



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“CAMBIOS CONFORMACIONALES
DEL FACTOR DE INICIACIÓN IF3 EN
EL RIBOSOMA DURANTE EL INICIO
DE LA TRADUCCIÓN”

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

JOSE ALBERTO NAKAMOTO KUAHARA

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR

Dr. Mirko Juan Zimic Peralta

CO ASESOR

Dr. Pohl Luis Milón Mayer

JURADO DE TESIS

DR. JORGE LUIS ARÉVALO ZELADA

PRESIDENTE

DR. DANIEL CLARK LEZA

VOCAL

DR. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

SECRETARIO

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a mis asesores: Dr. Mirko Zimic y Dr. Pohl Milón por su apoyo.

En particular al Dr. Pohl por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, el ambiente de trabajo que promueve, y su paciencia.

Finalmente, agradezco a las personas que me han apoyado de alguna manera u otra (ellos saben quiénes son y cuál ha sido su contribución) durante el desarrollo de este proyecto. Un agradecimiento en especial a Luis Cabrera y Katherin Peñaranda porque sin su apoyo nunca podría haber pasado por la burocracia administrativa necesaria para presentar esta tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

InnovatePerú (Proyectos 382-PNICP-PIBA-2014 y 297-INNOVATEPERU-EC-2016) y Fondecyt (084-2015-FONDECYT-DE).

LISTA DE ABREVIACIONES

IF1: Factor de iniciación 1

IF2: Factor de iniciación 2

IF3: Factor de iniciación 3

IF3-DL: IF3 doblemente marcado

30S: Subunidad menor del ribosoma 30S

50S: Subunidad mayor del ribosoma 50S

70S: Ribosoma completo

30S-PIC: Complejo de pre-iniciación 30S

30S-IC: Complejo de iniciación 30S

70S-IC: Complejo de iniciación 70S

fMet-ARNt^{fMet}: ARNt iniciador, formil metionil ARNt

NTD: Dominio amino terminal, del nombre en inglés *N-terminal domain*

CTD: Dominio carboxilo terminal, del nombre en inglés *C-terminal domain*

IF3-NTD: Dominio amino-terminal de IF3

IF3-CTD: Dominio carboxilo-terminal de IF3

FRET: Del nombre en inglés *Förster Resonance Energy Transfer*

SDS-PAGE: Del nombre en inglés *desodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

RCF: Del nombre en inglés *Relative Centrifugal Force*

AV: Del nombre en inglés *Accessible Volume*

Tabla de contenidos

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Síntesis de proteínas en bacterias	6
3.2 Iniciación de la síntesis de proteínas	7
3.3 Factores de iniciación	7
3.4 IF3	8
3.5 FRET	9
IV JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	10
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
VI. METODOLOGÍA	12
6.1 Diseño del estudio	12
6.2 Procedimientos y técnicas	12
6.2.1 Diseño y modificación fluorescente de IF3-DL	12
6.2.2 Vectores de expresión (Plámidos) y transformación de <i>E. coli</i> B121	13
6.2.3 Expresión y purificación	14
6.2.4 Marcado fluorescente	16
6.2.5 Ensayos cinéticos	18
6.3 Análisis cinético de estado pre-estacionario	21
6.4 Aproximación estructural	21
6.5 Consideraciones éticas	22
VII. RESULTADOS	23
7.1 FRET intramolecular de IF3 y su unión a la subunidad 30S	23
7.2 Cambios conformacionales de IF3 unido a la 30S en respuesta a la llegada de componentes de la iniciación	25
7.3 Liberación de IF3 en la formación del 70S-IC	28
7.4 Respuesta conformacional de IF3-DL unido a la 30S-PIC a la llegada del 50S junto al fMet-ARN ^{fMet}	30
7.5 Efecto de la ausencia del dominio amino terminal de IF3 (IF3-NTD)	32

