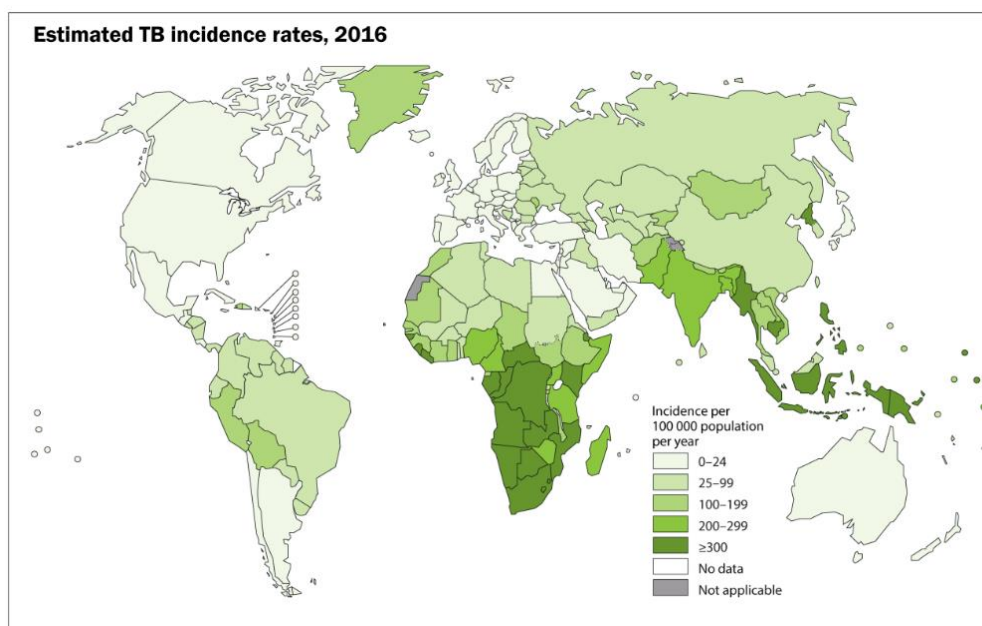


Figura 02. Mapa global de la incidencia de la tuberculosis en el mundo. (WHO 2017)

Tabla 01. Perfil de tuberculosis en el Perú (WHO 2017)

Población 2016		32 millon
Estimaciones de la carga de TB*, 2016	Número (miles)	Tasa (por 100 000 habitantes)
Mortalidad (excluye TB/VIH)	1.6 (1.4-1.7)	4.9 (4.3-5.5)
Mortalidad (TB/VIH únicamente)	0.46 (0.34-0.61)	1.5 (1.1-1.9)
Incidencia (incluye TB/VIH)	37 (28-47)	117 (90-148)
Incidencia (TB/VIH únicamente)	2.2 (1.6-2.8)	6.8 (5.2-8.7)
Incidencia (TB-MDR/RR)**	3.5 (2.9-4.2)	11 (9.1-13)

2.2.1.1. Agente causal de la tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

La clasificación taxonómica (<http://www.uniprot.org/taxonomy/77643>)

REINO	› Bacteria
SUPERFILO	› Terrabacteria
FILO	› Actinobacteria
ORDEN	› Actinobacteria
SUBORDEN	› Corynebacteriales
FAMILIA	› Mycobacteriaceae
GENERO	› Mycobacterium
ESPECIE	› <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Las micobacterias están clasificadas en el grupo de las Gram positivas, el tamaño de los bacilos varía entre 0.3-0.5 μm de diámetro y su longitud es variable, son aeróbicas y la complejidad de la envoltura celular le otorga a los bacilos una baja permeabilidad, por lo que el método de tinción para este género es diferencial (coloración de Zhiel-Neelsen) (revisado en Cook *et al.* 2009).

2.2.1.2. Patogenia y mecanismos de evasión de *Mycobacterium tuberculosis* al sistema inmune

La TB se transmite a través del aire cuando un enfermo de tuberculosis tose, estornuda o escupe, expulsando bacilos al aire que pueden ser inhalados por las personas que se

encuentren cercanas y de este modo contraer la infección. Su permanencia está directamente relacionada a la persistencia de estas micobacterias en lesiones granulomatosas, generando microambientes donde algunas micobacterias evaden el sistema inmune y pueden sobrevivir con condiciones de hipoxia, pH bajo, presencia de óxido nítrico, monóxido de carbono que se presume que está relacionado con la expresión de genes de dormancia y por tanto un metabolismo basal (Barry *et al.* 2009). Se han registrado dos tipos de granulomas: los clásicos, constituidos por macrófagos que albergan micobacterias en una ambiente hipóxico rodeado de células muertas y los granulomas que se han visto en TB latente, siendo lesiones fibróticas que contienen pocos macrófagos, en este último caso no se sabe si la micobacteria está dentro de los macrófagos o en el área fibrótica de la lesión. El bacilo dormante puede habitar el granuloma durante el tiempo de vida del hospedero y son capaces de desencadenar una reinfección bajo ciertas condiciones de inmunosupresión (Ahmad 2011).

2.2.2 Drogas antituberculosas

El esquema terapéutico recomendado por la OMS (2017), consiste en el uso de cuatro drogas de primera línea: isoniazida, rifampicina, PZA y etambutol (Tabla 02).

Tabla 02. Dosis recomendadas de drogas anti-tuberculosas de primera línea para adultos (WHO 2010)

Droga	Dosis recomendada			
	Diaria		Tres veces por semana	
	Dosis y rango (mg/kg peso corporal)	Máximo (mg)	Dosis y rango (mg/kg peso corporal)	Máximo diario (mg)
Isoniazida	5 (4-6)	300	10 (8-12)	900
Rifampicina	10 (8-12)	600	10 (8-12)	600
Pirazinamida	25 (20-30)	-	35 (30-40)	-
Étambutol	15 (15-20)	-	30 (25-35)	-

El mecanismo de acción de varias de las drogas que se utilizan en el tratamiento contra TB se describen en la figura 03, las drogas que actúan sobre el bacilo en estado replicativo son la isoniazida, rifampicina y fluoroquinolonas; mientras que las drogas que actúan sobre bacilos dormantes y pueden evitar el relapso son la PZA, nitroimidazoles y TMC207.

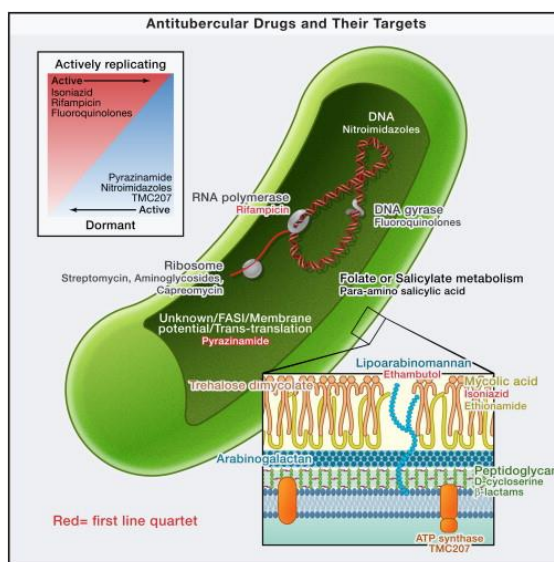


Figura 03 - Drogas de primera línea y sus blancos en *Mycobacterium tuberculosis* (Goldberg *et al.* 2012).

2.2.3 Pirazinamida (PZA)

PZA es una prodroga antituberculosa, categorizada como bioprecursor (Laborde *et al.* 2017), ya que necesita de la acción enzimática de la nicotinamidasas/pirazinamidasas (PZAsa) micobacterial para la obtención del compuesto activo, el POA. PZA es estructuralmente análoga a la nicotinamida (Figura 04). PZA es activa *in vitro* contra MTB a pH ácido 5.5, *in vivo* es activa en sitios con pH ácido donde ocurre la inflamación con una concentración mínima inhibitoria (MIC) que varía entre 130 a 400 μM (Almeida and Palomino 2011). La acidez proviene del ácido láctico producido por las células inflamatorias como mecanismo de respuestas inmune del hospedero en las lesiones granulomatosas (Ehlers and Schaible 2013). De esta manera, se genera condiciones propicias para que PZA elimine a MTB en estado de dormancia. Estas condiciones fueron demostradas con el uso de inhibidores de energía, condiciones anaeróbicas e incubación a temperaturas bajas (Zhang *et al.* 2003), donde PZA es más efectiva que otras drogas.

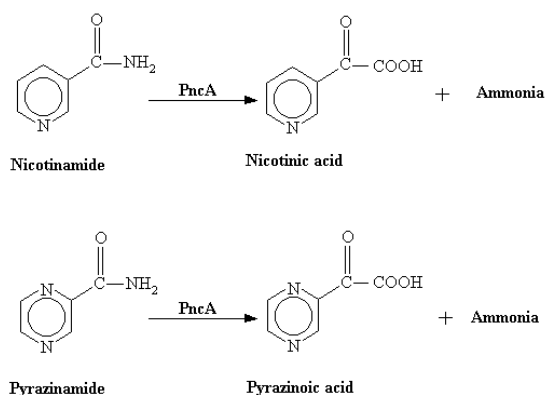


Figura 04. Conversión de nicotinamida y PZA a ácido nicotínico y POA, respectivamente por la enzima PZase/nicotinamidasas codificada por el gen *pncA* (Zhang *et al.* 2014).

2.2.3.1 Mecanismo de acción de la pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis*

La PZasa es codificada por el gen *pncA*, esta enzima está involucrada en la vía de biosíntesis y reciclaje del NAD y a la vez es capaz de convertir la PZA a POA (Fyfe *et al.* 2009).

Petrella *et al.* (2011) determinaron la estructura cristalina de esta hidrolasa con el ión Fe^{2+} coordinado con un ácido aspártico, tres histidinas y una cavidad catalítica que contiene a Cisteína 138 - Ácido aspártico 8 – Lisina 96. El mecanismo catalítico para la hidrólisis de la nicotinamida consiste en un ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la nicotinamida coordinado con el metal divalente (Mn^{+2}) mediante el grupo tiolato de la Cisteína 138 generando un intermediario tetraédrico que colapsa con la pérdida de amonio y subsecuente hidrólisis del tioéster por el agua (Seiner *et al.* 2010; Laborde *et al.* 2017, Figura 05) resultando en la conversión de nicotinamida en ácido nicotínico, similar escenario podría extrapolarse entre PZA y POA (pKa 2.9) (Budavari 1989).

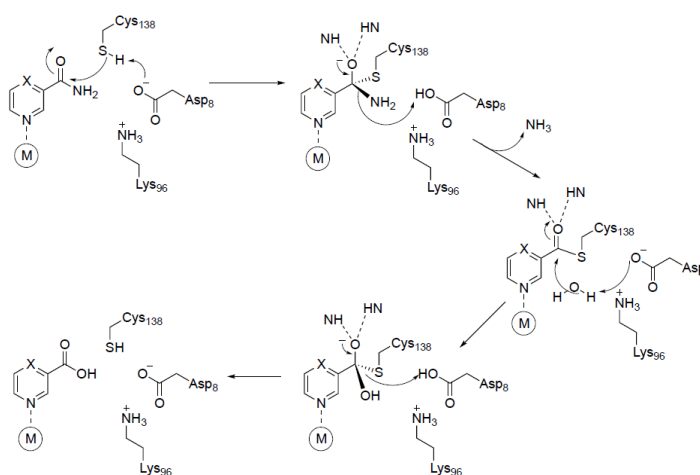


Figura 05. Mecanismo de conversión de la nicotinamida por acción de la nicotinamidasa micobacteriana. (Imagen tomada de la adaptación de Laborde *et al.* 2017).

La PZA entra a la micobacteria por difusión pasiva y es convertida a POA por la PZAasa. El POA es liberado al medio externo a través de un débil o deficiente mecanismo de eflujo comparado al de otras micobacterias (Zimic *et al.* 2012). A pH ácido, el POA protonado (HPOA) entra a la célula de un modo dependiente del pH por difusión pasiva y se acumula dentro de la célula, matando a la bacteria probablemente por múltiples mecanismos incluyendo acidificación del medio intracelular, alteración de la producción de energía de la membrana (Zhang *et al.* 2003), inhibición de la trans-traducción (Shi *et al.* 2011, Yang *et al.* 2015), inhibición de la biosíntesis de pantotenato y CoA (Dillon *et al.* 2014); entre otros mecanismos aún no identificados (Figura 06).

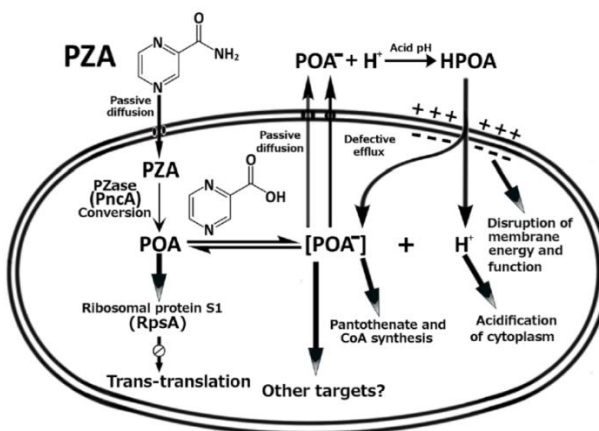


Figura 06. Modo de acción de la pirazinamida. (Zhang *et al.* 2014).

2.2.3.2 Mecanismos de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a pirazinamida

El mayor porcentaje de resistencia (90%-97%) a PZA está relacionado a mutaciones en el promotor o en el gen de *pncA* (Zhang and Yew 2009; Alexander *et al.* 2012; Simons *et al.* 2012; Tan *et al.* 2013; Sheen *et al.* 2013) (Figura 07). Sin embargo, el

mecanismo planteado para aquellas cepas resistentes no relacionadas con mutaciones en *pncA* es desconocido y se ha planteado diferentes blancos (Shi *et al.* 2014; Shi *et al.* 2011; Peñuelas-Urquides *et al.* 2013; Yang *et al.* 2015).

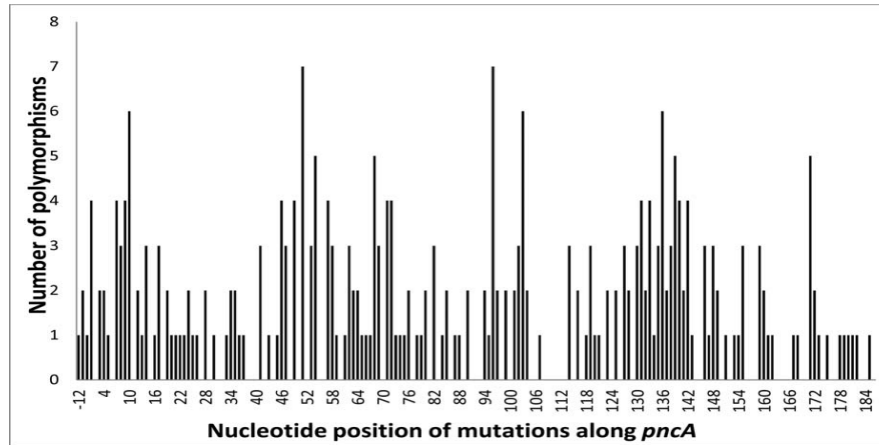


Figura 07. Mutaciones en el gen *pncA* asociadas a resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a pirazinamida. (<http://www.tbdreamdb.com>)

2.2.4 Proteína ribosomal S1(RpsA) de *Mycobacterium tuberculosis*

RpsA participa en la iniciación de la traducción, esencial para la viabilidad celular (Kitakawa and Isono 1982), en el reconocimiento de mRNA que presentan secuencias Shine-Dalgarno degeneradas (Boni *et al.* 1991) y en el proceso de trans-traducción. En organismos como *E. coli*, esta proteína presenta 6 dominios tipo S1 y se conoce la función de cada uno de los dominios (revisado en Deryushev *et al.* 2017, Figura 08); el RpsA de MTB está compuesta de 4 dominios tipo S1 y un extremo C-terminal altamente flexible (Wower *et al.* 2013) (Figura 09).

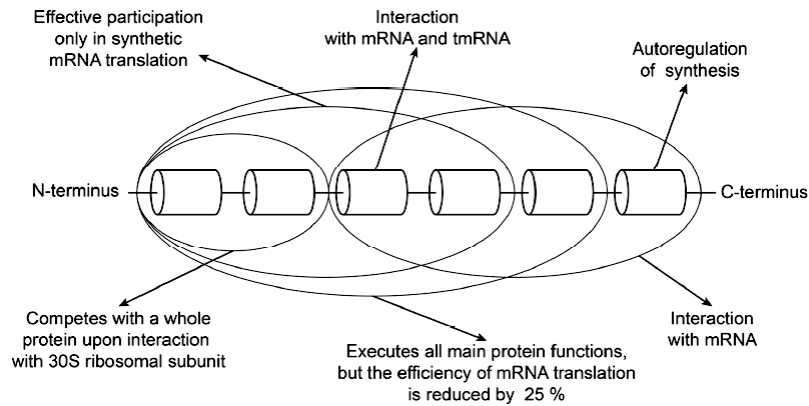


Figura 08. Esquema de la proteína ribosomal S1 de *E. coli*, relación dominios – función. (Deryushev *et al.* 2017).



Figura 09. Esquema de la proteína ribosomal S1 de *Mycobacterium tuberculosis* (Yang *et al.* 2015).

Yang *et al.* (2015) expresaron, purificaron y cristalizaron el cuarto dominio S1 y el C-terminal de RpsA nativo de MTB (RpsA-S1-nativo) que comprendía los aminoácidos 285-481, sin embargo en el cristal solo fueron visibles los aminoácidos 285 a 433, mientras que 48 aminoácidos fueron invisibles probablemente debido a que el extremo C-terminal es altamente flexible. El cuarto dominio S1 es de tipo OB (unión a oligonucleótidos/oligosacáridos) y está constituido por cinco hojas antiparalelas formando un β barril ($\beta_1 - \beta_5$) y una hélice 3_{10} (Figura 10), interactúa con el tmRNA, que por homología de función sería comparable al tercer dominio S1 de *E. coli* (Yang *et al.* 2015).

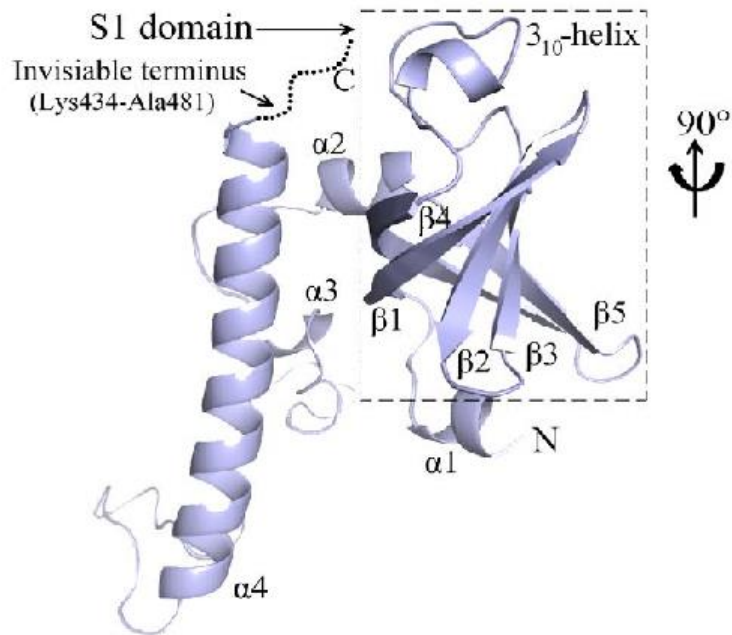


Figura 10. Cristal del RpsA-S1-nativo de *Mycobacterium tuberculosis* (Yang *et al.* 2015).

2.2.5 Trans-traducción, como mecanismo de salvataje de ribosomas

El mecanismo de trans-traducción, es un sistema eficiente de liberación de ribosomas atascados con mRNA sin codón de terminación, mRNA poco usuales o en ausencia de un tRNA al final de la traducción (Figura 11). Entre las moléculas que toman parte en el mecanismo de la trans-traducción tenemos el tmRNA, codificado por el gen *ssrA*, que cumple dos funciones debido a su estructura, tipo mRNA y tRNA. En este mecanismo también participan el RpsA (McGinness and Sauer, 2004, Saguy *et al.* 2007), la proteína SmpB, el factor de elongación Tu (EF-Tu) y GTP (Kurita *et al.* 2011).

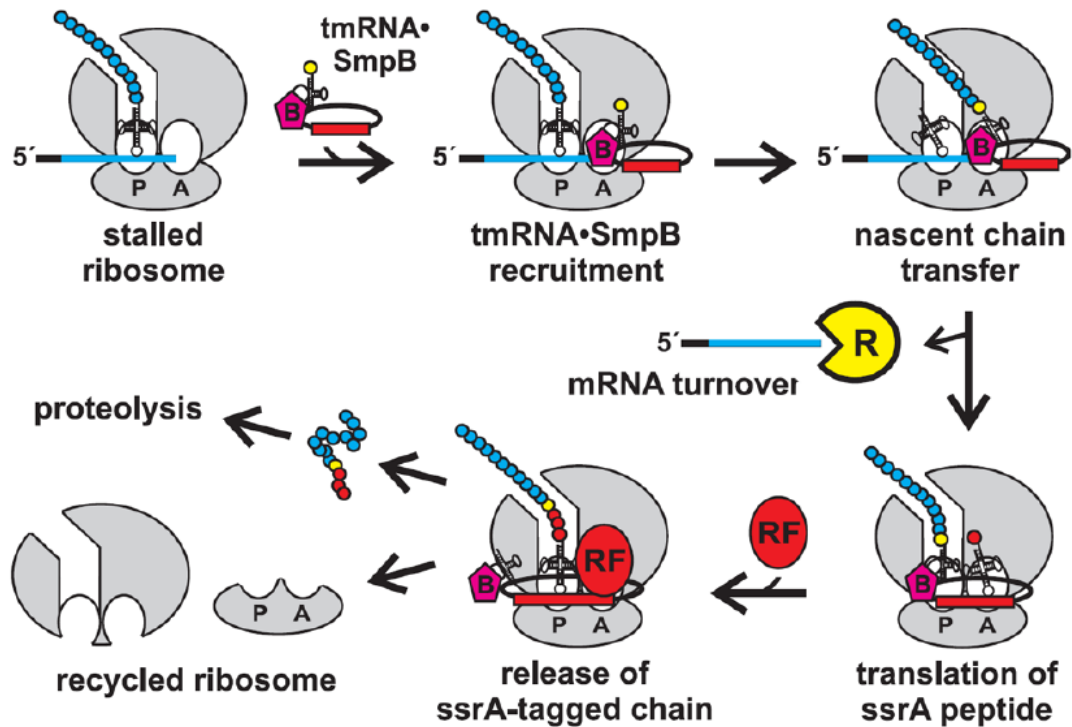


Figura 11. Rescate de ribosomas mediante trans-traducción (Janssen and Hayes 2012).