7.6	Aproximación estructural	37
VIII.	DISCUSIÓN	40
8.1	Interacción de IF3-DL con la subunidad 30S del ribosoma	40
8.2	Formación del complejo intermedio de iniciación 30S-IFs	42
8.3	Formación del complejo 30S-IC	43
8.4	IF3-DL y la progresión a la elongación de proteínas.	45
8.5	La ausencia del IF3-NTD en diversos intermediarios de la iniciación de la traducción	48
IX.	CONCLUSIONES	50
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XI.	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la iniciación de la traducción.	2
Figura 2. FRET intramolecular entre los dominios de IF3.	4
Figura 3. Expresión de IF3-E166C e IF1.	15
Figura 4. Purificación de IF3-E166C e IF1.	16
Figura 5. IF1 purificado y marcado fluorescente de IF3-DL.	18
Figura 6. Esquema experimental del <i>stopped-flow</i> .	19
Figura 7. Efecto de la unión de IF3-DL a la subunidad 30S.	24
Figura 8. Unión de los factores IF1 e IF2 y reacomodación de IF3-DL en la subunidad 30S.	26
Figura 9. Cambios de FRET en IF3-DL durante la unión del fMet-ARNt ^{fMet} y del ARNm.	28
Figura 10. Unión de la subunidad 50S al 30S-IC y al 30S-PIC sin ARNm.	30
Figura 11. Efecto de la llegada conjunta del fMet-ARNt ^{fMet} y la subunidad 50S al 30S-PIC.	32
Figura 12. Efecto de la ausencia del IF3-NTD.	37
Figura 13. Análisis de cambios estructurales de IF3 en respuesta a la llegada del fMet-ARNt ^{fMet} .	39
Figura 14. Esquema de amplitudes de FRET y análisis estructural.	47
Tabla 1. Reacciones de cinéticas rápidas en el <i>stopped-flow</i> .	20

RESUMEN

La iniciación de la síntesis de proteínas requiere la acción de diversos ligandos que permiten la correcta determinación del marco de lectura del ARNm y regulan la velocidad con la que los ribosomas producen proteínas. Durante esta fase participan tres factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3) que catalizan la unión del ARNt de iniciación y posterior decodificación del codón de iniciación del ARNm. IF3 eleva la fidelidad de la iniciación de la traducción y participa en diversos puntos de control del proceso. Sin embargo, las funciones de IF3 en relación con la variabilidad conformacional del factor unido al ribosoma son poco entendidas. Para poder estudiar los cambios estructurales del factor IF3 en el tiempo y en función a la formación del complejo de iniciación se utilizaron las técnicas de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) intramolecular y cinéticas rápidas. La unión de IF1 e IF2 (en presencia de IF1) provocaron un acercamiento de los dominios de IF3; mientras que la unión de IF3 y del ARNt, lo opuesto. Las velocidades de dichos cambios entre los dominios de IF3 variaron entre 0.55 y 4.87 s⁻¹. La ausencia del dominio amino terminal de IF3 produjo una disminución de la afinidad del ARNt de inicio y una formación más lenta del complejo 70S. Los análisis estructurales de IF3 en distintas conformaciones guardaron relación con los cambios en distancia observados en los ensayos de cinéticas. La combinación de análisis cinéticos y estructurales permitieron proponer un modelo para los cambios en IF3 por cada intermedio de la formación del complejo de iniciación 30S de las bacterias.

PALABRAS CLAVES

RIBOSOMA, TRADUCCIÓN, IF3, ARNm, 30S

ABSTRACT

Translation initiation is a crucial regulatory step in protein synthesis. Three factors (IF1, IF2 and IF3) are involved during this phase and are responsible for the selection and the quantity of the protein produced. IF3 manages the fidelity of translation and acts upon various kinetic regulatory checkpoints. Nevertheless, the relation between this function and the conformational variability of the ribosome-bound factor is unknown. We used intramolecular FRET and rapid kinetics to study the structural changes of IF3 during the formation of the initiation complex. The binding of IF1 and IF2 results in a reduced distance between IF3's domains, while the binding of ARNt provokes an increase in the distances. The velocities of these movements were between 0.55 and 4.87 s⁻¹. Kinetic assays in absence of the N-terminal domain resulted in a decreased binding affinity of the initiator ARNt and in a slower 70S assembly. Structural analysis correlated different IF3 conformations to the directionality of the changes determined by the kinetics data. Here we established a conjunct model of conformation changes of IF3 in the intermediaries of the initiation complex from the combination of kinetic and structural analysis.