En micobacterias el mecanismo del trans-traducción es esencial en el estado de latencia debido a que garantiza que el proceso de traducción sea eficiente (Andini and Nash 2011). Personne and Parish (2013), demostraron que cepas con delección en *smpB* o mutaciones en el gen *ssrA* no afectan la sensibilidad a PZA, sugiriendo que PZA no afecta el proceso de trans-traducción a través de estos componentes.

En *E. coli*, Saguy *et al.* (2007) demostraron que RpsA no era necesario para la interacción con la porción tipo tRNA del tmRNA, pero indispensable para la interacción con la porción mRNA de este RNA. Igualmente demostraron que en condiciones *in vivo* el incremento o disminución de la cantidad de RpsA reduce la cantidad de proteínas trans-traducidas.

2.2.6 Interacción entre RpsA, tmRNA y el ácido pirazinoico

El modelo de interacción entre estas tres moléculas en MTB fue planteado por Shi *et al.* (2011), cuando encontraron afinidad entre POA y RpsA. Así mismo, para el planteamiento de este modelo se realizaron ensayos de microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC) donde reportaron una constante de afinidad $7.53 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ entre ambas moléculas, además hallaron que la sobre expresión de RpsA nativo en MTB incrementó en cinco veces la concentración mínima inhibitoria (MIC: 500 $\mu\text{g/ml}$) a PZA en pH 5.5. Por otro lado, el mismo grupo halló una cepa clínica resistente a PZA (MIC: 200-300 $\mu\text{g/ml}$) con una delección en alanina en la posición 438 en el extremo C-terminal del RpsA (RpsA $\Delta\text{AlaA438}$) y la asociaron con la resistencia a PZA.

En la figura 12, se muestra el alineamiento múltiple del extremo C-terminal de RpsA nativa, RpsA $\Delta\text{AlaA438}$ de MTB y RpsA de *M. smegmatis*. RpsA de MTB y *M. smegmatis* presentan un 94 % de identidad (BLAST), RpsA de *M. smegmatis* presenta dos delecciones en los aminoácidos 443 - 444 y varias sustituciones predominantemente en el extremo C-terminal y al igual que RpsA $\Delta\text{AlaA438}$ de MTB tampoco se une a POA (Yang *et al.* 2015).

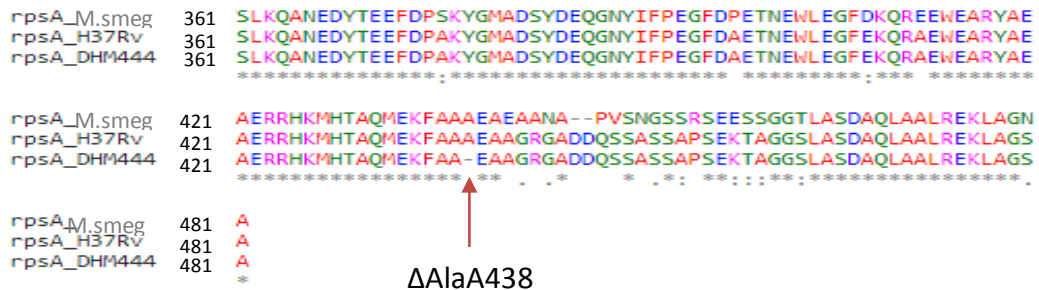


Figura 12. Alineamiento múltiple del RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* DHM444 y *M. smegmatis* (www.ebi.ac.uk).

En base a este hallazgo Yang *et al.* (2015), expresaron, purificaron y cristalizaron el cuarto dominio S1 y el C-terminal de RpsA Δ Ala438 (RpsA-S1- Δ Ala438) entre los aminoácidos 285- 480. En el cristal se observó que Arg 357, Lys 303, Phe307 de RpsA-S1- Δ Ala438 adoptan diferentes conformaciones con respecto a RpsA-S1-nativo, como se muestra en la figura 13.

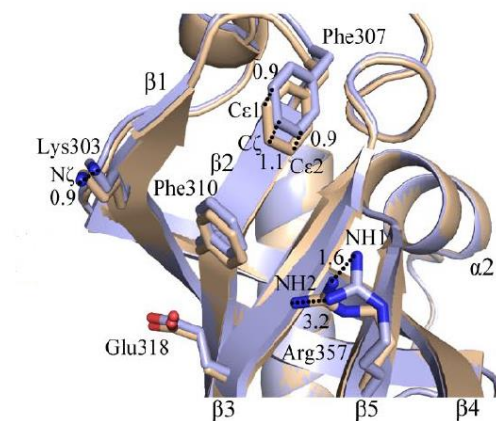


Figura 13 . Comparación de cristales de RpsA-S1-nativo (azul) y RpsA-S1- Δ Ala438 (marrón claro), se muestra el cambio de conformaciones en Arg 357, Lys 303, Phe307 (Yang *et al.* 2015).

Del mismo modo Yang *et al.* lograron obtener un cristal de RpsA-S1-nativo en interacción con dos moléculas de POA (Figura 14A), en este cristal se pueden visualizar 4 residuos adicionales con respecto al cristal sin POA (aa 285-437, Figura 10) y al comparar ambos cristales se observa un cambio conformacional en la hoja β 2 β 3 y β 5 (Figura 14B).

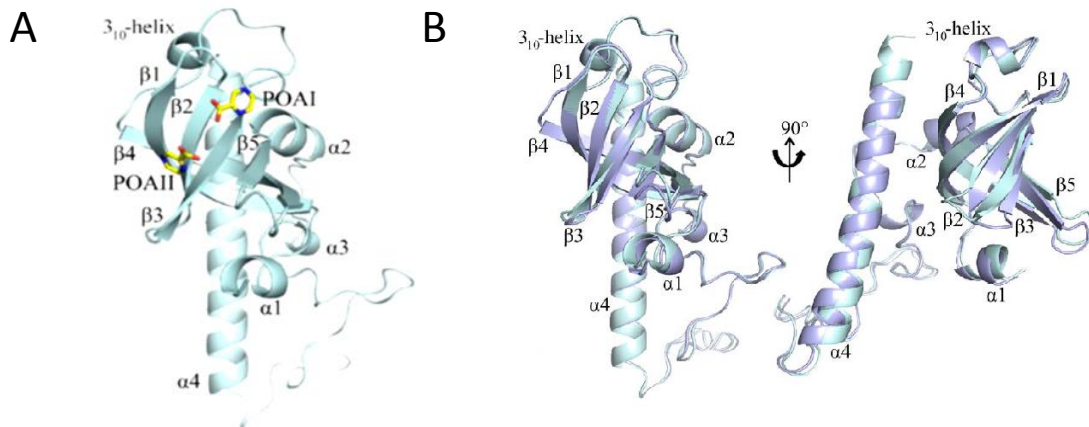


Figura 14. Cristal del cuarto dominio de RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* en complejo con POA. A) Cristal del complejo del RpsA-S1-nativo-POA, nótese la posición de las dos moléculas de POA. B. Comparación de cristales RpsA-S1-nativo (celeste) y cristal del complejo RpsA-S1-nativo-POA (cyan), nótese el cambio estructural debido a la presencia de POA, en las hojas β_2 β_3 y β_5 (Yang *et al.* 2015).

Adicionalmente, Shi *et al.* (2011) y Yang *et al.* (2015) propusieron que POA compete con el tmRNA (determinado mediante cambio de movilidad electroforética), afectando el proceso de trans-traducción (Figura 15), los aminoácidos Lys303, Phe307, Phe 310 y Arg 357 del cuarto dominio fueron planteados por el grupo de Yang *et al.* como el sitio de interacción con POA y tmRNA.

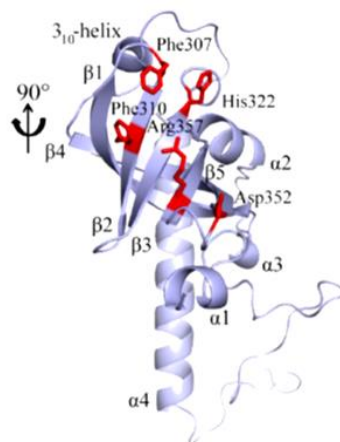


Figura 15. Cristal RpsA-S1-nativo *Mycobacterium tuberculosis* mostrando los sitios de interacción comunes para tmRNA/POA. Los aminoácidos Lys303, Phe307, Phe310 y Arg357 que participan en la interaccionan RpsA-POA y RpsA-tmRNA. (Yang *et al.* 2015).

2.2.7 Métodos para la evaluación de la interacción proteína-ligando, aplicados a la medición de la interacción RpsA/POA y RpsA/tmRNA

Los métodos que se usan para evaluar la interacción entre proteínas y ligandos son diversos, pueden ser realizados *in silico* e *in vitro*. Los estudios *in silico* se basan en modelos teóricos, análisis computacionales y simulaciones que permiten predecir y elucidar dinámicas en sistemas biológicos. Los estudios *in vitro* dependen de la concentración de las moléculas, el volumen, pureza, entre otros factores. Algunas de las técnicas utilizadas para evaluar la interacción entre RpsA y POA, RpsA y tmRNA y competencia entre tmRNA/POA por el sitio de unión en RpsA se detallan a continuación:

2.2.7.1. Acoplamiento “docking” molecular

Es una herramienta importante en bioinformática estructural, que permite predecir el modo de unión predominante entre un ligando y un receptor. Se fundamenta en la búsqueda de la mejor orientación espacial y uso de puntajes para encontrar el mejor acoplamiento o “docking” posible. La dinámica molecular es uno de los métodos de simulación más ampliamente utilizados para el modelamiento molecular, utiliza las ecuaciones de movimiento de Newton, cada átomo se mueve por separado en el campo, y se sigue la evolución dinámica del sistema en un periodo de tiempo fijo. En este método existe una gran flexibilidad tanto para el ligando como para el receptor, por lo que estudia cómo los átomos o moléculas interactúan calculados mediante el uso de

potencial interatómico o un campo de fuerza o “force fields” (Morris and Lim-Wilby 2008; Xuan-Yu *et al.* 2011).

2.2.7.2. Cambio de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de EMSA es usado bajo un simple esquema lógico que toma en cuenta el tamaño, el peso molecular y la carga de las moléculas en condiciones no denaturantes. Esta técnica se basa en la identificación del patrón de movilidad electroforética del ácido nucleico cuando está libre y cuando forma complejos con la proteína blanco, ya que en este último caso la migración usualmente será más lenta (Hellman and Fried 2007; Gaudreault *et al.* 2009). Esta técnica fue utilizada para hacer evaluaciones de la interacción entre RpsA, tmRNA y POA (Shi *et al.* 2011; Yang *et al.* 2015).

2.2.7.3. Microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC)

ITC es una técnica comúnmente usada para medir directamente la energía asociada con una reacción química, generada por la mezcla de dos componentes (Leavitt and Freire 2001). Mediante el uso de esta técnica se pueden obtener constantes de afinidad, estequiometría, entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), cambios de capacidad de calor asociado a interacciones biomoleculares sin marcaje de la muestra.

El microcalorímetro mide la cantidad de energía ($\mu\text{cal/sec}$) requerido para mantener una diferencia constante de temperatura cercana a cero entre la celda que contiene la muestra y la celda de referencia, esta última determina el nivel de línea base (Figura 16A).

Al efectuar una reacción química, por la inyección del ligando se libera (reacción exotérmica) o absorbe (reacción endotérmica) cierta cantidad de calor (q_i) que es proporcional a la cantidad de ligando que se unió a la proteína en cada inyección ($v \times \Delta L_i$) y la característica entalpía de unión (ΔH), generando la siguiente reacción:

$$q_i = v \times \Delta H \times \Delta L_i \quad \text{ec.1}$$

Donde v es el volumen de la celda de reacción y ΔL_i es el incremento de la concentración de ligando unido después de la i^{n} inyección (Leavitt and Freire 2001). Después de cada inyección, el sistema vuelve al equilibrio y el balance de temperatura es restaurado. Y de este modo la señal es almacenada mostrando un patrón típico de deflexión en forma de pico. La integración bajo el área de pico, asumiendo la línea de base como referencia, que provee la cantidad de calor asociado con la inyección (Figura 16B). Como los reactantes en la celda empiezan a saturarse, el calor de la señal disminuye hasta sólo observar el calor basal, por ejemplo el producto de la dilución de ligando (Velazquez-Campoy *et al.* 2004).

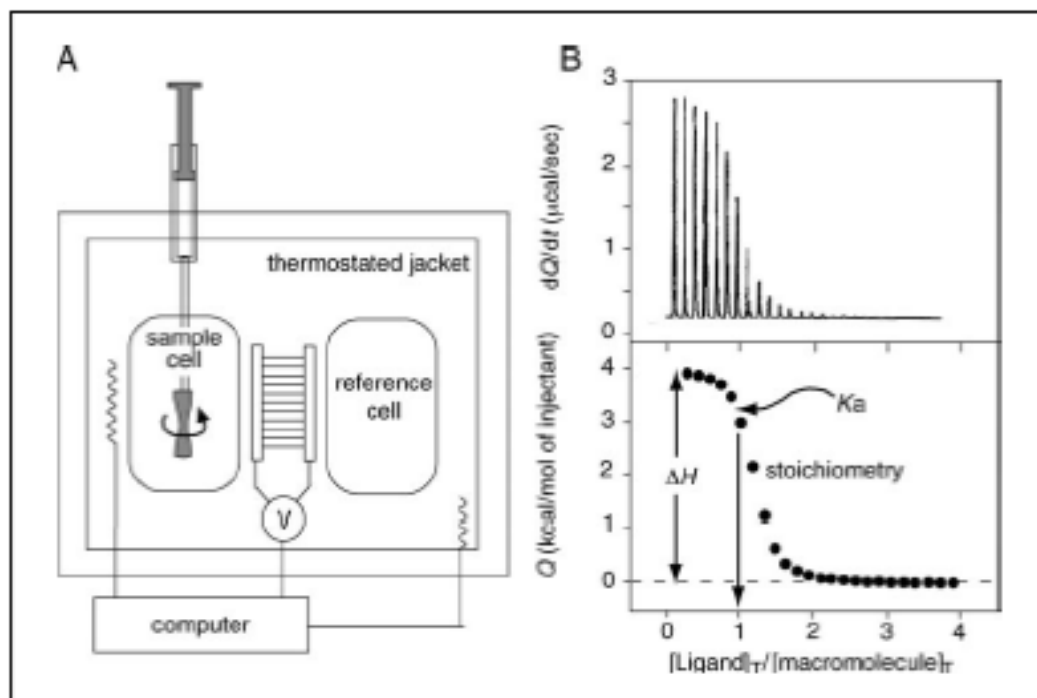


Figura 16. A) Esquema de microcalorímetro de titulación isotérmica. B) Esquema de un experimento de ITC. En la parte superior se muestra la secuencia de picos correspondientes a cada inyección del ligando. En la parte inferior se muestra una curva de calor integrada (Velazquez-Campoy *et al.* 2004).

2.2.7.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)

Los núcleos atómicos poseen un momento angular de espín que se caracteriza por un número cuántico de espín. En ausencia de un campo magnético, los espines tienen orientación aleatoria (sus estados de energía están degenerados). Por otro lado, en presencia de un campo magnético (B_0) los espines adquieren un movimiento de precesión alrededor del campo magnético y una orientación preferencial dependiendo de sus estados de energía. Esta frecuencia de precesión es conocida como la frecuencia de Larmor y depende de la constante giromagnética del núcleo y del campo magnético aplicado. Para un espín $1/2$, existen dos estados de energía posible, $m = +1/2$ orientado

paralelamente al campo magnético y $m = -1/2$ orientados antiparalelamente al campo magnético.

En presencia del campo magnético los diferentes espines de la muestra van a distribuirse entre estos dos estados de energía según la ley de distribución de Boltzmann. Como el estado de más baja energía es el más poblado vamos a obtener una magnetización global de la muestra (M) paralela al campo B_0 (M es la magnetización macroscópica que resulta de la suma de todos los vectores que giran alrededor de B_0 a la frecuencia de Larmor). El principio básico de un experimento de NMR es de inclinar la magnetización M hacia el plano XY a través de un pulso de radiofrecuencia (RF) y seguir su evolución en el plano XY (Amero 2014).

El pulso de radiofrecuencia crea un campo magnético B_1 perpendicular al campo B_0 . Durante este pulso de radio frecuencia, la magnetización M girará alrededor del campo magnético B_1 . Inmediatamente después de detener el pulso de RF, la magnetización comienza a regresar a su posición de equilibrio mediante un mecanismo de precesión alrededor del campo magnético B_0 a la frecuencia de resonancia del núcleo. Este movimiento de precesión va a generar una corriente eléctrica en la antena de detección. La señal registrada es una intensidad en función del tiempo (FID: decaimiento de inducción libre), esta señal es procesada por transformada de Fourier para obtener un espectro (intensidad-frecuencia).

Como una molécula está compuesta de una multitud de núcleos, la FID registrada se compone de una multitud de señales detectadas simultáneamente. Por ende, después de

procesar la señal por transformada de Fourier vamos a obtener un espectro donde cada pico corresponde a la frecuencia de resonancia de un núcleo presente en la molécula.

La detección por NMR se logra con la ayuda de una bobina ubicada en el eje Y, aprovechando que la magnetización está girando, el campo magnético a través de la bobina es cambiante, y esto induce mediante la Ley de Faraday, una corriente eléctrica que se puede medir, y de ese modo obtener la señal de NMR (Figura 17).

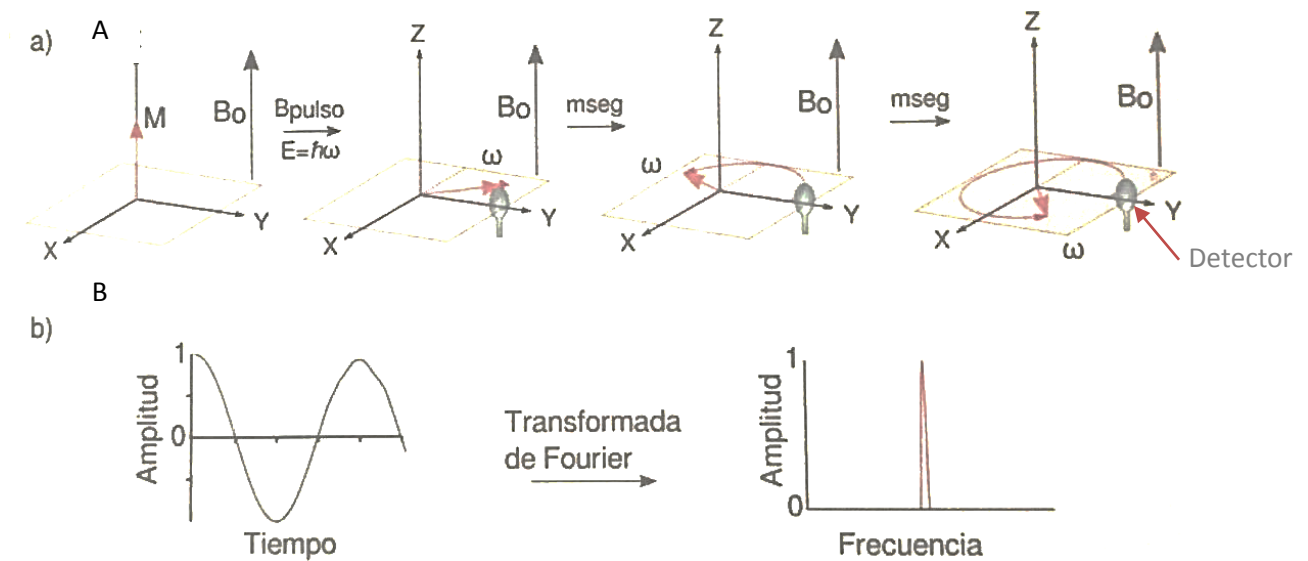


Figura 17. Esquema de la detección de la señal por NMR. A) La magnetización total al girar en el plano genera una corriente eléctrica en el detector. B) Señal detectada como función del tiempo y aplicación de la transformada de Fourier. (Amero 2014).

Tabla 03. Propiedades magnéticas de núcleos comúnmente estudiados por NMR.

Nuclei	$\gamma 10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$	ν/MHz	Natural Abundance
^1H	26.75	400	99.985
^2H	4.11	61.4	0.015
^{13}C	6.73	100.6	1.108
^{15}N	-2.71	40.5	0.37
^{19}F	25.18	376.5	100.0
^{31}P	10.84	162.1	100.0

Tomado de chem.libretexts.org

El desplazamiento químico (NMR-CSP). Cada núcleo que conforma una molécula tiene una frecuencia de resonancia distinta que es dependiente de su ambiente electrónico molecular (entorno químico). Esta diferencia de frecuencia es principalmente provocada por los pequeños campos magnéticos locales inducidos por el movimiento de los electrones en los orbitales moleculares.

La frecuencia de resonancia depende igualmente del campo magnético, lo que en distintos equipos se reflejará en distintas frecuencias de resonancia, por ello la frecuencia de resonancia es expresada en unidades de desplazamiento químico que no dependen del campo magnético, mediante el uso de una señal de referencia:

$$\Delta\delta = (\omega - \omega_{\text{ref}}) / \omega_{\text{ref}} \quad \text{ec.2}$$

Este valor del desplazamiento químico es expresado en partes por millón (ppm) y describe la posición (frecuencia) de las señales en el espectro de NMR (Amero 2014).