KEYWORDS

RIBOSOME, TRANSLATION, IF3, mRNA, 30S

I. INTRODUCCIÓN

Los ribosomas son complejos macromoleculares que se encargan de la síntesis de proteínas. En las bacterias, el ribosoma 70S está compuesto por dos subunidades: la subunidad menor (30S) y la subunidad mayor (50S) (1). El ribosoma y los ácidos ribonucleicos (ARN) de transferencia (ARNt) se encargan de traducir el código genético, introducido por el ARN mensajero (ARNm), en una cadena polipeptídica. El proceso de traducción del ARNm se divide en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje ribosomal (2).

Durante la iniciación, el ribosoma y tres factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3) se encargan de promover la unión del ARNt iniciador (fMet-ARNt^{fMet}) al codón de iniciación del ARNm donde se determina el marco de lectura (3–5). En la fase de la elongación, se forma la cadena polipeptídica. Cada nuevo aminoácido es presentado por su respectivo ARNt en un complejo con el factor de elongación EF-Tu y es seguido por formación del enlace peptídico que une ambos aminoácidos (6). Este proceso repite hasta que el ribosoma encuentra un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) (7). Los factores de liberación reconocen estos codones y promueven la separación del péptido sintetizado (8,9). Finalmente, el factor de reciclaje ribosomal RRF, junto con el factor de elongación EF-G e IF3, promueven la separación de las subunidades (10). Dentro del proceso de traducción, la iniciación define la velocidad con la que el ribosoma inicia la decodificación de la información genética (11). Esta fase es altamente regulada y se desconocen aspectos conformacionales de sus factores relacionados a la fidelidad de traducción.

Durante la iniciación, el $fMet-ARNt^{fMet}$ se une al ARNm en la subunidad 30S formando el complejo de pre-iniciación 30S (30S-PIC) (12,13). Esta reacción es catalizada por los tres factores de iniciación: IF1, IF2 e IF3 (14). La unión del ARNm al ribosoma está guiada la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) que es complementaria a la región anti-Shine-Dalgarno (aSD) del ARN ribosomal (ARNr) 16S (15); sin embargo, la SD no es esencial para la correcta decodificación del codón de iniciación (16). IF2, de manera cooperativa con IF1 e IF3, promueve la unión del $fMet-ARNt^{fMet}$ al complejo de pre-iniciación. Cuando se reconoce el codón de inicio (AUG, GUG o UUG en bacterias), el 30S-PIC se reordena al complejo de iniciación 30S (30S-IC) (Figura 1) (12). A pesar de que los complejos 30S-PIC y 30S-IC comparten los mismos ligandos, la afinidad de cada uno de ellos difiere ampliamente (17). Finalmente, la subunidad 50S se une al 30S-IC formando el complejo de iniciación 70S (70S-IC); los factores de iniciación se disocian del ribosoma y se inicia la fase de elongación (18–20).

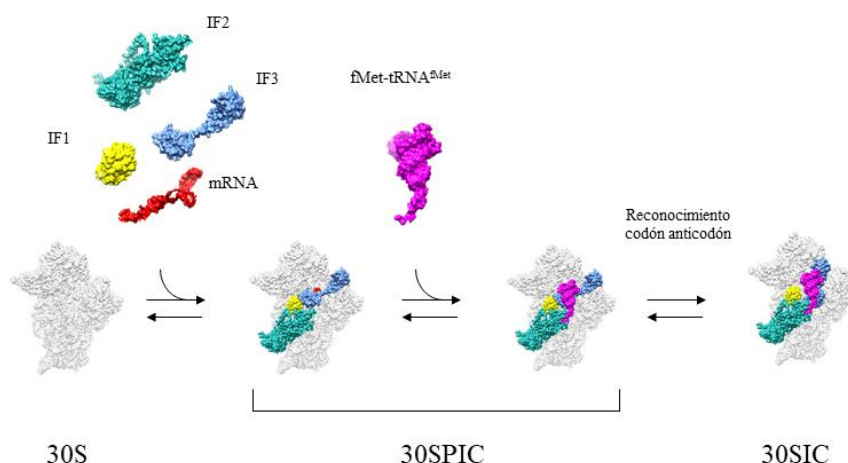


Figura 1. Esquema de la iniciación de la traducción. Se muestra los pasos generales de la formación del complejo de iniciación 30S (30S-IC). Primero, debe formarse un complejo de pre-iniciación 30S (30S-PIC) con IF1 (amarillo), IF2 (Verde), IF3 (celeste) y el ARNm (rojo). Luego llega el $fMet-ARNt^{fMet}$ (morado) y tiene que formarse el codón-anticodón para pasar del 30S-PIC al 30S-IC.