Difusión (NMR-D). Las moléculas en solución tienen un movimiento de traslación aleatoria, conocido como movimiento Browniano. Este movimiento molecular puede

ser definido por un coeficiente macroscópico conocido como el coeficiente de Difusión (Ley de Fick). El coeficiente de difusión, depende de parámetros físicos como tamaño y forma molecular, viscosidad y temperatura. Si nosotros asumimos una forma esférica el coeficiente de difusión de la molécula (D) es descrito por la siguiente ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_x} \quad \text{ec.3}$$

Donde K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del líquido y r_x el radio hidrodinámico de la molécula.

Mediante espectroscopia de NMR es posible generar gradientes de campo magnético de manera controlada. Para medir la difusión de una molécula se genera un gradiente de campo magnético lineal vertical, durante este pulso de gradiente las moléculas van a estar expuestas a campos magnéticos diferentes dependiendo de su posición espacial, como la frecuencia de resonancia depende del campo magnético, el gradiente va a codificar la posición espacial de las moléculas, si aplicamos un gradiente lineal opuesto este va a refocalizar la codificación espacial. Si las moléculas se desplazan durante el tiempo de difusión Δ , su nueva posición va crear un desfase que puede ser detectado por el segundo gradiente. La señal obtenida es la integral sobre todo el volumen de la muestra, por ende, la intensidad de la señal es atenuada por el desfase producido por la difusión molecular, a mayor coeficiente de difusión mayor atenuación de la señal. El cambio de intensidad es descrito por la siguiente ecuación:

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})} \quad \text{ec.4}$$

Donde I es la intensidad observada, I_0 es la señal de la intensidad referencia, D es el coeficiente de difusión, γ es el ratio giromagnético del núcleo observado, g es la fuerza de la gradiente, δ la longitud de la gradiente y Δ el tiempo de difusión (Kerssebaum 2006).

Las moléculas voluminosas como las proteínas se desplazan lentamente, por ende, su señal desfasa lentamente, mientras que las pequeñas moléculas como POA se desplazan rápidamente y su señal desfasa mucho más rápido (Figura 18).

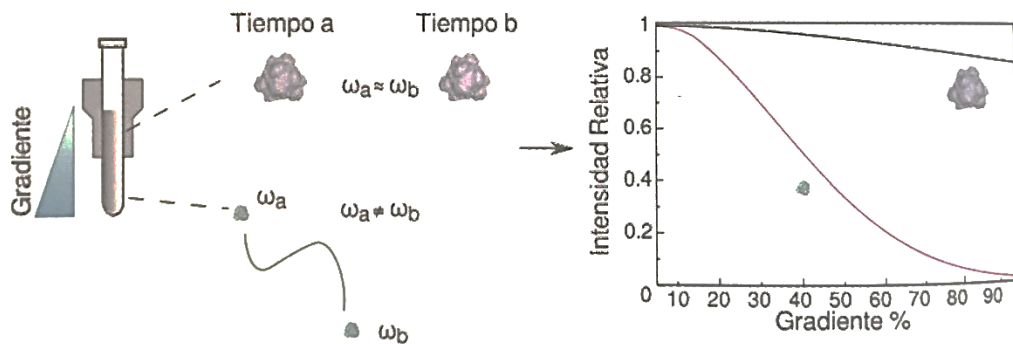


Figura 18. Esquema de un experimento de difusión, considerando la aplicación de un gradiente magnético en la muestra (Amero 2014).

Transferencia de saturación (NMR-STD). Básicamente, macromoléculas como las proteínas consisten de un gran sistema de protones que se encuentran estrechamente unidos por interacciones tipo dipolo-dipolo. La velocidad de relajación longitudinal de los protones en las proteínas (R_1) es dominada por la velocidad de relajación cruzada σ_{intra} . La saturación selectiva de una proteína en resonancia puede resultar en una rápida propagación de la magnetización sobre toda la proteína, así mismo, la transferencia intermolecular de la magnetización de una proteína a un ligando (σ_{intra}) permite la

progresiva saturación del ligando (Figura 19). Esta técnica permite la identificación de constantes de disociación que varían entre 10^{-3} y 10^{-8} (Mayer and Meyer 1999).

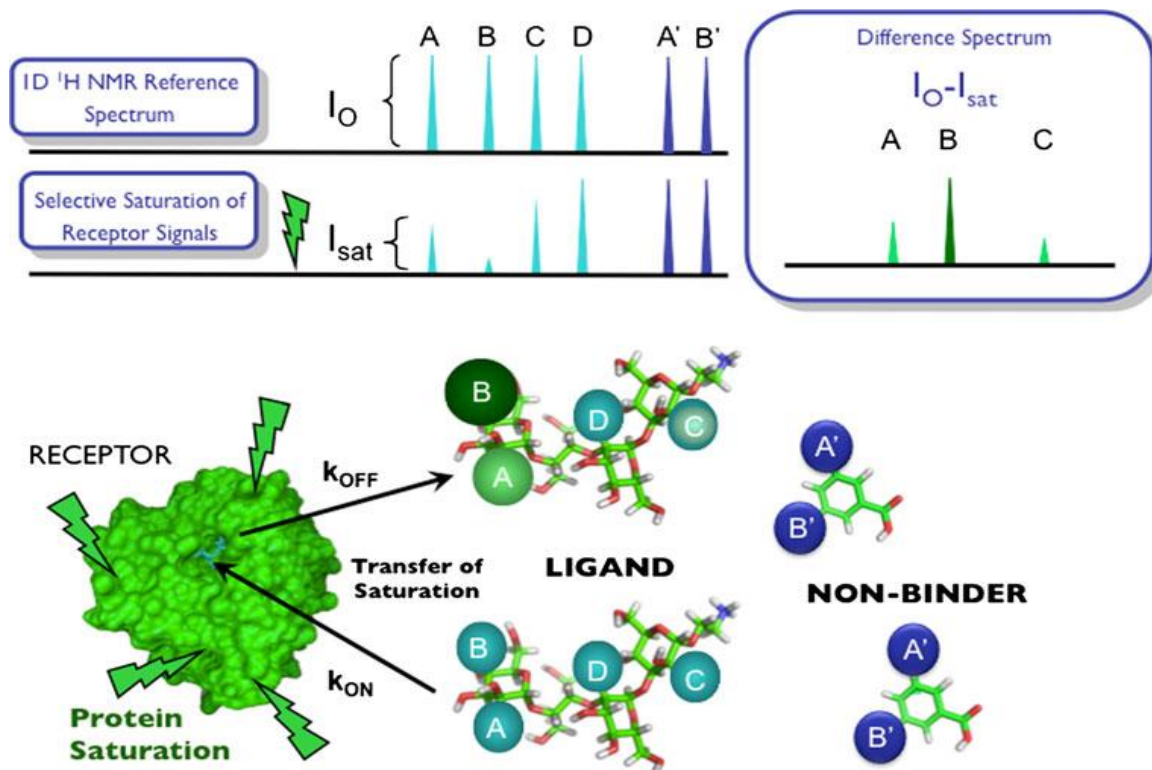


Figura 19. Esquema del espectro 1D de la diferencia de la transferencia de saturación por NMR aplicado a una muestra que contiene a una proteína receptora en la presencia de exceso molar de componentes pequeños. (Angulo and Nieto 2011).

2.2.7.5. Termoforesis a microescala (MST)

MST o también conocida como termomigración, termodifusión o efecto de Soret, es una técnica que permite detectar la constante de disociación (K_d). MST detecta cambios en la capa de solvatación, carga o tamaño de las moléculas, a través de la medición de los cambios de movilidad de las moléculas en un gradiente de temperatura

microscópico (Kaufmann *et al.* 2017). Una diferencia de la temperatura local permite un cambio local en la concentración (disminución o enriquecimiento), que será cuantificado por el coeficiente de Soret (Figura 20).

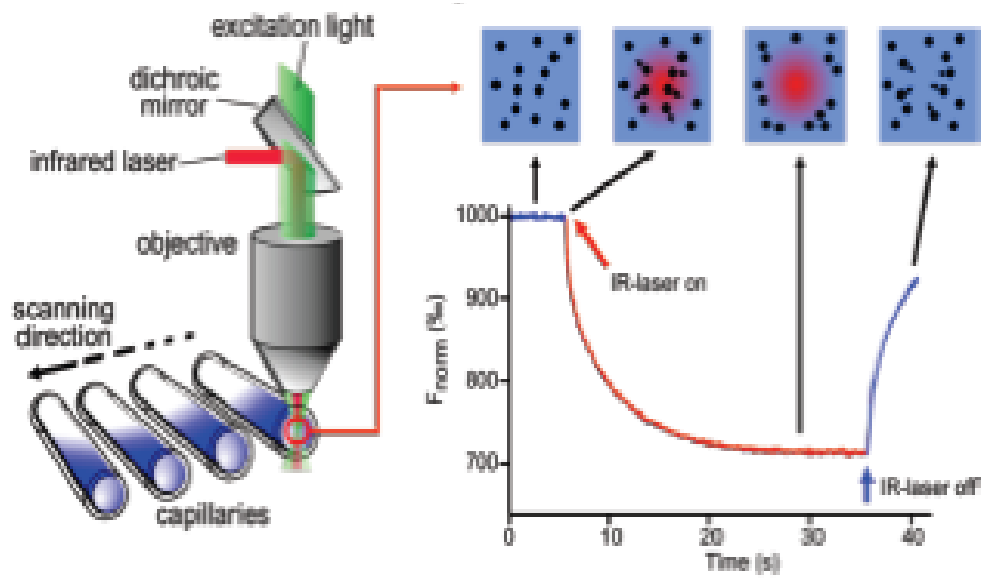


Figura 20. Óptica utilizada en MST y señal de un experimento típico (Nanotemper 2017)

2.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

PZA es una de las drogas antituberculosas más importantes debido a que es la única droga que tiene efecto sobre bacterias con el metabolismo disminuido, esto ocurre principalmente durante las primeras etapas de inflamación activa, en el que genera un ambiente ácido donde la droga es activa, además reduce la probabilidad de recaídas en pacientes tratados contra TB (Zhang *et al.* 2014).

La importancia del entendimiento del mecanismo de acción de drogas como PZA también recae en el hecho de que hay personas que no desarrollan la enfermedad al entrar en contacto con la micobacteria (aproximadamente 1/3 de la población mundial) y el sistema inmune los ha restringido a lesiones granulomatosas. En estos microambientes algunas micobacterias evaden el sistema inmune y pueden sobrevivir con condiciones de hipoxia, pH bajo, presencia de óxido nítrico, monóxido de carbono que se presume que está relacionado con la expresión de genes de dormancia y por tanto un metabolismo basal (Barry *et al.* 2009). Esta condición se conoce como infección latente de MTB. Dichas personas corren un riesgo de reactivación entre 5-10 %, mayoritariamente entre los 5 primeros años tras haberse infectado inicialmente (WHO 2016), que depende del estado inmunológico del hospedero. La PZA es la única droga que puede actuar sobre este tipo de micobacterias, por lo que su entendimiento contribuiría significativamente con el desarrollo de nuevas drogas que actúen sobre bacterias dormantes.

Se ha postulado que parte del mecanismo de acción de la PZA consistiría en la unión de POA al RpsA, dicha interacción inhibiría la trans-traducción (Shi *et al.* 2011) por competencia con el tmRNA. Yang *et al.* (2015), cristalizaron el cuarto dominio y el extremo C-terminal de RpsA nativa y en unión con el POA, obteniendo que el POA se une a los aminoácidos Lys303, Phe307, Phe310 y Arg357 del cuarto dominio S1 de esta proteína (sitio de interacción RpsA-POA). Por otro lado, se postuló que la resistencia a PZA está relacionada a una delección de una alanina en la posición 438 (RpsA Δ Ala438) resultando en que el POA no se une a los residuos del cuarto dominio, evitando así que desplace al tmRNA e inhiba la trans-traducción. El mecanismo por el cual la delección Ala438 en la RpsA desencadena la resistencia a PZA en MTB no es conocido hasta el momento.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Obtener evidencia para entender el mecanismo por el cual la delección Δ Ala438 en RpsA estaría causando resistencia a PZA en MTB.

2.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar *in silico* el comportamiento del extremo carboxilo terminal de la RpsA nativa y RpsA Δ Ala438.
- Evaluar *in silico* el efecto de variantes del extremo carboxilo terminal de la RpsA Δ Ala438 sobre el sitio de interacción entre RpsA-POA. Específicamente evaluar la proximidad media en el tiempo del extremo C-terminal al sitio de unión de POA, y su capacidad de provocar un impedimento estérico al ingreso de POA.
- Comprender el mecanismo de competencia entre POA y tmRNA por RpsA, estimando k_a constante de afinidad entre RpsA nativa-POA y RpsA nativa – tmRNA.
- Comprender el mecanismo por el que Δ Ala438 podría generar un cambio de afinidad entre Rpsa-POA, estimando las constantes de afinidad de la interacción molecular entre RpsA nativa, RpsA Δ Ala438 y RpsA Δ Ala438 truncadas con POA y con tmRNA.
- Evaluar el efecto de la adición de RpsA nativa y RpsA Δ Ala438 de MTB en un sistema de traducción *in vitro* de *E. coli*.

3. METODOLOGÍA

El presente estudio se basó en el uso de herramientas bioinformáticas y moleculares para la evaluación del efecto de la delección Δ Ala438 en el extremo C-terminal del RpsA en la interacción con el POA y su competencia con el tmRNA.

Para la evaluación *in silico*, se utilizó las estructuras cristalinas disponibles en el “Protein Data Bank” con códigos de acceso 4NNK y 4NNG. Estos cristales corresponden sólo al cuarto dominio S1 de RpsA nativa y RpsA Δ Ala438. Se evaluaron las diferencias estructurales entre ambos cristales en presencia del extremo C-terminal no estructurado. Así mismo, se generó péptidos de 10 aminoácidos a partir del extremo C-terminal y mediante la técnica de “docking” molecular. Se evaluó la afinidad entre el sitio de interacción reportado para RpsA-POA y los péptidos; en base a este ensayo se planteó el diseño de proteínas recombinantes truncadas hacia el extremo C-terminal de RpsA.

La evaluación experimental consistió en la expresión de las proteínas recombinantes de RpsA nativa, RpsA Δ Ala438 y variantes de RpsA Δ Ala438 truncadas en diferentes longitudes en el extremo C-terminal, para su posterior evaluación en la interacción con el POA, mediante técnicas como ITC, NMR, MST. Así mismo, se evaluó la interacción de todas las proteínas con el tmRNA así como la competencia de esta molécula con el POA mediante EMSA.

3.1.PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

3.1.1. Evaluación *in silico* de la capacidad de interacción del extremo C-terminal con el sitio de unión a POA en el cuarto dominio S1 en RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, por la técnica de dinámica molecular

a. Predicción de regiones flexibles de RpsA

Las regiones altamente flexibles de la proteína RpsA fueron reconocidas mediante la determinación de las regiones intrínsecamente desordenadas en la estructura primaria de RpsA, se utilizó el servidor DISOPRED (Dosztányi *et al.* 2005). Esta aproximación en base al análisis de la secuencia de aminoácidos de una proteína nos permite ubicar regiones de la proteína que podrían tener mayor probabilidad de registrar mutaciones, como “loops” o “random coils”.

b. Dinámica molecular del extremo C-terminal de RpsA

Se postuló que el extremo C-terminal es altamente flexible y por ende tiene la capacidad de acercarse al cuarto dominio S1 e impedir la unión con POA. Las posibles variaciones en la estructura secundaria del C-terminal fueron analizadas en RpsA Δ Ala438 y comparadas con la RpsA nativa, mediante minimización de energía y dinámica molecular con NAMD durante 10 ns de estas dos proteínas. Se utilizaron los cristales del cuarto dominio S1 caracterizados por Yang *et al.* 2015 (PDB, códigos de acceso 4NNK y 4NNG, correspondientes a las proteínas nativa y Δ A438, respectivamente) a los que se le adicionó los residuos con y sin mutación del dominio C-terminal (residuos 434-481). Los átomos de hidrógeno fueron adicionados usando el programa psfgen implementado en el paquete de visualización VMD (versión 1.9.2, Humphrey *et al.* 1996). La carga del sistema fue neutralizada usando iones sodio, paso

seguido el sistema fue inmerso en una “caja de agua” conteniendo 22,604 moléculas de agua, usando el modelo TIP3P. El protocolo de equilibrio, inició con 1500 pasos de minimización, seguido de 10000 ps de dinámica molecular a 310K. Información de la trayectoria fue almacenada cada 1ps y posteriormente analizada usando VMD.

3.1.2. Evaluación *in silico* de la capacidad de interacción de péptidos del extremo C-terminal de RpsA con el sitio de unión de POA mediante “docking” molecular

Para evaluar la posibilidad de que el extremo C-terminal interfiera con el sitio de unión a POA en el cuarto dominio S1, se evaluó la interacción de las distintas secuencias de péptidos comprendidas en el extremo C-terminal con el sitio de unión al POA.

Para esta evaluación se realizó el análisis de acoplamiento “docking” molecular entre péptidos y el sitio de interacción del POA en el cuarto dominio S1 de la RpsA, se utilizó el cristal 4NNG (Yang *et al.* 2015) y 37 péptidos de 10 aminoácidos generados a partir del extremo C-terminal (434-481) (<https://github.com/davidrequena/multifastats>), en el programa ICM (Abagyan *et al.* 1994; Fernandez-Recio *et al.* 2003). Se estableció una posible región de unión alrededor de los residuos L279-M284, F287, G299-L326, E332-P334, A339-G341, I349-S361, que corresponden a aminoácidos que se encuentran a una distancia de hasta 15 Å del sitio de interacción de POA. Se utilizó una rejilla de 0.5 Å y una caja de 32 x 35 x 26Å.

3.1.3. Diseño y síntesis de los genes codantes correspondientes a variantes de RpsA- Δ Ala438 con distintos tamaños del extremo C-terminal no-estructurado

En base al análisis *in silico* para la evaluación de impedimento estérico (ver anexo 01), se demostró que el extremo C-terminal es determinante en el acceso de POA al cuarto dominio. Variantes de RpsA Δ Ala438 fueron generados para medir las afinidades por el POA. Para determinar la secuencia del C-terminal involucrada en dicho proceso se sintetizaron tres proteínas en base a RpsA Δ Ala438 con distintos tamaños del extremo C-terminal: RpsA Δ Ala438_CUT1, RpsA Δ Ala438_CUT2, RpsA Δ Ala438_CUT3.

3.1.4. Clonación, expresión y purificación de las variantes de RpsA

El RpsA nativo de MTB fue clonado con los sitios de restricción BamHI y XhoI en el plásmido pET28a (Novagen), la verificación de la clonación fue realizada con las mismas enzimas. Los genes de RpsA Δ Ala438 y sus variantes (RpsA Δ Ala438_CUT1, RpsA Δ Ala438_CUT2, RpsA Δ Ala438_CUT3) fueron sintetizadas e incluidas en el vector pET28a por GENEMED. Los genes fueron incluidos de tal manera que las proteínas tuvieran un His-tag en el extremo N-terminal.

Los plásmidos con sus insertos fueron transformados en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) mediante shock térmico y sembradas en medio sólido Luria-Bertani (Difco™ BD, USA) con Kanamicina 40 μ g/ml (Sigma, USA). Las células fueron incubadas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6 -0.8 e inducidas con 0.5 mM de IPTG a 25°C por 8 horas. Las células fueron recolectadas mediante

centrifugación a 6000 rpm a 4 °C por 15 minutos y lisadas mediante 3 ciclos de shock térmico seguido por 3 ciclos de sonicación (Misonix Sonicator 3000). La fracción soluble fue incubada por 16 horas con RNaseA a 4°C, luego las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad His-Trap (Maertens *et al.* 2009; Block *et al.* 2009). Se utilizó gradientes de imidazol entre 10 mM a 500 mM, en buffer Tris-HCl 20 mM, 300mM NaCl, pH 8 (BIO-RAD, BioLogicLP). Posteriormente, se concentró las fracciones purificadas utilizando el sistema Amicón con un filtro de 10 KDa a un volumen de 1.5 ml en buffer fosfato salino. La cuantificación de proteínas se realizó mediante espectrofotometría UV a 280 nm ($\epsilon=46410$, <http://web.expasy.org/protparam/>) y se almacenó en alícuotas de 0.7 ml a -20°C.

3.1.5. Evaluación de la interacción del tmRNA- RpsA y competencia del POA-tmRNA por RpsA mediante EMSA

El método EMSA permite evaluar cualitativamente la interacción entre RpsA y tmRNA a través de la visualización del tmRNA y su cambio de movilidad electroforética, cuando el tmRNA se encuentra libre, así como cuando está en complejo con el RpsA. Mediante la misma técnica se evaluó la competencia del tmRNA y POA por el sitio de interacción del RpsA.

Para ello, se siguieron una serie de pasos consecutivos, los que iniciaron con la extracción de ADN de MTB H37Rv a partir de la cuál se amplificó el gen *ssrA*. El producto (*gen ssrA*) se usó como blanco para la producción de tmRNA mediante

transcripción *in vitro*. Posteriormente, en presencia de las proteínas recombinantes purificadas se realizó la evaluación de la interacción por EMSA.

3.1.5.1. Extracción de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*

El ADN de MTB fue extraído mediante el método de digestión con proteinasa K. La cepa de MTB H37Rv fue cultivada en agar Middlebrook 7H10 (DB Difco, USA) enriquecido con 10% OADC e incubada a 37°C por 21-28 días.

Una asada de cultivo fue resuspendida en 500 μ l de buffer TE e inactivada a 80°C por 20 minutos. 50 μ l de lisozima (Sigma, USA) (10 mg/ml) fue agregado a la cepa inactivada e incubada durante toda la noche a 37°C. Luego, 75 μ l de 10 % de SDS (J.T.Baker, USA) y 20 μ l de proteinasa K (Ambion, Life technologies, USA) (20 mg/ml) fue agregado e incubado a 65°C por 3 horas y en el intervalo de cada 20 minutos se homogenizó por 20 segundos. Al finalizar la incubación se agregó 100 μ l de 5M de NaCl (Merck, USA) y 100 μ l de CTAB/NaCl (calentado previamente a 65°C), se homogenizó e incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregó 750 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (EMD Millipore, USA) (25:24:1), se homogenizó y centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se trasvasó a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregó 750 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se homogenizó y centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm, nuevamente se recuperó el sobrenadante y se trasvasó a otro tubo. El ADN fue precipitado con 1 ml de etanol absoluto (EMD Millipore, USA) frío (-20°C) y lavado con 1 ml de alcohol al 70% frío

(-20°C) después de la precipitación. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. El ADN fue resuspendido en 50 µl de buffer de elución más RNase y se incubó a 55°C por 15 minutos para la dilución del pellet.