Los factores de iniciación regulan la fidelidad de la traducción. En primer lugar, IF1 aumenta la afinidad de los otros dos factores de iniciación a la subunidad 30S y promueve, con IF2, la unión del fMet-ARNt^{fMet} en el sitio P (21). IF2 tiene como función principal promover la unión específica del fMet-ARNt^{fMet} (48). Asimismo, aumenta la superficie de interacción entre el complejo 30S-IC y la subunidad 50S, acelerando la unión entre ellos (20,22). IF3 participa durante todo el proceso de la iniciación de la síntesis de proteínas (17). Este factor disminuye la afinidad entre las subunidades ribosomales, aumenta la velocidad de formación del codón-anticodón entre el ARNt y el ARNm y promueve la disociación de ARNts inespecíficos (23–27). Además, IF3 contribuye substancialmente en el aumento la fidelidad del proceso de iniciación. Por estos motivos, es de interés estudiar los mecanismos moleculares del factor.

IF3 es una proteína constituida por dos dominios globulares de tamaño similar, amino-terminal (NTD, del inglés *N-Terminal Domain*) y carboxilo-terminal (CTD, del inglés *C-Terminal Domain*) (28,29). Ambos dominios se mueven independientemente el uno del otro de acuerdo a experimentos previos con espectroscopía de resonancia magnética nuclear, mutagénesis y accesibilidad a proteólisis (14,30,31). Durante el proceso de iniciación, IF3 es el primer factor de la traducción en unirse a la subunidad 30S del ribosoma (32). El CTD de IF3 (IF3-CTD) entra en contacto con la plataforma de la subunidad 30S, seguido inmediatamente por el NTD (33). El sitio de unión de IF3 en la subunidad 30S ha sido objeto de diversos estudios que localizan el factor en la plataforma de la 30S (Figura 2a) (34,35). Si bien existen diversas posibles configuraciones de IF3 unido

a la subunidad 30S, se desconoce los movimientos, el orden y cinéticas de ellos. La relación que dichos movimientos podrían tener con las funciones del factor en la fidelidad de la iniciación es poco entendida. En este estudio, se utilizan técnicas de espectroscopía por fluorescencia para medir cambios en la distancia entre los dominios de IF3 en el tiempo y en función de todos los ligandos del complejo de iniciación 30S-IC (Figura 2b). Con este propósito, se modificó IF3 con compuestos donadores y aceptores de fluorescencia (IF3-DL) para medir la FRET (*Föster Resonance Energy Transfer*) intramolecular en función de la interacción de la subunidad 30S con todos sus ligandos. Las mediciones de cambios estructurales en el tiempo permitieron evaluar el sentido y la velocidad de los cambios conformacionales de los dominios de IF3 durante la formación del 30S-IC. Los datos cinéticos obtenidos y el modelamiento *in silico* de estructuras existentes de IF3 permiten proponer un modelo para las dinámicas de IF3 y la configuración de sus dominios en la plataforma de la 30S; y a partir de ello, relacionarlo con las funciones de fidelidad de IF3.

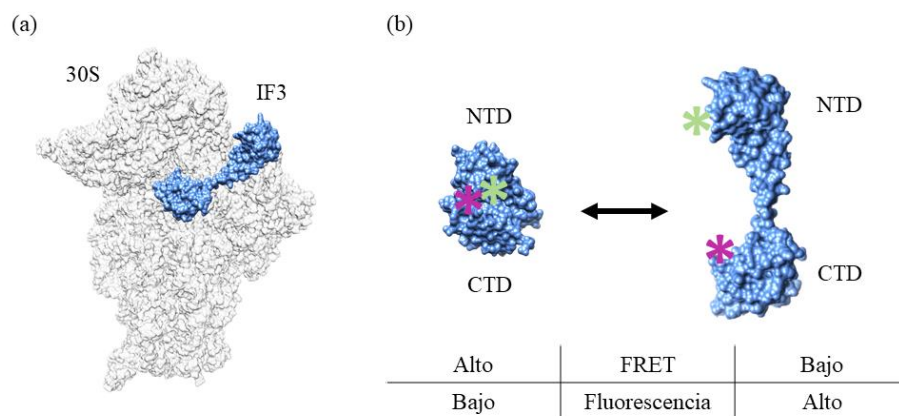


Figura 2. FRET intramolecular entre los dominios de IF3. a) Modelo de ubicación aproximada de IF3 unido a la subunidad 30S. b) Posibles configuraciones de los dominios de IF3 y su relación con la señal de fluorescencia emitido. Los asteriscos muestran la ubicación relativa de los fluoróforos (Atto488: verde; Atto540Q: morado).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El factor de iniciación IF3 es una proteína compuesta por dos dominios globulares, NTD y CTD (28), que participa en diversos pasos del proceso de selección del ARNm (26).

IF3 es el primer factor de la traducción que llega a la subunidad 30S (17). Este participa en el ensamblaje del 30S-PIC y en la transición a un complejo de reconocimiento del codón de iniciación (30S-IC), además regula la unión de la subunidad mayor para la formación del complejo de iniciación 70S (70S-IC) (13,14). En este proceso, IF3 desarrolla diversas funciones que afectan la fidelidad de la traducción (23); previene la asociación temprana de la subunidad 50S e influye en la velocidad de asociación y disociación de ARNts a la subunidad menor (24,36). Estas funciones son atribuidas al CTD (23). Si bien la ausencia del NTD de IF3 (IF3-NTD) resulta en una reducción en el *fitness* de la célula y en la eficiencia de la traducción, no se le ha atribuido una función molecular específica (37). Adicionalmente, los efectos funcionales de las posibles conformaciones de IF3 en la subunidad 30S son parcialmente desconocidos. Un mejor entendimiento de dichas fluctuaciones moleculares y su dependencia de otros ligandos del complejo de iniciación permitiría comprender los mecanismos moleculares y postular sus efectos en la regulación expresión genética durante la traducción. Adicionalmente, los intermedios cinéticos de IF3 en la subunidad 30S podrían ser utilizados como potenciales blancos para el desarrollo de antibióticos. Se esperaría que la inhibición de IF3 en alguna de sus múltiples conformaciones genere un proceso de iniciación sujeto a errores que afecte la homeostasis de la célula (38–41).

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Síntesis de proteínas en bacterias

La traducción del ARNm por medio del ribosoma es el proceso por el cual se sintetizan las proteínas en todas las células (11). Este proceso consta de cuatro fases: la iniciación, la elongación, la terminación y el reciclaje ribosomal. En la iniciación, el ribosoma recluta un ARNm y establece el marco de lectura mediante la unión del fMet-ARNt^{fMet} al codón de inicio del ARNm acoplado a la subunidad 30S (42). En la fase de la elongación, los aminoácidos son presentados por su respectivo ARNt en un complejo formado con el factor de elongación EF-Tu y es seguido de la formación del enlace peptídico, catalizado por la subunidad 50S, que une ambos aminoácidos (6). El complejo resultante es el complejo 70S de pre-translocación y se caracteriza por poseer un ARNt de-aminoacilado en el sitio A del ribosoma y un ARNt unido al péptido que se está sintetizando en el sitio P (13,43). El complejo de pre-translocación debe trasladarse a lo largo del ARNm en la dirección 5' a 3' para poder liberar el sitio A y presentar un nuevo codón del ARNm para la decodificación. La reacción de translocación es catalizada por el factor de elongación EF-G. El proceso de elongación de la cadena peptídica y translocación del ARNm se repite hasta que el ribosoma encuentra un codón de terminación en el sitio A (UAA, UGA o UAG) (7). Los codones de terminación son reconocidos por factores de liberación que hidrolizan la proteína sintetizada del último aminoacil-ARNt (8,9). Luego de que el péptido sintetizado se libera del ribosoma, el RRF junto con EF-G e IF3 promueven la separación de las subunidades para un nuevo inicio la síntesis de una nueva proteína (10).