Las muestras fueron evaluadas mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X a 75V por 60 minutos. La cuantificación del ADN se realizó mediante la comparación con el marcador lambda (Invitrogen cat. 25250010). La visualización de las bandas se realizó por tinción con bromuro de etidio (Sigma, USA) en el transiluminador (Clever Scientific LTD, USA).

3.1.5.2. Síntesis y purificación del gen *ssrA* de *Mycobacterium tuberculosis* para la producción de tmRNA

El gen *ssrA* fue amplificado a partir de 10 ng DNA genómico de MTB H37Rv con 0.5 µM de primers que incluyeron la secuencia del promotor T7: Forward 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT CTG ACC GGG AAG TTA ATG GC-3' y reverse 5'-GAT CAG ATC CGG ACG ATC GGC ATC G-3' (Shi *et al.* 2011). Se utilizó el Phusion flash PCR Master mix (Thermo scientific F-548L) en 20 µl de volumen final. El ciclaje incluyó 98°C por 10seg, 70°C por 10 seg y 72°C por 15 seg, y al final un ciclo de 72°C por 1 min. Los productos fueron purificados con el kit High Pure Clean-Up siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.1.5.3. Transcripción del gen *ssrA* de *Mycobacterium tuberculosis* para la producción de tmRNA

A partir del producto amplificado y purificado en el ítem 3.1.5.2 se realizó el proceso de transcripción *in vitro* usando el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Shi *et al.* 2013). La transcripción de 1 µg de ADN se llevó a cabo a 37°C por 2 horas. La purificación se realizó con el Thermo scientific geneJET RNA purification kit.

3.1.5.4. Evaluación de la interacción y competencia de tmRNA y POA por el sitio de unión en el RpsA

En este ensayo se evaluó la unión del tmRNA - RpsA y la competencia de tmRNA y POA por el sitio de interacción del RpsA mediante el cambio de movilidad electroforética (EMSA) del tmRNA cuando se encuentra unido al RpsA.

A un gel de 5% de poliacrilamida se realizó una pre-electroforesis con 0.5X TBE por 30-60 minutos a 5 mA, con la finalidad de estabilizar el sistema electroforético. El tmRNA se calentó a 80°C por 2 minutos y se dejó enfriar por 20 minutos para su plegamiento adecuado. En las reacciones de unión entre tmRNA y RpsA se usó el buffer de interacción con 5% glicerol, 80mM KCl, 9 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 20U RNasin, 10 µM RpsA, 1-14 pmol de tmRNA y para la competencia se agregó 2.4 mM de POA, todas las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 hora a temperatura ambiente. 20 µl de reacción de unión más 5 µl de loading buffer fueron analizados mediante electroforesis (5 mA por 4 horas) en el gel de poliacrilamida en el que se realizó la pre-electroforesis. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio.

El buffer Tris -HCl a pH 7.4 también fue usado en la evaluación de la interacción (Yang *et al.* 2015).

3.1.6. Evaluación de la interacción de las variantes de RpsA con POA y tmRNA mediante microcalorimetría de titulación isotérmica

La medida de afinidad entre RpsA y tmRNA se llevó a cabo a 25°C por ITC usando el instrumento VP.ITC (Microcal Inc, Northhampton, MA). RpsA nativo fue dializada en 10 mM buffer fosfato, pH 6.0, 150 mM NaCl. La determinación de la concentración de proteína y ligando se realizó por espectrometría UV. Se utilizó 30 µM de RpsA y 2 µM de tmRNA (MW= 192.5 KDa). El tmRNA fue inyectado 30 veces (10 µl por inyección) en una celda conteniendo la proteína a intervalos de 300 s. La velocidad de mezcla fue 300 rpm. Los parámetros de unión se procesaron a partir de las isothermas después de sustraer el promedio de calor de dilución (~ -0.2 kcal/mol) utilizando el software Microcal Data Analysis (Malvern, Westborough, MA).

Para la medida de afinidad entre RpsA y POA, cada proteína recombinante fue dializada en 10 mM buffer fosfato, pH 6.0, 150 mM NaCl y su concentración fue determinada mediante espectrometría UV 280 nm. El POA (FLUKA, Chemika) fue preparado en el mismo buffer usado en la diálisis. En la preparación del POA se tuvo la consideración de hacer ensayos sin y con corrección de pH final a 6.0. Las concentraciones del ligando fueron determinadas peso por volumen. El POA fue inyectado 30 veces (10 µl por inyección) en la celda conteniendo la proteína a intervalos de 300 s. La velocidad de agitación fue de 300 rpm. El ensayo de afinidad se llevó a cabo a la misma temperatura y en el mismo equipo para el ensayo de afinidad

entre RpsA-tmRNA (Microcal Inc, Northhampton, MA), así como el procesamiento de los datos (Malvern, Westborough, MA). Los ensayos se realizaron por duplicado en cada caso.

3.1.7. Evaluación de la interacción entre RpsA y POA mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para evaluar la interacción específica entre RpsA-POA se utilizó la espectroscopía por NMR, con la metodología “WATERGATE” (Liu *et al.* 1998) con el equipo Bruker 500 MHz Avance III HD y la sonda de banda ancha SMART (sonda SMART), todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Con la finalidad de generar una señal de protón en RpsA, 100mM buffer fosfato, pH 6.0, 150 mM NaCl, fue pasada por una cadena de frío -20°C por una hora y -70°C la segunda hora. Posteriormente, se liofilizó este buffer (LABCONCO) a -40°C y vacío 133×10^{-3} mBAR durante 4-8 horas. Se utilizó las columnas de intercambio de buffer Zeba Spin Desalting Columns (cat # 89890, 7K MWCO, 2mL) para el intercambio de solvente con D₂O. Se homogenizó por inversión varias veces hasta remover burbujas de la columna, se cortó el extremo inferior para drenar el buffer de manufactura. Luego, se colocó la columna en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante dos minutos utilizando un rotor tipo “swinging bucket” (Heraeus Multifuge X1R Thermo Scientific) a 1000 x g. Se inició el proceso de lavados con el buffer reconstituido en D₂O, por cada lavado se utilizó 2 ml de buffer y se repitió por cuatro veces. Se colocó la columna en un nuevo tubo Falcon de 15 ml y se aplicó 700 µl de la muestra sobre la columna, inmediatamente se centrifugó durante 4 minutos a 1000 x g.

3.1.7.1. Perturbación del cambio químico (NMR-CSP)

Todas las mediciones iniciaron con la calibración del pulso, optimizando el pulso de 360°. Luego se utilizó una secuencia de pulso ^1H , con pulso 30° y pre-saturación de solvente. La pre-saturación del solvente se logró irradiando la muestra a la frecuencia del agua 4.7 ppm con una amplitud de radiofrecuencia de 100 Hz durante 3 s por cada ciclo de medición. Los parámetros utilizados en la adquisición de datos fueron: ancho de ventana 20 ppm, el número de puntos complejos 64K, resolución 0.3 Hz, tiempo de adquisición 3.28 s, el número de mediciones ceñuelos 16 y el número de mediciones netas para la adquisición de la señal fue 384 (sonda SMART).

3.1.7.2. Difusión (NMR-D)

Se realizó la secuencia de calibración utilizada para el análisis descrito en el ítem 3.1.7.1, así como la supresión de la señal del solvente. Los parámetros usados para este ensayo fueron $\Delta = 500$ ms, $\delta = 600$ us, $G_{\text{max}} = 48.1505$ gauss/cm. Se utilizó la Ley de Stokes-Einstein para la determinación del radio hidrodinámico de RpsA-POA (Bromberg 2003).

3.1.7.3. Diferencia de la transferencia de saturación (NMR-STD)

La secuencia de calibración y la supresión del solvente se realizaron bajo el esquema descrito en el ítem 3.1.7.1. La frecuencia de saturación fue 0.838 ppm, y el tiempo de irradiación o saturación fue 6 s (Mayer and Meyer 1999).

3.1.8. Evaluación de la interacción del tmRNA y RpsA mediante termoforesis a microescala

Para la evaluación de la interacción tmRNA –RpsA se siguió el siguiente protocolo: 2.05 μM de tmRNA fue diluido en forma seriada 16 veces en buffer MST con Tween 20 (NanoTemper), a cada dilución se agregó 50 nM de proteína marcada con Red-tris-NTA (170404-NanoTemper). 4 μl de cada reacción fue cargada en diferentes capilares (con tratamiento estándar Monolith NT.115) a las que se le aplicó 5% de poder de excitación y poder MST medio (Figura 21). La termoforesis se realizó en el Monolith NT.115 pico (Laboratorio de Biofármacos recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad de Concepción de Chile).

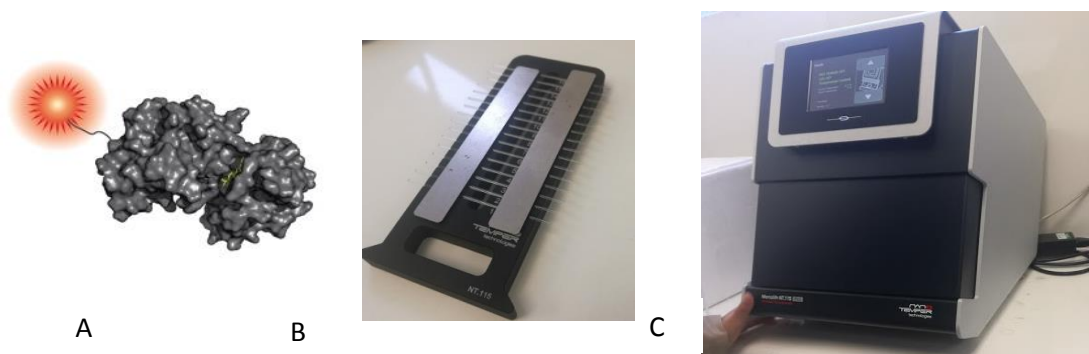


Figura 21. Equipo de termoforesis y marcaje de proteínas. A. Sistema de marcaje de proteínas recombinantes con Red-tris-NTA (manufacturer NanoTemper). B. Batería de capilares para medición de afinidad por termoforesis. C. Monolith NT.115 pico (<https://nanotempertech.com>).

3.1.9. Efecto de la adición del RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* en el ribosoma de *Escherichia coli* sobre la traducción de proteínas *in vitro*

Para comparar el efecto de la $\Delta A438$ de RpsA de MTB sobre la capacidad traduccional del ribosoma se incorporó la subunidad RpsA nativa y la subunidad RpsA mutada (RpsA $\Delta A438$), en el complejo de ribosoma purificado de *E. coli*. La actividad de RpsA fue evaluada en un sistema de traducción *in vitro* (PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit) con el gen malato deshidrogenasa (ECs4109) como template. A las reacciones estándar (descritas por el fabricante) se le agregó 2 μM de RpsA nativo y RpsA $\Delta A438$ en diferentes reacciones, se incubó a 37°C durante dos horas. Luego se detuvo la reacción al colocarlas sobre hielo. Se reveló mediante el uso de Lumio™ Green Detection Kit, para ello se tomó 5 μl del producto de reacción y se adicionó 20 μl de acetona fría que se dejó incubar durante 20 minutos a -20°C, luego se centrifugó a temperatura ambiente a 12000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se hizo la resuspensión del pellet en 20 μl 1X Lumio™ Gel Sample Buffer. Se corrió un SDS-page al 12 % por 1 hora a 30mA. Se utilizó el blue light LED transiluminador con filtro naranja, los análisis de densitometría se realizaron con el programa ImageJ (Laboratorio de Biología Molecular- UPC).

3.2. Consideraciones éticas

El presente estudio fue llevado a cabo como parte del proyecto “Determinación de resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* mediante la detección de ácido pirazinoico utilizando tmRNA y nanopartículas magnéticas a partir de muestras

de esputo” financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato 151-PNICP-PIAP-2015. El presente proyecto está registrado con el Código SIDISI: 66722 con constancia de aprobación del Comité de Ética CAREG-ORVEI-026-016.

3.3.Análisis de datos

Para la comparación de valores de la eficiencia de traducción *in vitro* entre RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, y para las pruebas de asociación entre las diferentes variables, se utilizaron las pruebas estadísticas no-paramétricas de Kruskal-Wallis, Chi- cuadrado. La comparación de las lecturas de fluorescencia obtenidas (directamente proporcional a la cantidad de proteína traducida) de dos muestras se evaluó mediante el test de Wilcoxon. Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con un nivel de significancia del 95% y se empleó el software estadístico Stata versión 14.

4. RESULTADOS

4.1.1. Evaluación *in silico* de la capacidad de interacción del extremo C-terminal con el sitio de unión a POA en el cuarto dominio S1 en RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, por la técnica de dinámica molecular

a. Predicción de regiones flexibles de RpsA

La aproximación en base a la secuencia de aminoácidos de una proteína nos permite ubicar regiones de la proteína que podrían tener mayor probabilidad de registrar mutaciones, como “loops” o “random coils”. La secuencia primaria de RpsA de MTB, tiene regiones no estructuradas o de alta flexibilidad predominantemente en el extremo C-terminal, aproximadamente desde el aminoácido 361 – 48, confirmando lo reportado en la estructura cristalina de dicha proteína (Yang *et al.* 2015). La Δ A438 reportada por Shi *et al.* (2011) se encuentra dicha región intrínsecamente desordenada (Figura 22).

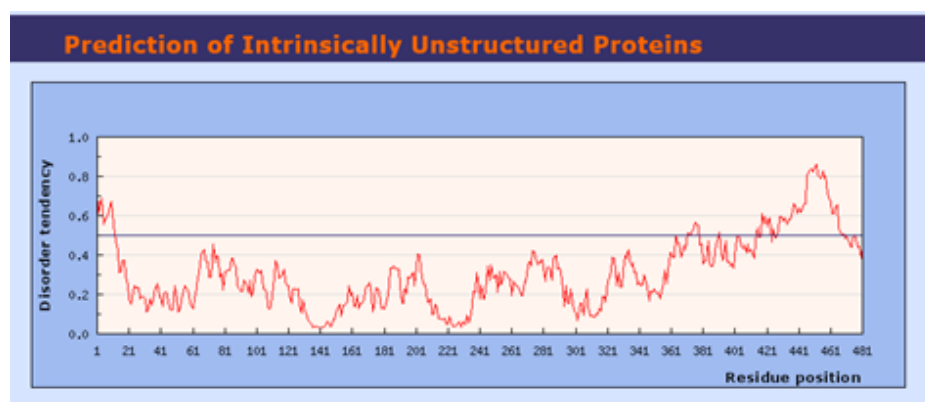
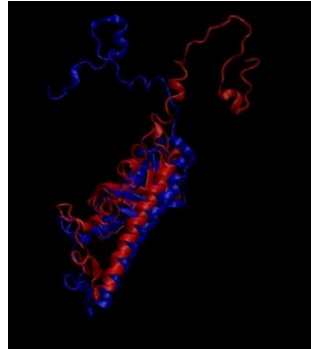


Figura 22. Predicción de las regiones altamente flexibles de la RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (<http://iupred.enzim.hu/pred.php>)

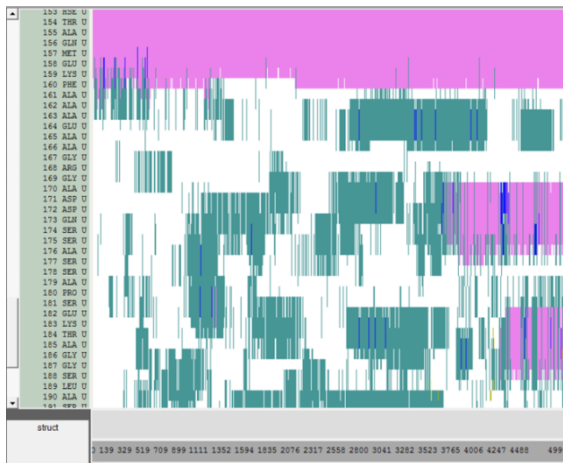
b. Dinámica molecular del extremo carboxilo terminal

La trayectoria de dinámica molecular de los cristales 4NNK y 4NNG durante 10 ns mostró que la mutación Δ Ala438 presente en el extremo C-terminal favorece la estabilidad de la α -hélice más cercana, siendo diferente con respecto a la RpsA nativa (Figura 23A). La simulación predice la formación de estructuras secundarias a partir de la dinámica molecular realizada a cada una de ellas (Figura 23 B-C). En este caso, la estabilidad de la α -hélice (representada en color rosado) en RpsA S1 nativo es variable en el tiempo, con tendencia a la formación de regiones no estructuradas, mientras que las mismas estructuras en presencia de la delección Δ Ala438 presentan mayor estabilidad a lo largo del tiempo de simulación. Así mismo, se puede observar que la formación de giros aleatorios (en color cian) varía entre ambas proteínas. Estas predicciones muestran que la delección Δ Ala438 genera algunos cambios estructurales en la proteína.

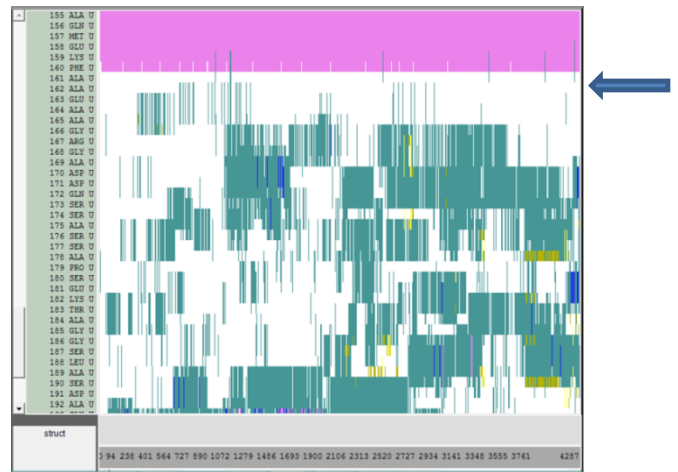
A. Cuarto dominio S1 más el extremo C-terminal: RpsA_S1_nativo-RpsA_S1ΔAla 438



B. RpsA_S1 nativo



C. RpsA_S1 ΔAla 438



D.

T Turn	H Alpha Helix
E Extended Configuration	G 3-10 Helix
B Isolated Bridge	I Pi-helix
C Coil (none of the above)	

Figura 23. Visualización de la estabilidad de estructuras secundarias mediante cálculos de dinámica molecular 10 ns (NAMD): A. Cuarto dominio S1 más el extremo C-terminal (RpsA nativo en azul, RpsA ΔAla438 en rojo) B: RpsA nativo. C. RpsA ΔAla438. D. Leyenda de las estructuras secundarias mostradas en el visualizador VMD. Hacia el lado izquierdo de las figuras se muestra la secuencia de aminoácidos.

4.1.2. Evaluación *in silico* de la capacidad de interacción de péptidos del extremo C-terminal de RpsA con el sitio de unión de POA mediante “docking” molecular

Se encontraron 13 péptidos que mostraron una importante afinidad con al menos un sitio de unión al POA en la proteína RpsA y 6 péptidos que interaccionaron con los dos sitios de unión al POA (Anexo 1).

Los péptidos con capacidad de unirse a dos sitios de unión al POA (Tabla 04) se tomaron en cuenta para el diseño de las proteínas truncadas que carecieran de dichas secuencias identificadas hacia el extremo carboxilo terminal. Estas proteínas truncadas, adicionalmente tenían la delección Δ Ala438 (RpsA Δ A438_CUT1, RpsA Δ A438_CUT2, RpsA Δ A438_CUT3) (Figura 25). Si alguna de estas proteínas truncadas restituía su afinidad por el POA (Shi *et al.* 2011; Yang *et al.* 2015) entonces se obtendría cierta evidencia que demostraría que el péptido se uniría al sitio de unión a interacción entre RpsA-POA, generado por la mutación Δ A438.

Tabla 04. Secuencia de péptidos que interferirían estéricamente con POA y propuesta para la generación de variantes de RpsA Δ Ala438.

Péptidos	Secuencia	Proteínas truncadas
Pep6	GRGADDQSSA	RpsA Δ A438_CUT3
Pep8	GADDQSSASS	
Pep20	SEKTAGGSLA	RpsA Δ A438_CUT2
Pep21	EKTAGGSLAS	
Pep34	LAALREKLAG	RpsA Δ A438_CUT1
Pep36	ALREKLAGSA	

Así mismo, se realizó un análisis de la variación de las distancias entre los centros de masa de las regiones de aminoácidos que presentaron mayor afinidad al sitio de interacción RpsA-POA (PEP6/PEP8, PEP20/PEP21, PEP34/PEP36), tanto para la RpsA nativa y RpsA Δ A438 (Figura 24), mostrando que la delección en Δ A438 tendría efecto en el comportamiento del extremo C-terminal no estructurado y posiblemente en la interacción con POA.