3.2. Iniciación de la síntesis de proteínas

El inicio de la traducción es un punto de regulación que involucra la interacción de tres factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3), un ARNm, el fMet-ARNt^{fMet} y el ribosoma (44). En primer lugar, el fMet-ARNt^{fMet}, un ARNm y los factores de iniciación se unen a la subunidad 30S formando el 30S-PIC (2,18). El 30S-PIC pasa a formar el 30S-IC cuando se establece la interacción entre el codón de inicio y el anticodón de fMet-ARNt^{fMet} en el sitio P (14,18). Finalmente, la subunidad 50S se une al 30S-IC formando el 70S-IC y este entra a la fase de la elongación de la síntesis de proteínas (Figura 1) (45,46). La unión de las dos subunidades es un punto de regulación y control de la traducción. Así por ejemplo, se reduce la velocidad de formación del 70S-IC en complejos sin ARNt iniciador o con codones de inicio incorrectos (2,14). La regulación de la traducción del ARNm está ligada a cambios conformacionales en la subunidad 30S y en los factores de iniciación. Se ha observado que la frecuencia de traducción de un ARNm específico depende de las interacciones entre este con la subunidad 30S, de las estructuras secundarias que pueda asumir y de las moléculas participantes de la fase de iniciación (47,48,49).

3.3. Factores de iniciación

Los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3 aseguran la fidelidad y controlan la correcta traducción del ARNm (13). IF1 aumenta la afinidad por los otros dos factores de iniciación y evita que algún ARNt ocupe el sitio A de ribosoma (21). Asimismo, se une en el sitio A de la subunidad 30S y genera cambios estructurales locales y a distancia en la subunidad 30S (50). Finalmente, aumenta la afinidad de

la subunidad 30S por fMet-ARNt^{fMet}, probablemente mediada por un aumento de afinidad de IF2 (51).

IF2 promueve la unión del fMet-ARNt^{fMet} y aumenta la velocidad de unión de la subunidad 50S (52–54). Una molécula de GTP se une a IF2 y es hidrolizada durante la unión de la subunidad mayor 50S al complejo 30S-IC, generando un cambio conformacional que promueve la correcta transición a la fase de elongación (55,56). Por otro lado, IF2 es un posible sensor del metabolismo de las bacterias, ya que el proceso de iniciación se detiene cuando ppGpp se une al factor (57).

Finalmente, IF3 facilita la unión del ARNm y fMet-ARNt^{fMet} a la subunidad 30S (58) y evita la unión prematura de la subunidad mayor del ribosoma (50S) que resultaría en complejos sin ARNt iniciador o con codones de inicio incorrectos (18,20,59).

3.4. IF3

IF3 es una proteína con dos dominios globulares, NTD y CTD, unidos por un secuencia flexible (28,29). En solución, IF3 puede adoptar una conformación en donde los dominios están unidos entre sí y otra en donde la proteína se encuentra extendida (33). La unión de IF3 con la subunidad 30S favorece la forma extendida (60). IF3 se une a la plataforma de la subunidad 30S y establece contactos con la hélices h45, h23 y h24 del ARNr 16S y las proteínas ribosomales uS7 y uS11 (35,61–63). El IF3-CTD se une a la región 790 del ADN 16S ribosomal e IF3-NTD, cerca al fMet-ARNt^{fMet} (35). Entre las funciones conocidas de IF3, se ha observado que influye negativamente en la unión entre subunidades de los ribosomas y en la regulación de afinidad por ARNm (18). IF3 genera cambios conformacionales en

el 30S-IC que afectan la afinidad de unión de la subunidad 50S (64). Se atribuye estas funciones al IF3-CTD y se desconoce funciones específicas del IF3-NTD. Sin embargo, el IF3-NTD posee un rol adicional en la fidelidad de la iniciación y en la supervivencia de la célula (65).