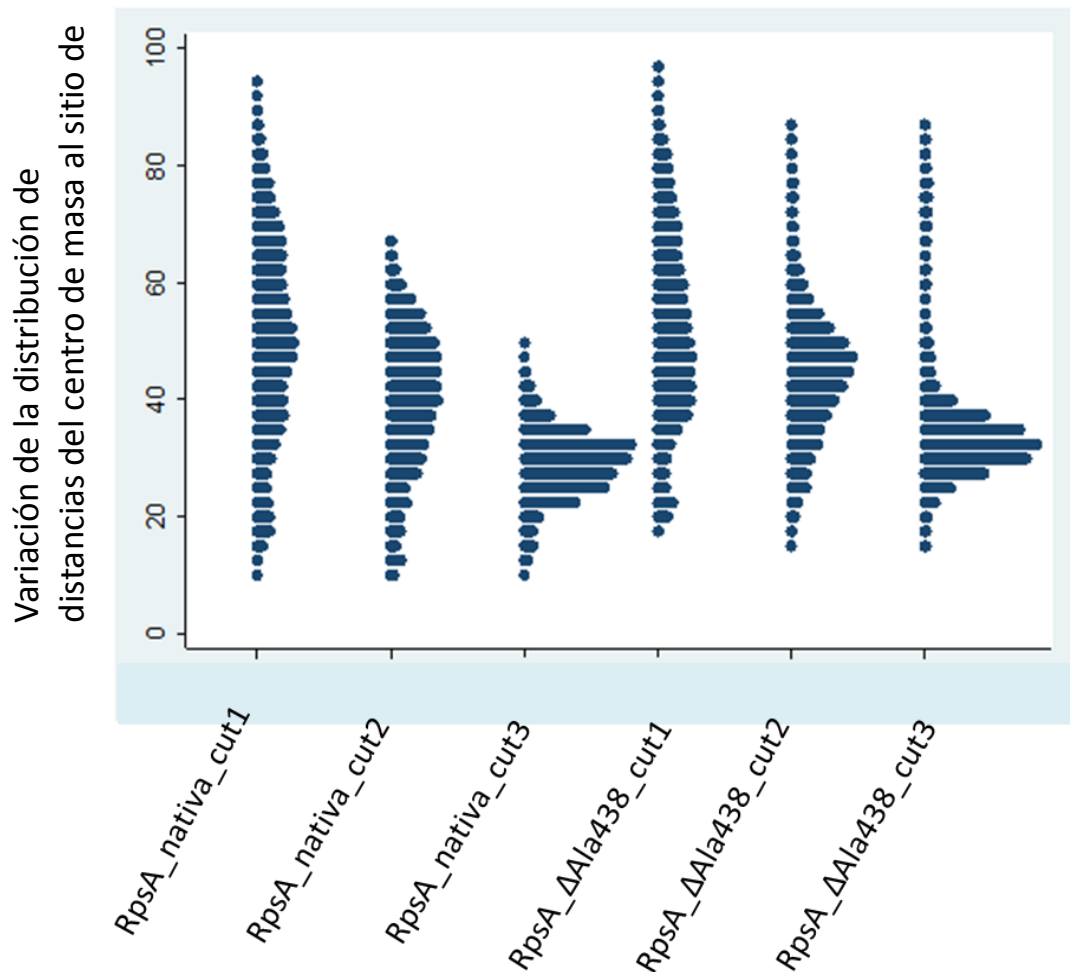


Figura 24. Análisis de la variación de la distribución del extremo carboxilo terminal de RpsA con respecto al sitio de unión (cuarto dominio S1) con el POA mediante dinámica molecular (NAMD) por 10 ns.

4.1.3. Diseño y síntesis de los genes codantes correspondientes a variantes de RpsA Δ Ala438 con distintos tamaños del extremo C-terminal no-estructurado

En base al estudio de afinidad entre los péptidos generados del extremo C-terminal y el sitio de interacción RpsA-POA (ver tabla 04), se diseñó sitios de corte para la producción de proteínas truncadas de RpsA Δ A438 (Figura 25) y su posterior evaluación en la reconstitución de la interacción con POA.

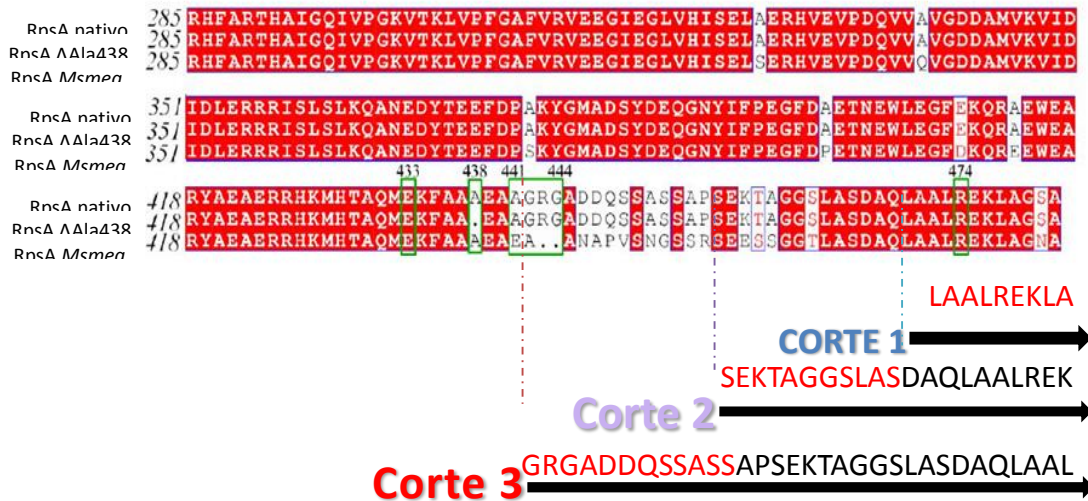


Figura 25. Esquema de cortes propuestos *in silico* para la generación de proteínas truncadas en el extremo C-terminal de RpsA (en rojo se muestra la secuencia de los péptidos en estudio).

En las figuras 26 -29 se muestran las secuencias de las proteínas truncadas que se sintetizaron para este estudio, todas fueron modificadas a partir de RpsA Δ Ala438: RpsA Δ Ala438_CUT1 (468 aa) con la que se evaluó los péptidos 6 y 8, RpsA Δ Ala438_CUT2 (454 aa) con la que se evaluó los péptidos 20 y 21, y RpsA Δ Ala438_CUT3 (440 aa) donde se evaluó los péptidos 34 y 36.

MPSPTVTSPQVAVNDIGSSEDFLAAIDKTIKYFNDGDIVEG
TIVKVDRDEVLLDIGYKTEGVIPARELSIKHDVDPNEVVS
GDEVEALVLTKEKDEGRLILSKKRAQYERAWGTIEALKEK
DEAVKGTVIEVVKGGLILDIGLRGFLPASLVE MRRVRDLQ
PYIGKEIEAKIIELDKNRNNVLSRRAWLEQTQSEVRSEFL
NNLQKGTIRKGVVSSIVNFGAFVDLGGVDGLVHVSELSWK
HIDHPSEVVQVGDEVTVEVLDVDMDRERSLSL KATQEDP
WRHFARTHAIGQIVPGKVTKLV PFGAFVRVEEGIEGLVHI
SELAERHVEVPDQVVAVGDDAMVKVIDIDLE RRRISLSLK
QANEDYTEEFDPAKYGMADSYDEQGN YIFPEGFDAETNEW
LEGFEKQRAEWEARYAEAERRHKMHTAQMEKFAAEAAGR
GADDQSSASSAPSEKTAGGSLASDAQ*

Figura 26. Secuencia primaria RpsA Δ Ala438_CUT1 (468 aa)

MPSPTVTSPQVAVNDIGSSEDFLAAIDKTIKYFNDGDIVEG
TIVKVDRDEVLLDIGYKTEGVIPARELSIKHDVDPNEVVS
GDEVEALVLTKEKDEGRLILSKKRAQYERAWGTIEALKEK
DEAVKGTVIEVVKGGLILDIGLRGFLPASLVE MRRVRDLQ
PYIGKEIEAKIIELDKNRNNVLSRRAWLEQTQSEVRSEFL
NNLQKGTIRKGVVSSIVNFGAFVDLGGVDGLVHVSELSWK
HIDHPSEVVQVGDEVTVEVLDVDMDRERSLSL KATQEDP
WRHFARTHAIGQIVPGKVTKLV PFGAFVRVEEGIEGLVHI
SELAERHVEVPDQVVAVGDDAMVKVIDIDLE RRRISLSLK
QANEDYTEEFDPAKYGMADSYDEQGN YIFPEGFDAETNEW
LEGFEKQRAEWEARYAEAERRHKMHTAQMEKFAAEAAGR
GADDQSSASSAP*

Figura 27. Secuencia primaria de aminoácidos de RpsA Δ Ala438_CUT2 (454 aa)

**MPSPTVTSPQVAVNDIGSSEDFLAAIDKTIKYFNDGDIVEG
 TIVKVDRDEVLLDIGYKTEGVIPARELSIKHDVDPNEVVS
 GDEVEALVLTKEKKEGRLILSKKRAQYERAWGTIEALKEK
 DEAVKGTVIEVVKGGLILDIGLRGFLPASLVE MRRVRDLQ
 PYIGKEIEAKIIELDKNRNNVLSRRAWLEQTQSEVRSEFL
 >NNLQKGTIRKGVVSSIVNFGAFVDLGGVDGLVHVSELSWK
 HIDHPSEVVQVGDEVTVEVLDVDMDRERSLSL KATQEDP
 WRHFARTHAIGQIVPGKVTKLVPFGAFVRVEEGIEGLVHI
 SELAERHVEVPDQVVAVGDDAMVKVIDIDLERRRISLSLK
 QANEDYTEEFDPAKYGMADSYDEQGNYIFPEGFDAETNEW
 LEGFEKQRAEWEARYAEAERRHKMHTAQMEKFAAEEA***

Figura 28. Secuencia primaria de aminoácidos de RpsA Δ Ala438_CUT3 (440 aa)



Figura 29. Esquema de proteínas recombinantes producidas en el presente estudio

4.1.4. Clonación, expresión y purificación de las variantes de RpsA

En la verificación de la clonación del gen *rpsA* nativo mediante una doble digestión con BamHI y XhoI, se observó dos bandas correspondientes al plásmido pET28a (5.3 Kb) y al gen *rpsA* de 1446 pb (Figura 30A). La verificación de la expresión de las variantes de RpsA se realizó mediante un SDS-PAGE donde se observaron bandas correspondientes a RpsA nativa y RpsA Δ Ala438 en MTB con un tamaño aproximado de 59KDa, mientras que las proteínas truncadas de RpsA Δ Ala438 varían entre 55 -58 kDa (Figura 30B).

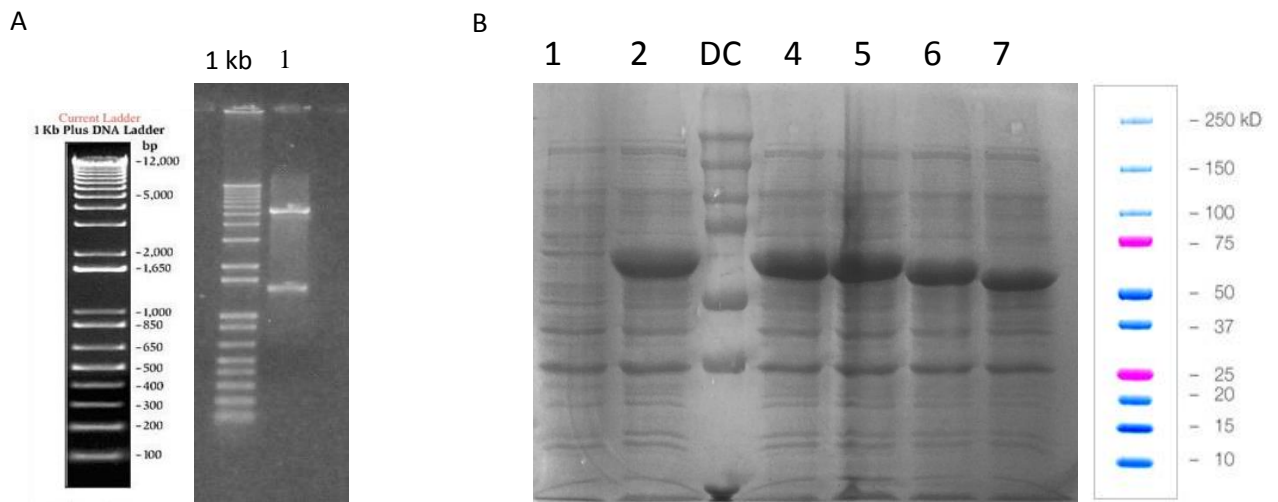


Figura 30. Clonación y expresión de variantes de RpsA. A. Digestión del pET28a con BamHI /XhoI. Carril 1: Marcador 1 Kb, carril 2: pET28a + *rpsA* nativo. Gel de agarosa 1%. 80V, 90 min. B. SDS-PAGE de RpsA. Carril 1: RpsA nativo no inducido; carril 2 RpsA nativo inducido con 0.5 mM de IPTG ; carril 3: Marcador dual color-biorad; carril 4: RpsA Δ Ala438 inducido con 0.5 mM de IPTG, carril 5: RpsA Δ Ala438_CUT1 inducido con 0.5 mM de IPTG; carril 6: RpsA Δ Ala438_CUT2 inducido con 0.5 mM de IPTG; carril 7: RpsA Δ Ala438_CUT3 inducido con 0.5 mM de IPTG .

Las proteínas fueron eluidas en 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM de imidazol. La pureza de cada una fue evaluada mediante SDS-PAGE (Figura 31), y la cuantificación se realizó mediante espectroscopía UV a 280 nm.

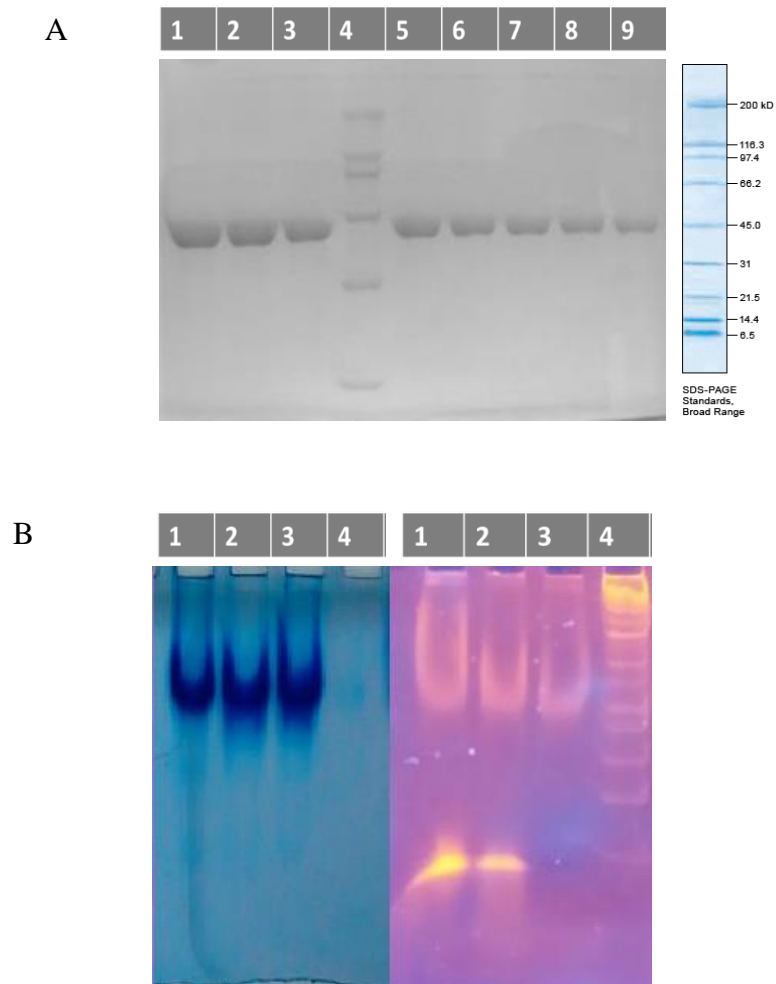


Figura 31. Proteína recombinante purificada del extracto celular. A. Fracciones de la purificación de RpsA nativo (59 KDa) con 20 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl 200 mM Imidazol. Gel de poliacrilamida 12 %, tinción con azul de Coomassie. Marcador Broad Range (carril 4). B. Geles de poliacrilamida nativos idénticos al 5%, a la izquierda tinción con azul de Coomassie y a la derecha tinción con bromuro de Etidio. Carril 1 RpsA purificada por cromatografía de afinidad, Carril 2 RpsA purificada por cromatografía de afinidad incubada con DNase, Carril 3 RpsA purificada por cromatografía de afinidad incubada con RNase. Carril 4 Marcador de RNA Riboruler.

En la figura 31 B se observó que tras la purificación por cromatografía de afinidad de RpsA, al correr las proteínas en condiciones nativas se encontró presencia de ácidos nucleicos, por lo que se procedió a incubar con DNase y RNase, evidenciándose la disminución de bandas de ácidos nucleicos en presencia de RNase carril 3.

4.1.5. Evaluación de la interacción del tmRNA-RpsA y competencia del POA-tmRNA por RpsA mediante EMSA

Esta técnica permitió la visualización del tmRNA en su forma nativa así como el cambio de movilidad electroforética cuando formó complejo con el RpsA. Para ello se siguieron varios pasos, desde la extracción de ADN genómico de MTB H37Rv donde se muestra la forma de cuantificación y evaluación de la integridad del material genético inicial, la amplificación y transcripción del gen *ssrA* y finalmente el ensayo de interacción y competencia.

4.1.5.1. Extracción de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*

Debido a que se realizó la extracción del ADN con solventes orgánicos, la mejor técnica para cuantificación de ADN fue por densitometría con el marcador lambda (10 ng/ μ l). Como se observa en la figura 32, donde se obtuvo 200 ng/ μ l de ADN genómico de buena integridad.

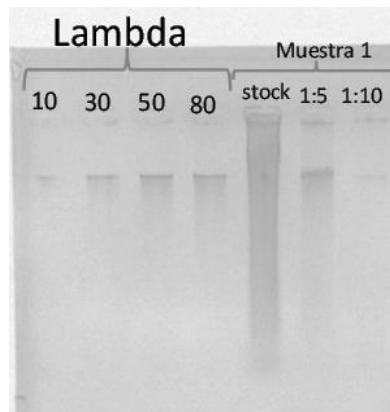


Figura 32. Cuantificación y evaluación de la integridad del DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis*. Gel de agarosa al 0.8%, 75V 60 min.

4.1.5.2. Síntesis y purificación del gen *ssrA* de *Mycobacterium tuberculosis* para la producción de tmRNA

La banda correspondiente al gen *ssrA* y su promotor, amplificada y purificada corresponde a 620 pb, se muestra en la figura 33. Este producto fue utilizado para la transcripción *in vitro* del tmRNA.

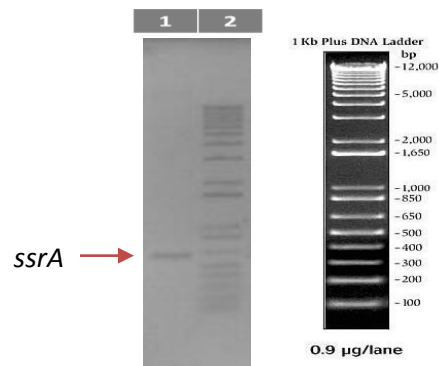


Figura 33. Amplificación del gen *ssrA*. Gel de agarosa al 1%, 80V 60 min. Carril 1: gen *ssrA*, carril 2: Marcador 1 Kb plus.

4.1.5.3. Transcripción del gen *ssrA* de *Mycobacterium tuberculosis* para la producción de tmRNA

El tmRNA transcrito bajo el control del promotor T7 tuvo un tamaño de 602 pb (Figura 34). El rendimiento por cada reacción de transcripción *in vitro* osciló entre 2 – 6 µg/µl. Este tmRNA fue utilizado en los ensayos de interacción con RpsA.

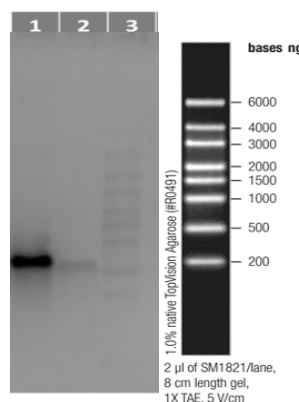


Figura 34. tmRNA del gen *ssrA* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Gel de agarosa al 1% en TBE 1X, 80V 60 min. Carril 1-2: tm RNA transcrito carril 3: Marcador Riboruler.

4.1.5.4. Evaluación de la interacción y competencia de tmRNA y POA por el sitio de unión en el RpsA

El tmRNA libre tiene una movilidad electroforética mayor con respecto al tmRNA unido al RpsA nativo (Figura 35, carril 1 y 2). Se evaluó la competencia de tmRNA y POA por RpsA nativo (Figura 35, carril 2 y 3) pero no se observa la competencia del POA con el tmRNA. El ensayo con las variantes de RpsA, genera la formación del complejo entre RpsA-tmRNA y ausencia de competencia (Figura 35, carril 4-9). Estos resultados difieren de los reportados previamente por Shi *et al.* (2011), Yang *et al.*

(2015), ya que no se observa el desplazamiento del tmRNA unido a RpsA en presencia del POA.

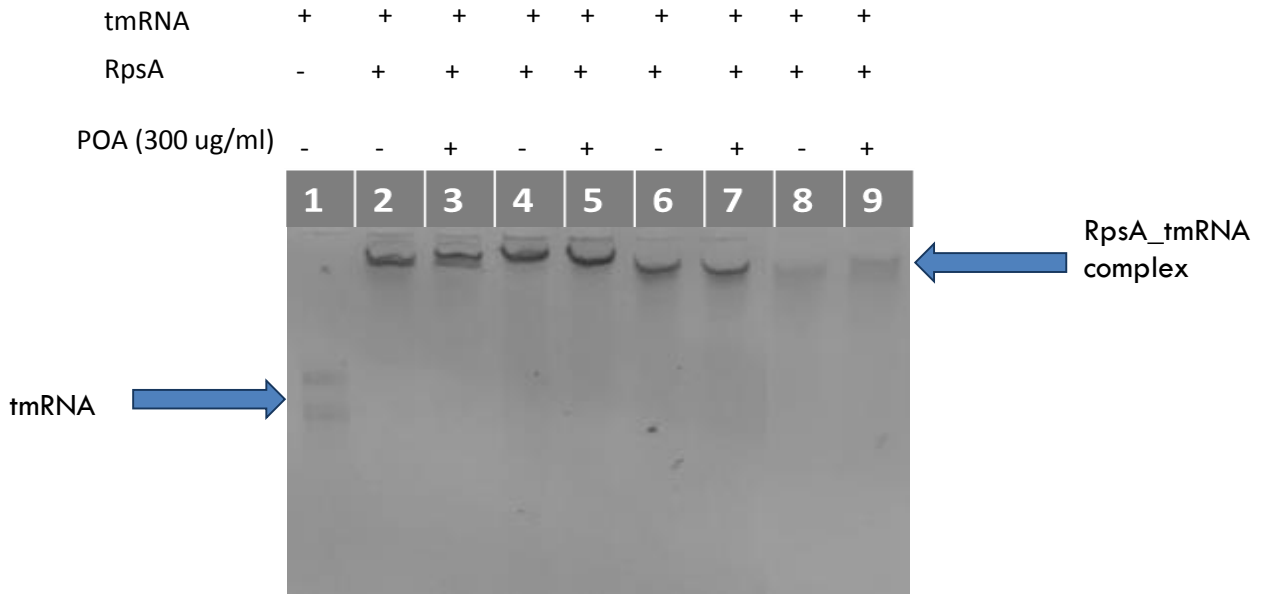


Figura 35. Competencia entre tmRNA y POA por RpsA (EMSA). Carril 1: tmRNA; carril 2-3: RpsA nativo; carril 4-5: RpsA Δ A438; carril 6-7: RpsA Δ A438_CUT1; carril 8-9: RpsA Δ A438_CUT3

Debido a que nuestros resultados difirieron de los antes reportados, se buscó medir el nivel de interacción (Kd) entre RpsA-POA y RpsA-tmRNA.

4.1.6. Evaluación de la interacción de las variantes de RpsA con POA y tmRNA mediante microcalorimetría de titulación isotérmica

En la evaluación de la interacción entre RpsA-tmRNA mediante ITC no se logró la saturación del sistema, ya que se requirieron altas concentraciones y volúmenes de ligando (tmRNA) (Figura 36), alcanzado estar en una relación 10:1 (ligando-receptor,

respectivamente). Sin embargo, la producción de calor ($\mu\text{cal}/\text{seg}$) al darse la interacción permite evidenciar algún grado de interacción entre RpsA-tmRNA.

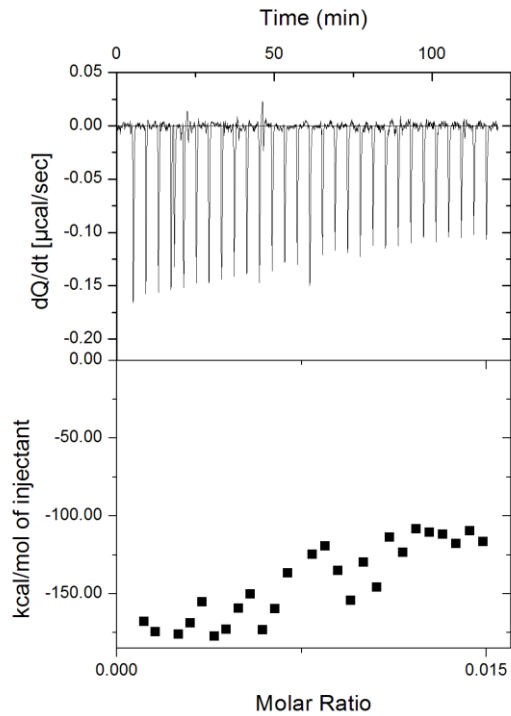


Figura 36. Parámetros termodinámicos de la interacción RpsA nativo - tmRNA determinado por ITC.

No se logró la saturación del sistema.

Por otro lado, en la evaluación de la interacción entre RpsA-POA se evidenció que el POA puede generar una señal por calor de dilución que afecta los parámetros termodinámicos cuando la corrección del pH no se ha realizado previo a su incorporación al sistema (Figura 37A). Con la corrección del pH en el buffer de dilución del POA, no se registró afinidad entre RpsA-POA tanto para la RpsA nativa como para la RpsA $\Delta A438$ (Figura 37 B-C). Se realizó la evaluación para las otras

proteínas recombinantes RpsA Δ Ala438_CUT1, RpsA Δ Ala438_CUT2, RpsA Δ Ala438_CUT3 donde tampoco se encontró interacción con POA (Anexo 02).

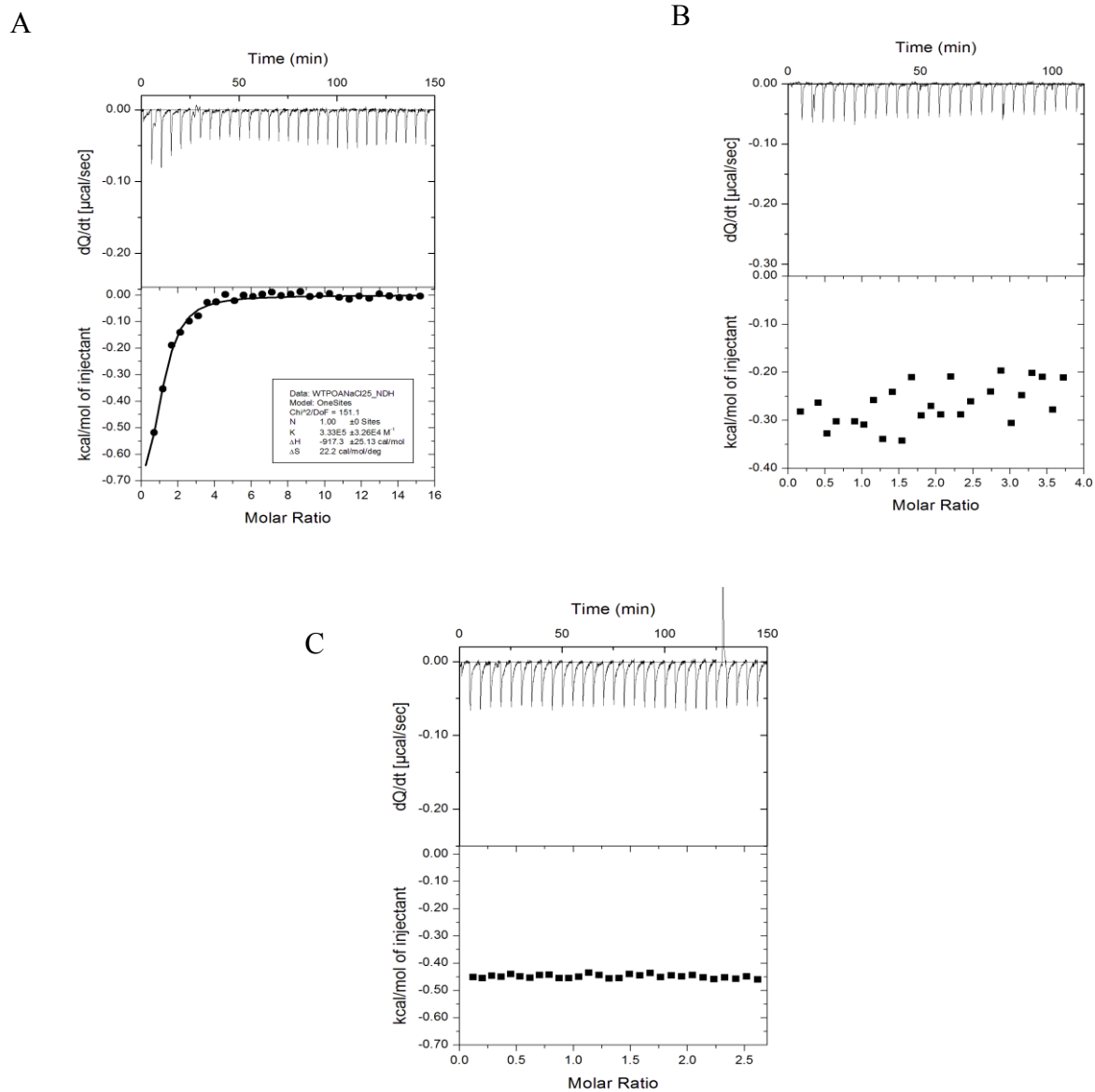


Figura 37. Evaluación de la interacción RpsA nativo-POA determinado por ITC. A-B: RpsA nativo, sin (A) y con (B) corrección de pH en el sistema y C: RpsA Δ A438.

4.1.7. Evaluación de la interacción entre RpsA y POA mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear

El espectro de ^1H del POA muestra dos picos (8.7 ppm y 9.07 ppm aproximadamente) y la señal de la proteína no interfiere con el espectro del POA (Figura 38). En este sentido se utilizaron tres metodologías por NMR para la determinación de la interacción de RpsA nativa con POA NMR-CSP, NMR-D y NMR- STD.

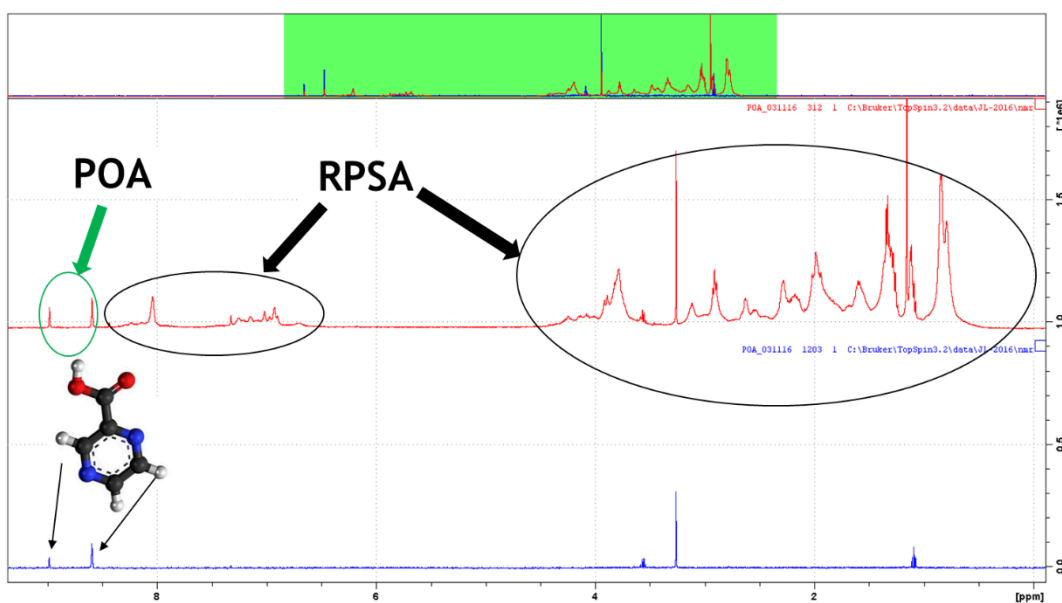


Figura 38. Espectro de NMR del ^1H en una dimensión de POA y RpsA. Espectro adquirido en 100 mM Buffer fosfato pH 6.4. Equipo de 500 MHz a 25°C supresión de agua usando esquema WATERGATE.

4.1.7.1 Perturbación del cambio químico (NMR-CSP)

En el NMR-CSP, al hacer la titulación con diferentes concentraciones de RpsA no se observó ninguna perturbación del desplazamiento químico, ni ensanchamiento significativo de la señal del espectro del POA (Figura 39).

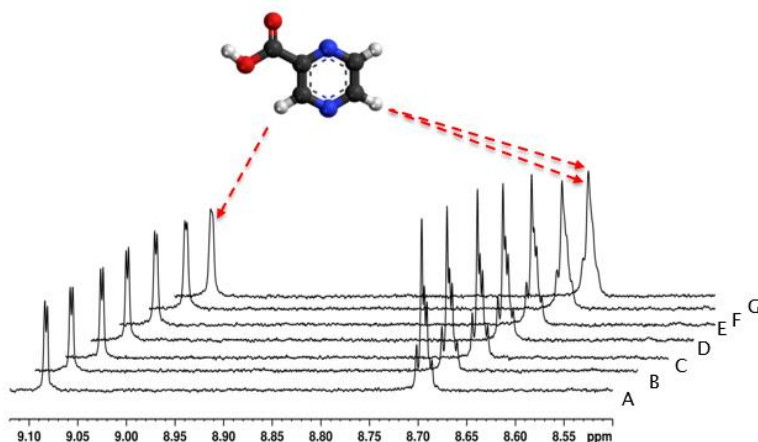


Figura 39. Espectro de NMR del ^1H en una dimensión de POA- CSP. Determinación de la afinidad entre RpsA nativo - POA por perturbación del cambio químico (NMR-CSP). Espectro adquirido en 100 mM Buffer fosfato pH 6.4. Equipo de 500 MHz a 25°C Supresión de agua usando esquema WATERGATE (Liu *et al*, 1998). A.100 μM POA, B.100 μM POA+ 6.6 μM RpsA. C.100 μM POA+ 13.1 μM RpsA. D.100 μM POA+ 26.3 μM RpsA. E.100 μM POA+ 52.5 μM RpsA. F.100 μM POA+ 157.5 μM RpsA. G.100 μM POA+ 315 μM RpsA.

Por otro lado, el ácido trimetilsilil propanoico (TSP) es usado como estándar de referencia interna para los ensayos de NMR en soluciones acuosas, inusualmente se halló una interacción entre RpsA nativa y el TSP, se observó interacción proteína ligando que conllevó a cambios importantes en el ambiente químico del TSP, por lo que se vio el cambio en su frecuencia de resonancia y en sus propiedades de relajamiento, que resultó en una variación del desplazamiento químico o el ensanchamiento de las señales (Anexo 3).

4.1.7.2 Difusión (NMR-D)

En la evaluación de la interacción mediante NMR-D (Figura 40), se determinó el coeficiente de difusión de RpsA nativo, POA y la difusión de POA en presencia de

RpsA (Figura 41, Tabla 05). El coeficiente de difusión del POA es $7.075 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$, mientras que el coeficiente de difusión del POA en presencia del RpsA es $6.995 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$, siendo estos muy similares, mientras que el coeficiente de difusión del RpsA es $1.437 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$.

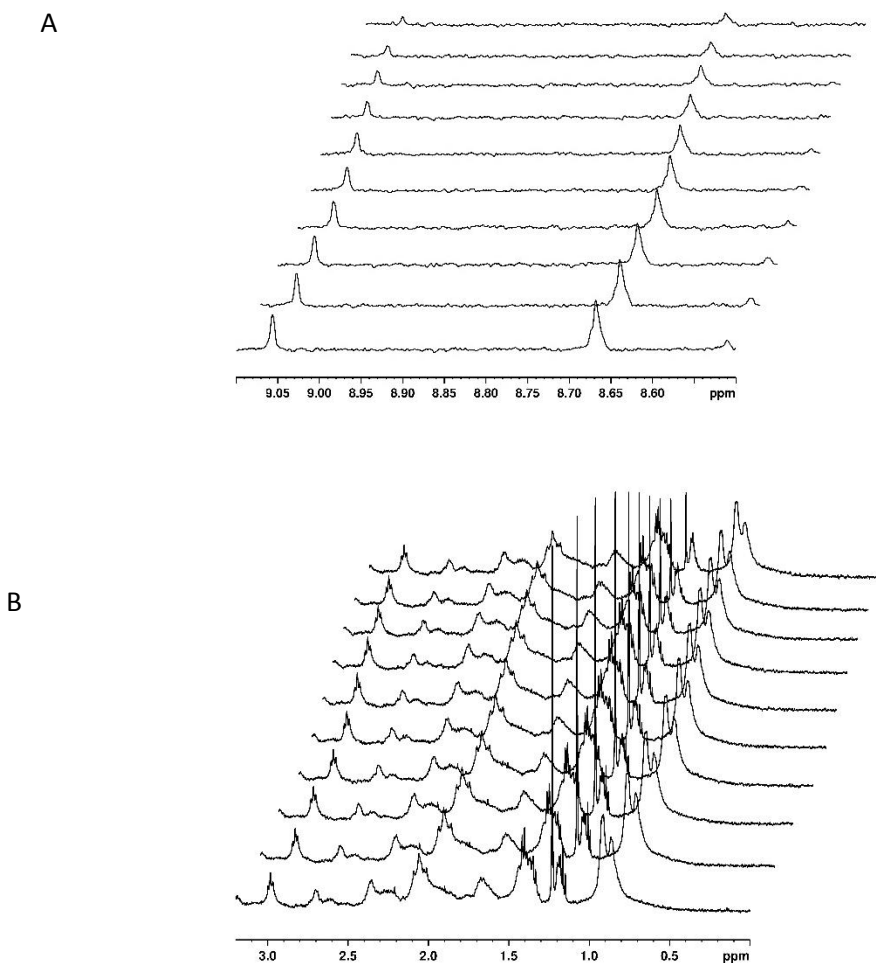


Figura 40. Espectro NMR-D del ^1H en una dimensión de POA (A) y RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* (B). Determinación de la afinidad entre RpsA nativo-POA por difusión (NMR-D). Espectro adquirido en 100 mM Buffer fosfato pH 6.4. Equipo de 500 MHz a 25°C Supresión de agua usando esquema WATERGATE (Liu *et al*, 1998). $\Delta=500$ ms, $\delta=600$ μs , $G_{\text{max}}=43.34$ gauss/cm. Los valores de la gradiente utilizados para el ensayo fueron 2.17, 6.50, 10.84, 15.17, 19.50, 23.84, 28.17, 32.51, 36.84, 41.17 gauss/cm, de abajo hacia arriba.

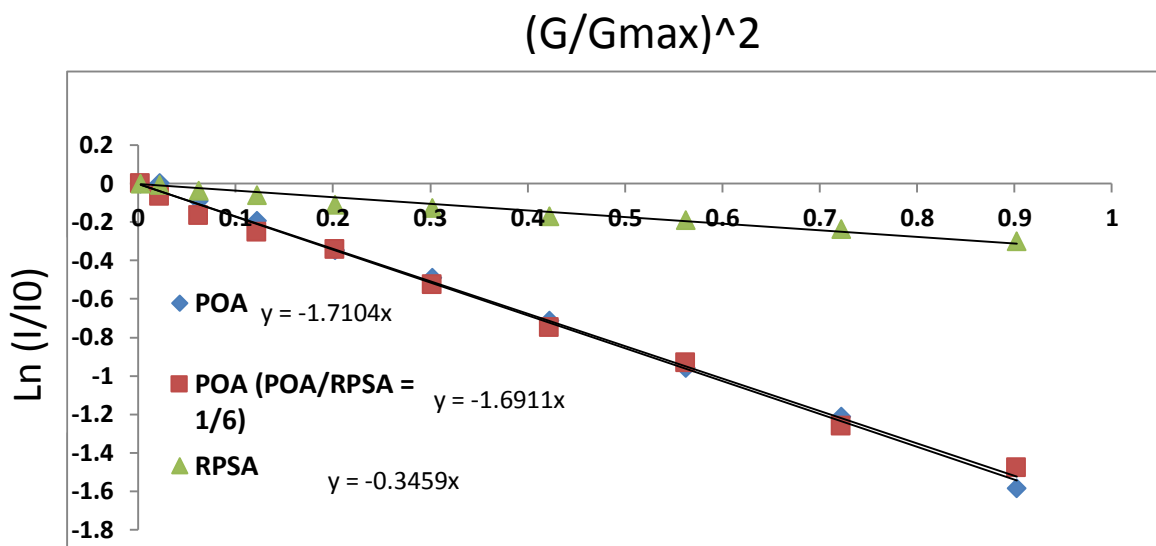


Figura 41. Determinación de la constante de difusión del RpsA nativo, POA y RpsA nativo-POA mediante NMR-D. $\Delta=500$ ms, $\delta=600$ μ s, $G_{max}=43.34$ gauss/cm.

Tabla 05. Constante de difusión y radio hidrodinámico del RpsA nativo, POA y RpsA nativo-POA mediante NMR-D. $\Delta=500$ ms, $\delta=600$ μ s, $G_{max}=43.34$ gauss/cm.

Molécula	Coefficiente de difusión (10^{-10} m ² /s)	Radio hidrodinámico (Ångström)
$D_{RpsA \text{ nativo}}$	1.437	17.0868
D_{POA}	7.075	3.4643
$D_{POA,f(RpsA)}$	6.995	3.5038

4.1.7.3 Diferencia de la transferencia de saturación (NMR-STD)

El último método de NMR para la evaluación de la interacción entre RpsA –POA, fue mediante STD, no se halló interacción entre RpsA nativa y POA, como se muestra en la figura 42, la señal del POA ante la saturación selectiva del RpsA se mantiene invariable (línea roja).

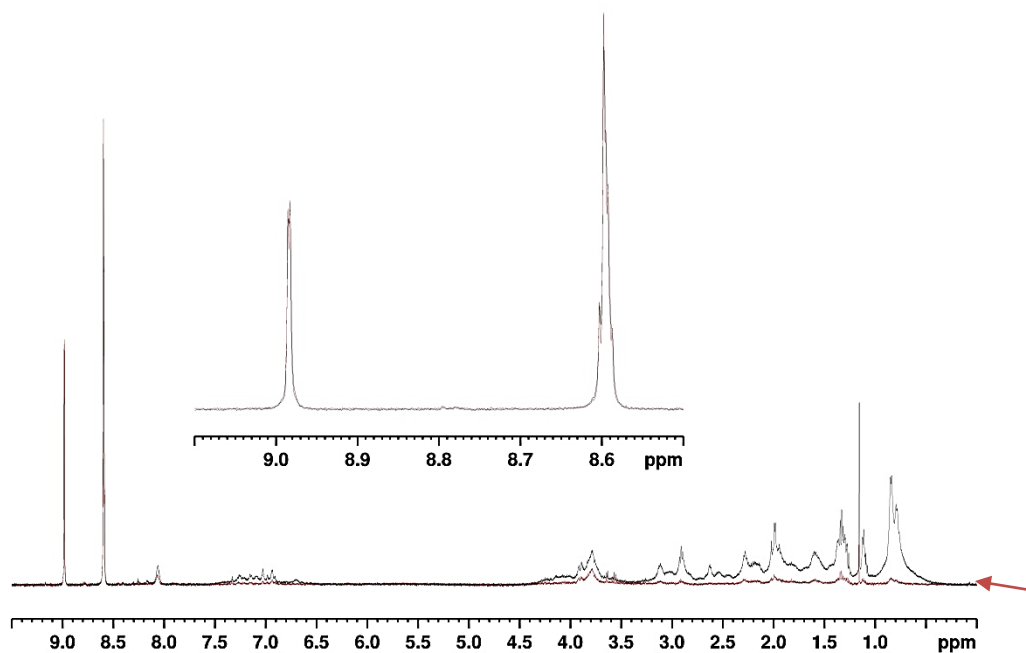


Figura 42. Espectro NMR del ^1H en una dimensión de RpsA-POA-STD. Determinación de la afinidad entre RpsA nativo de *Mycobacterium tuberculosis* -POA (500 μM -50 μM) por diferencia de transferencia de saturación (NMR-STD). Espectro adquirido en 100 mM Buffer fosfato pH 6.4. Equipo de 500 MHz a 25°C supresión de agua usando esquema WATERGATE (Liu *et al.* 1998). $\Delta=500$ ms, $\delta=600$ μs , $G_{\text{max}}=43.34$ gauss/cm. La flecha indica el espectro irradiado selectivamente.

4.1.8. Evaluación de la interacción del tmRNA y RpsA mediante termoforesis a microescala

Debido a que el POA no pudo desplazar al tmRNA de su interacción con RpsA, se determinó cuantitativamente la afinidad entre RpsA nativo –tmRNA, obteniendo una constante de disociación de 58.1 nM (Figura 43). Debido a la disponibilidad del equipo y reactivos se realizó un solo ensayo.

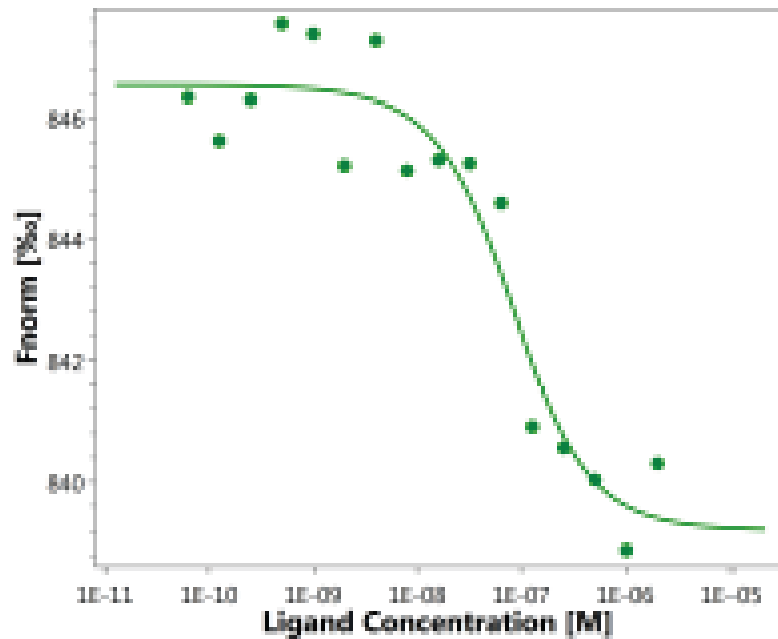


Figura 43. Evaluación de la interacción entre RpsA nativo (Red-tris-NTA) y tmRNA por MST.

Kd= 58.1 nM. Monolith NT.115 pico

4.1.9. Efecto de la adición del RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* en el ribosoma de *Escherichia coli* sobre la traducción de proteínas *in vitro*

La eficiencia traduccional del complejo ribosomal de *E. coli* luego de agregar la RpsA nativa de MTB, no tienen ninguna diferencia significativa comparada con la eficiencia traduccional del complejo ribosomal de *E. coli* nativo ($P > 0.005$) (Figura 44). Por el contrario, la eficiencia traduccional del complejo ribosomal de *E. coli* luego de agregar la RpsA mutada ($\Delta A438$) de MTB, se asocia a una disminución significativa de la actividad traduccional comparada con el complejo ribosomal de *E. coli* nativo ($P < 0.005$).

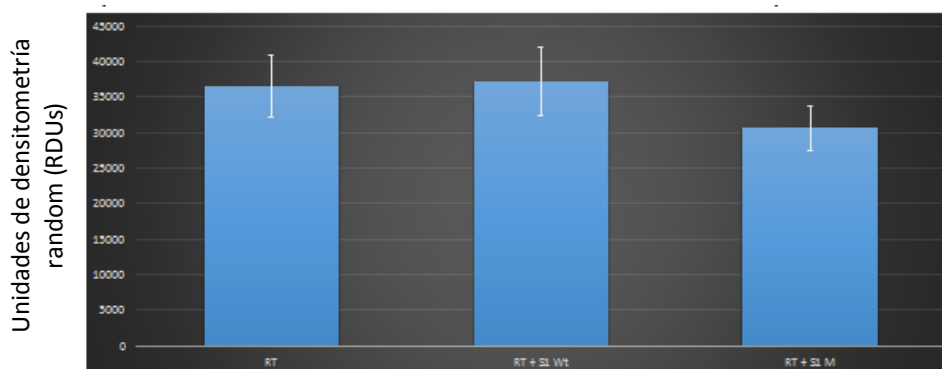


Figura 44. Efecto de la adición de RpsA de MTB en la traducción *in vitro* del gen malato deshidrogenasa de *Escherichia coli* en un sistema libre de células. Traducción regular (RT), RT con RpsA nativo (RT+S1 WT^a), RT con RpsA $\Delta A438$ (RT+S1 M^b)^b $p < 0.005$

5. DISCUSIÓN

La PZA es la única droga que puede matar bacterias en estado de latencia, estado en que las micobacterias se adaptan a las condiciones nocivas provocadas por el sistema inmune del hospedero infectado. Entre los mecanismos de adaptación se puede plantear la reducción o expresión diferencial de su metabolismo, activación de genes de dormancia entre otros mecanismos (Warner 2015).

En un estudio reciente, Shi *et al.* (2011), plantearon que la PZA estaría inhibiendo el mecanismo de trans-traducción o salvataje de ribosomas. En dicho estudio se planteó que el tmRNA estaría siendo desplazado por el POA, durante su interacción con el RpsA, inhibiendo letalmente el mecanismo de la trans-traducción, esta hipótesis se presentaba como nuevo mecanismo de acción de la PZA. En el mismo año, Andini y Nash postularon que en micobacterias en estado de latencia, el mecanismo de trans-traducción resultaría vital para el adecuado funcionamiento de su maquinaria. Es conocido que, como se ve reflejado en el genoma de MTB donde están presentes los genes *ssrA* y *smpB* (para la producción de tmRNA y SmpB, respectivamente), sugiriendo un sistema funcional de marcaje por el tmRNA (Tyagi and Kinger 1992; Cole *et al.* 1998), por lo que estos genes podrían verse involucrados de manera indirecta con el mecanismo de acción y resistencia planteado por Shi *et al.* (2011). Moore y Sauer (2005) previamente reportaron que *Mycobacterium smegmatis*, una micobacteria atípica, naturalmente resistente a PZA y utilizada como modelo de estudio del género *Mycobacterium*, presenta entre 500-1000 copias de tmRNA por célula, una relación de

1:10 o 1:20 tmRNA-ribosomas, respectivamente, por lo cual es un modelo natural para evaluar estudios relacionados con la trans-traducción en micobacterias.

En el mismo estudio de Shi *et al.* (2011), se reportó la delección Δ Ala438 ubicada en el extremo C-terminal altamente flexible de la proteína RpsA de MTB en una cepa clínica. Esta mutación estaba asociada a un cambio en el fenotipo de la micobacteria, volviéndola resistente a PZA.

En base a este hallazgo, en el presente estudio buscamos investigar y comprender el efecto de la delección Δ Ala438 en la conservada proteína RpsA (Duan *et al.* 2015) y su relación con el mecanismo de resistencia a PZA.

Nuestra primera hipótesis asumía que la mutación Δ Ala438 favorecía un tipo de movimiento del extremo C-terminal no-estructurado, siendo de este modo capaz de bloquear el ingreso del POA al sitio de unión en la RpsA por medio de un impedimento estérico. Nuestra segunda hipótesis se basó en que la Δ Ala438 podría generar un cambio conformacional a distancia en el sitio de unión al POA, limitando así la interacción de esta molécula.

Los resultados de este estudio, relacionados a las simulaciones *in silico* mostraron que Δ Ala438 en el extremo C-terminal del RpsA puede generar un cambio en la flexibilidad y en la distribución del movimiento de esta región. Teóricamente, identificamos 13 péptidos con una alta afinidad con el sitio de interacción propuesto para el RpsA-POA (Lys303, Phe307, Phe310 y Arg357) a partir del cristal obtenido por Yang *et al.* (2015). Las simulaciones de dinámica molecular del extremo C-terminal no estructurado,

mostraron que 6 péptidos (pep6, pep8, pep 20, pep21, pep34 y pep36) podían potencialmente generar un impedimento estérico en dos sitios de unión a POA. Por lo tanto, los resultados de la simulación *in silico* favorecían a la hipótesis de un impedimento estérico causado por la delección Δ Ala438, la cual a través de la alteración de la movilidad del extremo no estructurado estaría bloqueando el ingreso del POA a los sitios de interacción. Nuestros resultados *in silico* también mostraron que el comportamiento de la estructura altamente flexible variaba en presencia o ausencia de Δ Ala438.

En base a la secuencia de los péptidos potencialmente responsables de unirse al sitio de unión al POA, se diseñó, sintetizó y expresó proteínas recombinantes de RpsA Δ A438 con los extremos C- terminal truncados (RpsA Δ Ala438_CUT1 (468 aa), RpsA Δ Ala438_CUT2 (454 aa), RpsA Δ Ala438_CUT3 (440 aa), Figura 24 – 29), con la finalidad de limitar el alcance del extremo no-estructurado al sitio de unión del POA y de esta manera recuperar la capacidad del POA de poder unirse al RpsA (antes supuestamente perdida como consecuencia de la delección Δ Ala438). De esta manera, la cepa resistente, debería volverse susceptible a PZA.

Es importante destacar que durante la purificación de RpsA, hallamos que esta proteína co-purificaba con ácidos nucleicos. Esto fue evidenciado al correr un PAGE nativo al 5% y ser teñido con bromuro de etidio, similar registro fue hallado en RpsA de *E. coli* *in vivo* con el complejo tmRNA-SmpB sobreexpresado (Karzai and Sauer 2001). Luego del tratamiento con DNasa y RNase confirmamos que los ácidos nucleicos asociados a la proteína RpsA observados eran RNA. A partir de este momento, en todos nuestros ensayos siguientes, tuvimos la precaución de que previo a la purificación, la

fracción soluble que contenía la proteína RpsA fuera siempre incubada con RNase para evitar cualquier interferencia en los ensayos posteriores. Es interesante destacar que este paso no ha sido previamente reportado en los ensayos realizados por Shi *et al.* (2011) ni Yang *et al.* (2015).

Durante el ensayo de EMSA para evaluar la interacción entre RpsA-tmRNA, se usaron todas las proteínas recombinantes generadas en este estudio, observándose que todas las proteínas recombinantes inclusive las proteínas truncadas que contenían la delección Δ Ala438 (RpsA Δ Ala438_CUT1, RpsA Δ Ala438_CUT2, RpsA Δ Ala438_CUT3) tenían similar afinidad con respecto a la proteína RpsA nativa y RpsA Δ Ala438, estos resultados indican que el extremo C-terminal de RpsA no participa en la interacción con el tmRNA. El segundo objetivo de este experimento fue evaluar la competencia del POA con el tmRNA por el RpsA, nuestros resultados indican que el POA no compite con el tmRNA, ya que no se observó desplazamiento del tmRNA unido a RpsA en presencia de POA, contradictoriamente a lo reportado previamente (Shi *et al.* 2011; Yang *et al.* 2015).

Con los resultados obtenidos orientamos el estudio hacia la evaluación y comparación del grado de interacción entre RpsA-POA y RpsA-tmRNA. Los métodos empleados fueron ITC, MST y NMR.

Al realizar la medición de la interacción entre RpsA nativo y POA por ITC se obtuvieron resultados interesantes, ya que en la primera medición se registró una variación en la cantidad de calor del sistema de - 917.3 +/- 25.13 cal/mol que en principio podrían representar una posible interacción. Sin embargo, considerando que la energía de un puente de hidrógeno varía entre 1-40 Kcal/mol (Connelly *et al.* 1993;

Steiner 2002), los parámetros termodinámicos no correspondían a una unión específica entre estas moléculas sino más bien posiblemente a un diferencial del calor de dilución. Sorprendentemente, al realizar la corrección en el pH en el stock del POA, ya no se volvió a registrar este fenómeno y tampoco se registró interacción entre RpsA nativa y POA. A estas alturas del estudio, nuestros resultados mostraban evidencia en abierta contradicción con los resultados publicados por Shi *et al.*

En una reciente publicación en la revista Nature (2017) se publicaron resultados similares a los nuestros. En dicho estudio evaluaron la interacción entre RpsA-POA mediante ITC, y no encontraron interacción detectable (Dillon *et al.* 2017). En su lugar, reportaron que cuando el POA es titulado en 10 mM de buffer fosfato, se generaba una señal de calor producto de la disociación del protón del POA, lo cual ocurría incluso en ausencia de RpsA. Este calor ya no se detectaba, cuando se hacía la corrección, llevando el buffer en el que se encontraba el POA al mismo pH que el buffer de interacción.

La conclusión de esta parte del estudio, muestra que no existe interacción detectable entre POA y RpsA, así como con las variantes truncadas de RpsA $\Delta A438$ hacia el C-terminal (Anexo 2).

Otra técnica utilizada para la evaluación de la interacción RpsA-POA fue NMR. La principal ventaja del NMR, es que es una técnica muy sensible y puede detectar diferentes rangos de afinidades desde el orden nM hasta mM. Dependiendo de esto analizamos el problema de interacción con las técnicas específicas de NMR-CSP, NMR-D o NMR-STD.

Es importante destacar, que la técnica de NMR aplicada a nuestro problema en particular, se pudo utilizar sin necesidad de marcar la proteína. Esto se debe a que la señal de POA se encuentra alejada de la señal del RpsA y los picos se pudieron diferenciar en el espectro total de una mezcla RpsA-POA con el uso de la técnica watergate o supresión de solvente (Liu *et al.* 1998).

Utilizando el NMR-CSP, no se encontró interacción detectable entre RpsA nativa – POA. Por esta razón se evaluó mediante la técnica NMR-D, la cual es más sensible que NMR-CSP, y se basa en la medición del coeficiente de difusión. Para este ensayo, en el caso que POA interaccionara con RpsA, POA adoptaría el coeficiente de difusión de RpsA, y esta diferencia sería detectada. Nuestros resultados mostraron que la difusión de POA libre, así como en presencia de RpsA se mantuvo similar, indicando con estos datos que POA no estaría formando un complejo con el RpsA. Cabe destacar, que a partir de la información obtenida en los ensayos se pudo calcular por primera vez el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico del RpsA y el POA.

En un último intento para determinar si POA se unía con alguna afinidad a RpsA se aplicó la técnica NMR-STD, que consiste en la saturación de la proteína por irradiación selectiva hasta que su señal se viera anulada, en donde además, todo ligando que forme complejo con la proteína, aún así sea de baja afinidad (kd en el rango μM o mM), su señal (del ligando) también se vería saturada. Notablemente, el resultado fue consistente y no se observó la saturación del POA indicando que no hay interacción detectable entre RpsA nativo y POA. En conclusión, los ensayos NMR no encuentran

evidencia de una notable interacción entre POA y RpsA, apoyando la hipótesis de que el POA no inhibe la trans-traducción y RpsA no es target de POA.

En conclusión nuestros resultados experimentales son robustos y consistentes entre si para las distintas técnicas empleadas y contrastan con lo reportado por Shi *et al.* 2011 y Yang *et al.* 2015 quienes reportaron interacción entre RpsA nativa y POA con un $K_d = 0.13 \mu\text{M}$ y $2.81 \mu\text{M}$ respectivamente. Por el contrario, nuestros resultados son similares; a los obtenidos por el grupo de Dillon *et al.* (2017), sugiriendo que el calor reportado por Shi y Yang es un artefacto ocasionado por la disociación del protón de POA y por una inadecuada elección del buffer utilizado en el ensayo de ITC.

Por otro lado, se hicieron ensayos para evaluar el grado de interacción entre RpsA y tmRNA, lo cual está biológicamente comprobado. Para estas mediciones usamos las técnicas de MST e ITC. En nuestro estudio identificamos una interacción y estimamos la constante de afinidad entre RpsA nativa (con sus cuatro dominios S1 y el C-terminal) y tmRNA de MTB en $1.72 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor de afinidad medido es muy cercano al reportado entre RpsA y tmRNA de *E. coli*, los cuales interactúan *in vitro* con una constante de afinidad $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Wower *et al.* 2000). Otros estudios han analizado la interacción entre la variante de RpsA (solamente el cuarto dominio y el extremo C-terminal) y sMLD del tmRNA de MTB (Fan *et al.* 2017), y han estimado una constante de afinidad de $23.56 \pm 5.74 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Es importante resaltar que en nuestro estudio tuvimos una limitación durante el ensayo para estimar la constante de afinidad mencionada. La medición por MST fue realizada solamente en un único ensayo, debido a la limitada disponibilidad del equipo, ubicado

en la Universidad de Concepción-Chile. Por su parte, durante el ensayo de ITC, el equipo estuvo ubicado en la Universidad John Hopkins-USA, y durante el ensayo no se logró saturar el sistema debido a que la cantidad de tmRNA fue insuficiente con respecto a la proteína RpsA.

Hasta la fecha en el Perú no existe ningún equipo que sea capaz de medir interacciones moleculares, con excepción del sistema NMR disponible en la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Nuestros resultados *in silico* indicaron inicialmente interacción entre RpsA-POA, a partir del cristal del cuarto dominio S1 de RpsA de MTB (4NNG, Yang *et al.* 2015). Sin embargo, estos resultados contrastaron con nuestros propios resultados experimentales. Una posibilidad de esta discrepancia es que en nuestros ensayos experimentales *in vitro*, nosotros trabajamos con la proteína RpsA completa (cuatro dominios S1 y C-terminal). Es importante destacar que las razones por las que en las simulaciones *in silico* se utilizó únicamente un dominio S1, primero por la disponibilidad de cristales en el banco de datos de proteínas de RpsA de MTB, segundo debido a la capacidad computacional disponible en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular no es suficiente para simular la RpsA completa en un tiempo razonable.

A pesar de los resultados experimentales, era incierto si la mutación $\Delta A438$ podía generar algún efecto en la actividad de RpsA, por ello realizamos un experimento piloto de traducción *in vitro* en un sistema libre de células con ribosomas purificados de *E. coli*. Para esto, se partió de la premisa que RpsA en *E. coli* se une débil y reversiblemente hacia el extremo anterior de la subunidad ribosomal 30S, con una

constante de unión aparente de 20 nM como ha sido medido anteriormente (Draper and Von Hippel 1979). Estudios previos han demostrado que RpsA foráneo añadido a una solución de ribosomas purificados de *E. coli* podría incorporarse en el complejo ribosomal reemplazando al RpsA nativo y formando así un complejo ribosomal quimérico (Draper and Von Hippel 1979; Tsuji and Ichihashi 2017).

Luego de agregar el RpsA de MTB en ribosomas purificados de *E. coli*, de manera interesante se encontró que la eficiencia de la traducción en presencia de RpsA nativo de MTB se comporta de manera similar al sistema control; sin embargo cuando se añade el RpsA Δ Ala438 de MTB, la eficiencia de la traducción disminuye significativamente ($p < 0.005$). Esto sugiere que la delección Δ Ala438 en el extremo C-terminal de la proteína RpsA de MTB, podría estar causando una alteración en la eficiencia de la maquinaria de traducción de proteínas. Este resultado no es concluyente y necesita ser analizado con mayor profundidad para explorar los detalles del mecanismo y el efecto de la delección mencionada.

Finalmente, en los últimos años se ha tratado de relacionar mutaciones en RpsA y la resistencia a PZA, en base a los planteamientos discutidos previamente. El secuenciamiento de este gen ha generado evidencia de mutaciones tanto en cepas sensibles como en cepas resistentes. Existe un gran número de mutaciones en RpsA reportados en cepas susceptibles a PZA (Q162R, D37A, K45E, L53V, A112T; I26L, I26V, E67V, G214V, N221H; K45Q, E197K, V254G, V260I, D268N, E405K, M432T) y en cepas resistentes (R474W, R474L, E433D, K45N, I101T, Y164C, Δ Ala437, L138R, S151P, K167N, L185P, INSER C193, E201G, R212W, K213Q, G214S, G229A, H244Q, R289L, S324P, V338A, G341S, INSERT G341, A376E,

A412V, E413Q, D446A, S450T; R212R, M432T, F310F; K45E) (Tan *et al.* 2014, Xia *et al.* 2015; Gu *et al.* 2015; Ramirez *et al.* 2017; Werngren *et al.* 2017), y son muy pocas aquellas que hayan sido encontradas y se muestren asociadas de manera consistente con la resistencia a PZA. Entre todas las mutaciones registradas, la mutación encontrada previamente por Shi *et al.* (2011) Δ Ala438 no se ha reportado en ninguna otra cepa clínica, por lo que el mecanismo de resistencia propuesto no podría ser generalizable.

Por lo tanto, aún es incierta la relación de las mutaciones en RpsA y la resistencia a PZA (Alexander *et al.* 2012; Akhmetova *et al.* 2015) por lo que se necesita mayores investigaciones en el futuro.

Adicionalmente, Dillon *et al.* (2017) reportó que la sobreexpresión de RpsA no confiere resistencia a PZA en contraste con lo publicado previamente (Shi *et al.* 2011, Peñuelas *et al.* 2013) y que la Δ Ala438 no confiere resistencia a PZA, que fue demostrado mediante intercambio alélico en una cepa de laboratorio H37Ra, cepa susceptible a PZA, en la que no se encontró diferencias significativas en la concentración mínima inhibitoria (MIC) con respecto al MIC de la cepa nativa.

En conclusión, nuestros resultados experimentales muestran evidencia de una falta de interacción detectable entre RpsA nativa y POA, sugiriendo que posiblemente RpsA no está involucrado en el mecanismo de acción de la PZA en MTB.

6. CONCLUSIONES

- RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* posiblemente no es un blanco de PZA, ya que no se encontró interacción detectable entre RpsA nativo y POA.
- La delección $\Delta A438$ en RpsA de *Mycobacterium tuberculosis* no está involucrada en la resistencia a PZA, no se encontró interacción detectable.
- La interacción entre RpsA nativo-tmRNA de *Mycobacterium tuberculosis* no puede ser desplazada por el POA bajo las condiciones de trabajo del presente estudio, por lo que se plantea que RpsA no es target del POA.
- La proteína RpsA $\Delta A438$ interactuó con el tmRNA de manera similar a la proteína RpsA nativa, del mismo modo RpsA $\Delta A438$ CUT1, RpsA $\Delta A438$ CUT2, RpsA $\Delta A438$ CUT3, evidenciando que la interacción entre RpsA-tmRNA no es afectada por mutaciones o deleciones en el extremo carboxilo terminal de RpsA.
- La proteína RpsA $\Delta A438$ de *Mycobacterium tuberculosis* al ser incorporada en un sistema de traducción *in vitro* de *Escherichia coli* afecta la eficiencia traduccional, comparado a RpsA nativa de *Mycobacterium tuberculosis* y la traducción regular.

7. RECOMENDACIONES

La evidencia encontrada sobre la falta de afinidad entre RpsA de MTB y POA, sugieren que el POA no tendría a RpsA como blanco terapéutico, y por lo tanto el mecanismo de trans-traducción no parecería estar asociado a la resistencia a PZA en MTB.

Es por lo tanto importante seguir investigando en la búsqueda de posibles blancos terapéuticos de esta droga en MTB.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abagyan RA, Totrov MM and Kuznetsov DA (1994) ICM: A New Method for Protein Modeling and Design: Applications to Docking and Structure Prediction from The Distorted Native Conformation *J. Comp. Chem.* 15, 488-506.
2. Ahmad S (2011). Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. Review Article. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2011.
3. Alexander D, Ma J, Guthrie J, Balir J, Chedore P and Jamieson F (2012). Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis a role for pncA but not rpsA. *J. clin. Microbiol.* 50.
4. Almeida P and Palomino J (2011). Molecular basis and mechanism of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 66: 1417-1430.
5. Andini N and Nash K (2011). Expression of tmRNA in mycobacteria is increased by antimicrobial Agents that target the ribosome. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Sep; 322(2): 172–179.
6. Angulo J and Nieto P (2011). STD: application to transient interactions between biomolecules- a quantitative approach. *Eur Biophys J* 40.
7. Barry C, Boshoff H, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ and Young D (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies” *Nature reviews Microbiology*, vol7 N°12.

8. Bhuj S, Fonseca Lde S, Marsico AG, de Oliveira Vieira GB, Sobral LF, Stehr M, Singh M, Saad MH (2013). Mycobacterium tuberculosis isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the pncA gene. *Infect Genet Evol.* Oct;19:1-6.
9. Boni I, Isaeva D, Musychenko M, and Tzareva N (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* Jan 11; 19(1): 155–162.
10. Bromberg K A (2003). Garland Science, ed. *Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology.*
11. Budavari S (1989). The Merck index online. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
12. Connelly P, Aldape R, Bruzzese F, Chambers S, Fitzgibbon M, Fleming M, Itoh S, Livingston D, Navia M, Thomson J and Wilson K. (1994). Biophysics Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 1964-1968.
13. Cook G, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox R, Danilchanka O and Niederweis M (2009). Physiology of Mycobacteria. *Adv Microb Physiol.* 2009. 55:81-319.
14. Dillon N, Peterson N, Feaga H, Keiler K, and Baughm A. (2017). Anti-tubercular activity of pyrazinamide is independent of trans-translation and RpsA. *Scientific Reports* 7, Article number: 6135.

15. Dillon N, Peterson N, Rosen B and Baughn A (2014). Pantothenate and Pantetheine Antagonize the Antitubercular Activity of Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 7258–7263 December 2014 Volume 58 Number 12.
16. Draper DE and von Hippel PH (1979). Interaction of Escherichia coli ribosomal protein S1 with ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Mar; 76(3): 1040–1044.
17. Duan H, Liu G, Wang X, Fu Y, Liang Q, Shang Y, Chu N and Huang H. (2015). Evaluation of the Ribosomal Protein S1 Gene (rpsA) as a Novel Biomarker for Mycobacterium Species Identification. *BioMed Research International*. Volume 2015.
18. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282:677–86.
19. Ehlers S and Schaible U (2013). The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*. Volume 3, article 411.
20. Fernandez-Recio J, Totrov M, and Abagyan R. ICM-DISCO (2003) Docking by Global Energy Optimization with Fully Flexible Side-Chains Proteins 52:113-117.
21. Fielding L (2003). NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(1):39-53.

22. Fyfe P, Rao V, Zemia A, Cameron S and Hunter W (2009). Specificity and mechanism of *Acinetobacter baumannii* nicotinamidase; implications for activation of the front line TB drug pyrazinamide. *Angew Chem Int Ed Engl*; 48(48): 9176–9179.
23. Gaudreault M, Gingras M, Lessard M, Leclerc S and Guérin S (2009) Electrophoretic Mobility Shift Assays for the Analysis of DNA-Protein Interactions. *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein interactions*. Vol 543. Humana Press, a part of Springer Science, Business Media. Tom Moss and Benoît Leblanc (eds.).
24. Gu Y, Yu X, Jiang G, Wang X, Ma Y, Li Y, Huang H. (2015). Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with *pncA*, *rpsA*, and *panD* gene mutations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
25. Hellman L and Fried M (2007). Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for detecting protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat Protoc* 2(8): 1849-1861.
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/137336/9789243548906_spa.pdf;j
26. Humphrey W, Dalke A and Schulten K (1996). “VMD- Visual Molecular Dynamics”, *J Molec. Graphics*. Version 1.9.2.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>.
27. Janssen B and Hayes C (2012). The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 86:151-91.

28. Karzai W and Sauer R (2001) Protein factors associated with the SsrA SmpB tagging and ribosome rescue complex A. PNAS March 13, 2001 vol. 98 no. 6.
29. Kaufmann M, Klinger C and Savelsbergh A (eds.) (2017). Functional Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1654, Chapter 10.
30. Kerssebaum R. (2002-2006). DOSY and Diffusion by NMR. NMR application Lab. Bruker Bio spin GmbH. Germany. A tutorial for TopSpin 2.0.
31. Kitakawa M and Isono K (1982). An amber mutation in the gene rpsA for ribosomal protein S1 in Escherichia coli. Mol Gen Genet, 185 (3): 445-7.
32. Kurita D, Muto A and Himeno H (2011). tRNA/mRNA mimicry by tmRNA and SmpB in trans-translation. Journal of Nucleic Acids. Vol 2011. Article ID 130581.
33. Laborde J, Deraeve C, and Bernardes-Genissona V (2017). Update of antitubercular prodrugs in a molecular perspective: mechanisms of action, bioactivation pathways and associated resistances. ChemMedChem 10.1002/cmdc.201700424
34. Leavitt S and Freire E (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. Current Opinion in structural Biology 11:560-566.
35. Liu W, Chen J, Shen Y, Jin J, Wu J, Sun F, Wu Y, Xie L, Zhang Y, Zhang W (2017). Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance

among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Hangzhou, China, *Clinical Microbiology and Infection*.

36. Liu M, Xi-an Mao, Chaohui Ye, He Huang, Nicholson J and Lindon J (1998). Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *Journal of magnetic resonance* 132, 125–129 (1998). Article N° MN981405
37. Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J and Schafer F (2009). Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review Helena Block,* *Methods in Enzymology*, Volume 463 # 2009 Elsevier Inc. ISSN 0076-6879.
38. Mayer M and Meyer B (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, No. 12.
39. Moore S and Sauer R (2005). Ribosome rescue: tmRNA tagging activity and capacity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 58:456-466.
40. Morris G and Lim-Wilby M (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol.* 443: 365-82.
41. Nanotemper Technologies: <https://nanotempertech.com>
42. Novagen (2003). pET System Manual. 10th edition. www.novagen.com
43. Peñuelas-Urquides K, González-Escalante L, Villareal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Gutiérrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinoza R, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa L, Molina-Salinas GM, Dávila-Verderrain F, Bermúdez de León M, and Said-Fernandez S (2013). Comparison of gene Expression Profiles

- between Pansensitive and Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol.* 2013 Sep;67(3):362-71.
44. Personne Y and Parish T (2013). *Mycobacterium tuberculosis* possesses an unusual tmRNA rescue system. *Tuberculosis (Edinb)*. 94(1):34-42.
45. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W (2011) Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *Plos One* 6: e15785-e15785.
46. Ramirez S, Rodwell T, Fink L, Catanzaro D, Jackson R, Pettigrove M, Catanzaro A and Valafar F. (2017). A Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase, RpsA, and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M/ XDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports* 7: 3790.
47. Requena D. <https://github.com/davidrequena/multifastats>
48. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. (2009) Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med* 6(2): e1000002. <http://www.tbdreamdb.com>
49. Seiner D, Hegde S and Blanchard J (2010). Kinetics and Inhibition of Nicotinamidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* November 9; 49(44): 9613–9619.
50. Sheen P, Lozano K, Gilman R, Valencia H, Loli S, Fuentes P, Grandjean L and Zimic M (2013). *pncA* gene expression and prediction factor on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*.

51. Shi W, Zhang X, Jiang X, Ruan H, Barry 3rd C, Wang H, Zhang W, and Zhang Y (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science* 2011 Sep 16;333(6049):1630-2.
52. Shi W, Chen J, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng X, Zhang W and Zhang Y (2014). Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes and Infections* 3, e58;
53. Simons S, Van Ingen J, Van der Laan T, Mulder A, Dekhuijzen P, Boeree M and Soolongen D (2012). Validation of *pncA* gene sequencing in combination with mycobacterial growth indicator tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Clin. Microbiol* 50.
54. Steele MA and Des Prez RM. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest*. 1988 Oct;94(4):845-50.
55. Steiner T (2002). The Hydrogen Bond in the Solid State. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 48 ± 76.
56. Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, Chen J, Yang F, Zhang K, Tan S and Zhao Y (2013). Role of *pncA* and *rpsA* Gene Sequencing in detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. Volume 52, number 1.
57. Thermo scientific (2014). High recovery resins for high-performance protein desalting <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602753-Zeba-Desalting-Brochure.pdf>

58. Tsuji S and Ichihashi N (2017). Translation activity of chimeric ribosomes composed of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* or *Geobacillus stearothermophilus* subunits. *Biochem Biophys Res.*10:325-328.
59. Velazquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S and Freire E (2004). *Current protocols in Cell Biology. Macromolecular Interactions in Cells. Chapter 17.*
60. Warner D (2015). *Mycobacterium tuberculosis Metabolism. Cold Spring Harb Perspect Med. Apr: 5(4): a021121.*
61. Werngren J, Alm E and Mansjö M (2017). Non-pncA Gene-Mutated but Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Why Is That? Volume 55 Issue 6 *Journal of Clinical Microbiology.*
62. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). *Treatment of tuberculosis: guidelines Fourth edition. 1.Antitubercular agents – administration and dosage. 2.Tuberculosis, Pulmonary – drug therapy. 3.National health programs. 4.Patient compliance. 5.Guidelines. I.World Health Organization. Stop TB Dept.*
63. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017). *Global Tuberculosis Report. Multidrug./rifampicin-resistant TB(MDR/RR-TB): Update 2017. http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html.*
64. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). *Directrices sobre la atención de la infección tuberculosa latente.*

65. Wower I, Zwieb C, Guven S, and Wower J. (2000). Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the Escherichia coli ribosome. EMBO J. 19 No 23 pp 6612-6621.
66. Wower I, Jahan N, Zwieb C and Wower J. (2013). Ribosomal Protein S1: An Important Trans-Translational Factor. Biochem Physiol S2:001. Xia Q, Zhao L, Li F, Fan Y, Chen Y, Wu B, Liu Z, Pan A and Zhua M. (2015). Phenotypic and Genotypic Characterization of Pyrazinamide Resistance among Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Zhejiang, China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy March 2015 Volume 59 Number 3
67. Xuan-Yu M, Hong-Xing Z, Mihaly M and Meng C (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug Discovery. Curr Comput Aided Drug Des June 1: 7(2):146-157.
68. Yang J, Liu Y, Bi Y, Cai Q, LiaoX, Li W, Guo Ch, Zhang Q, Lin T, Zhao Y, Wang H, Liu J, Zhang X and Lin D (2015). Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* by pyrazinamide. Mol Microbiol. 95(5):791-803.
69. Yeager R, Munroe W and Dessau F (1952). Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. Am Rev Tuberc May; 65(5): 523-46.
70. Zhang Y and Mitchison D (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis. 2003 Jan;7(1):6-21.
71. Zhang Y, Wade M, Scorpio A, Zhang H and Sun Z (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport

and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 790–795.

72. Zhang Y, Shi W, Zhang W and Mitchison D (2014). Mechanism of Pyrazinamide. Action and Resistance. *Microbiology Spectrum* 2(4): MGM2-0023-2013.

73. Zimic M, Fuentes P, Gilman R, Gutiérrez A, Kirwan D, Sheen P. (2012). Pirazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*. 2012; 92 (2): 84-91.

ANEXOS

Anexo 01. Relación de péptidos generados al partir del extremo C-terminal de RpsA A438 y el sitio de interacción con el POA (Lys303, Phe307, Phe310 and Arg357), determinados por ICM.

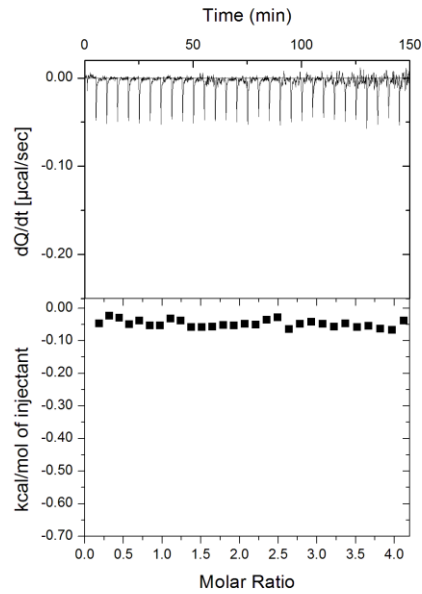
Número de péptidos	Status de interacción con POA	Secuencia de Peptidos
Pep0	No	AAEAAGRGA
Pep1	No	AAEAAGRGA
Pep2	POA2	AEAAGRGA
Pep3	No	EAAGRGA
Pep4	No	AAGRGA
Pep5	No	AGRGA
Pep6	Ambos	GRGA
Pep7	No	RGGA
Pep8	Ambos	GGA
Pep9	POA2	GA
Pep10	Cerca	A
Pep11	No	
Pep12	POA2	
Pep13	No	
Pep14	POA2	
Pep15	POA2	
Pep16	No	
Pep17	No	

Anexo 01 (continuación). Relación de péptidos generados al partir del extremo C-terminal de RpsA A438 y el sitio de interacción con el POA (Lys303, Phe307, Phe310 and Arg357), determinados por ICM.

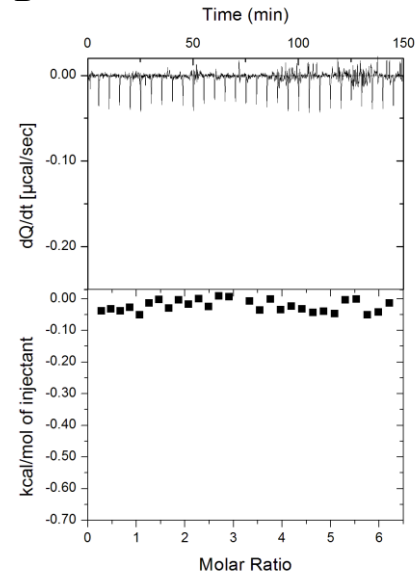
Pep18	No	APSEKTAGGS
Pep19	POA2	PSEKTAGGSL
Pep20	Ambos	SEKTAGGSLA
Pep21	Ambos	EKTAGGSLAS
Pep22	No	KTAGGSLASD
Pep23	POA2	TAGGSLASDA
Pep24	Cerca	AGGSLASDAQ
Pep25	POA2	GGSLASDAQL
Pep26	POA2	GSLASDAQLA
Pep27	No	SLASDAQLAA
Pep28	No	LASDAQLAAL
Pep29	No	ASDAQLAALR
Pep30	POA2	SDAQLAALRE
Pep31	No	DAQLAALREK
Pep32	POA2	AQLAALREKL
Pep33	POA2	QLAALREKLA
Pep34	Ambos	LAALREKLAG
Pep35	POA2	AALREKLAGS
Pep36	Ambos	ALREKLAGSA

Anexo 02. Evaluación de la interacción entre variants de RpsA $\Delta\Delta$ 438 – POA mediante ITC. A) RpsA $\Delta\Delta$ 438_CUT1-POA. B) RpsA $\Delta\Delta$ 438 CUT2-POA, C) RpsA $\Delta\Delta$ 438CUT3-POA. No hay variación en los parámetros termodinámicos. No se registró afinidad entre moléculas.

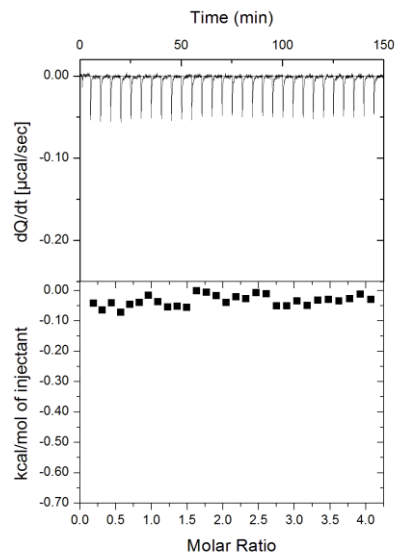
A



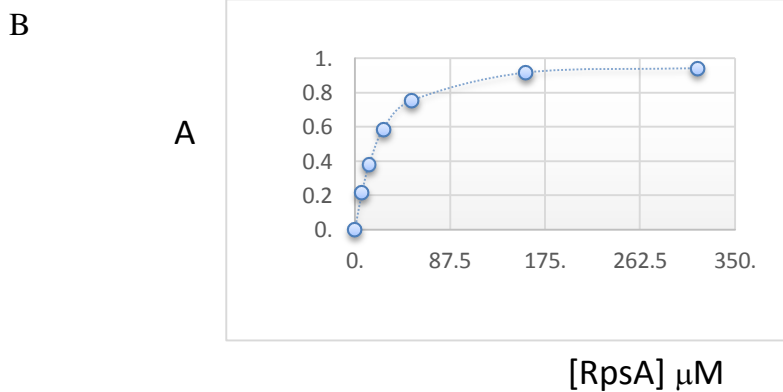
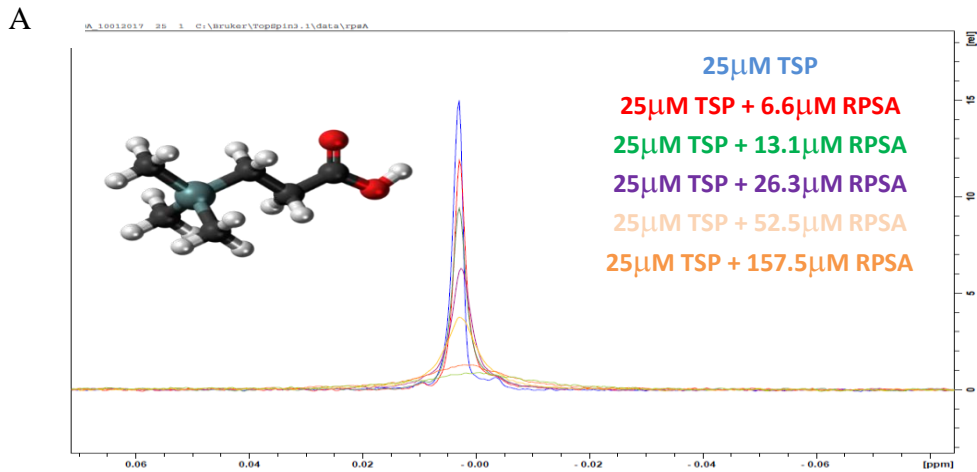
B



C

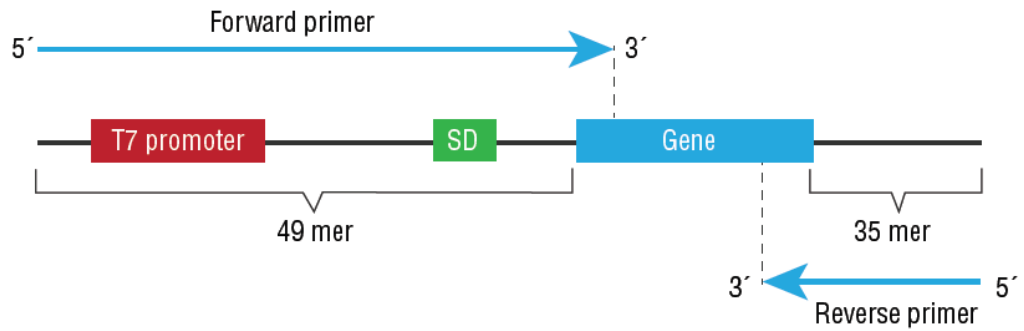


Anexo 03. Espectro RMN del ^1H del TSP - CSP. (A) Determinación de la afinidad molecular por perturbación del cambio químico (NMR-CSP) entre Ácido Trimethylsilyl Propanoico (TSP) y RpsA wt de *Mycobacterium tuberculosis*. Espectro adquirido en 100 mM Buffer fosfato pH 6.4. Equipo de 500 MHz a 25°C Supresión de agua usando esquema WATERGATE (Liu *et al.* 1998). (B) Aproximación para la determinación de la constante de disociación entre RpsA nativo y TSP. K_d entre 20 y 100 μM a partir de las intensidades halladas mediante RMN-CSP. Para una determinación exhaustiva de la constante de disociación es necesario medir el tiempo de relajamiento del TSP en función de la concentración de rpsA (Fielding 2003)



$$A = \frac{I_0(\text{TSP}) - I(\text{TSP+RPSA})}{I_0(\text{TSP})}$$

Anexo 04. Esquema del diseño de primers para el sistema de transcripción y traducción *in vitro* bajo el control del promotor T7



5' UTR sequence of Forward Primer (49 mer)

5' GCG AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TTA AGT ATA
AGG AGG AAA AAA T . . . 27 bases matching gene of interest starting with ATG - 3'

3' UTR sequence of Reverse Primer (35 mer)

5' AAA CCC CTC CGT TTA GAG AGG GGT TAT
 GCT AG TTA . . . 24 bases matching gene of interest - 3'