3.5. FRET

La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) es una técnica que utiliza a la transmisión de energía entre dos moléculas sensibles a la luz (fluoróforos). Uno de ellos, el donador, al ser excitado por luz, puede transferir su energía al segundo (el aceptor) y este emite una fluorescencia a una longitud de onda distinta (66). La eficiencia de transmisión de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia, por lo que la técnica de FRET es altamente sensible a cambios pequeños de distancia y puede ser utilizada para seguir cambios conformacionales entre moléculas (67). Para esto, se adhieren fluoróforos a moléculas que interactúan entre sí o a distintas partes de una molécula, para determinar la variación de distancia entre fluoróforos que se genera por dicha interacción o por cambios conformacionales (68). Combinar la técnica de FRET con aproximaciones en estado pre-estacionario ha permitido determinar reacciones de unión y cambios conformacionales que ocurren durante formación de complejos entre la subunidad 30S y los factores de iniciación IF2 e IF3 (17).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El inicio de la traducción del ARNm es un punto de control en la síntesis proteica altamente regulado (14). Estudios previos indican que IF3 se une a la plataforma de la subunidad 30S antes que los otros factores y que sus dos dominios responden a la unión del fMet-ARNt^{fMet} y a la formación del codón-anticodón (13,69). IF3 cumple varias funciones relacionadas a la fidelidad de la formación de un 30S-IC adecuado (23). Sin embargo, se desconoce el efecto que otros componentes de la iniciación generan sobre la configuración espacial de los dominios de IF3 y la relación de entre los movimientos de los dominios con las funciones de fidelidad del factor. Debido al aumento de patógenos con resistencia a antibióticos, es necesario encontrar nuevas estrategias para combatirlos (70–72). La iniciación es un paso de regulación más divergente de la traducción entre procariotas y eucariotas (41,73). Conocer con mayor detalle los mecanismos moleculares que influyen en este paso podría dar lugar a nuevos blancos para antibióticos. Se esperaría que inhibiendo los mecanismos moleculares por los que IF3 afecta la fidelidad, ocurriría un proceso de iniciación de la traducción sujeto a errores, con consecuencias graves para la viabilidad de la célula.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar los cambios en la conformación del factor de iniciación IF3, la cinética involucrada y la función del dominio amino terminal del IF3 (IF3-NTD) en el proceso de formación del complejo de iniciación de la traducción en *E. coli*.

Objetivos específicos

- Determinar el cambio de FRET en el tiempo entre los dominios de IF3 durante la formación de intermediarios del ensamblaje de complejos de iniciación 30S.
- Determinar las constantes cinéticas aparentes de los cambios conformacionales de IF3.
- Determinar la distancia entre fluoróforos de IF3 en complejos 30S-PIC – 30S-IC modelada *in silico* y comparar con cambios estructurales observados mediante FRET.
- Evaluar una posible función del IF3-NTD durante la unión del ARNt de iniciación y la formación del complejo 70S-IC.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Diseño del estudio

Este trabajo es un estudio exploratorio experimental *in vitro* con el objetivo de evaluar los movimientos de los dominios de IF3 en la formación del 30S-IC. El estudio requirió de procesos preparativo y analíticos. Todos los componentes del proceso de iniciación de la síntesis de proteínas fueron purificados separadamente y reconstituidos para estudiar el efecto individual de cada uno. Se utilizaron procedimientos preparativos donde se evaluó cualitativamente la calidad de los compuestos mediante técnicas de electroforesis y ensayos de actividad. Analíticamente, se cuantificaron las preparaciones de proteínas, ribosomas, ARNts, ARNm con procedimientos adecuados en quintuplicado lo que permitió calcular un valor promedio y una desviación estándar. Las mediciones de FRET mediante cinéticas rápidas se realizaron entre 7 y 10 veces para cada mezcla, donde cada medición es la resultante de 1000 puntos en el tiempo. Los replicados fueron promediados y analizados mediante regresión no lineal usando funciones exponenciales. Cada parámetro calculado resulta en un promedio y la desviación entre la regresión y los datos medidos.

6.2. Procedimientos y técnicas

6.2.1. Diseño y modificación fluorescente de IF3-DL

Para medir los cambios conformacionales de IF3, se requiere la modificación específica de cada dominio del factor con un compuesto fluorescente, ambos compatibles con mediciones de FRET. Los cambios de FRET reflejan cambios de

distancia entre los fluoróforos, en este caso cambios intramoleculares (Figura 2b). IF3 *wt* contiene una cisteína nativa en la posición 65 en el IF3-NTD, que es poco accesible para el marcaje con maleimidias (<5% en 1 hora en condiciones no desnaturalizantes). Para preparar IF3-DL, se introdujo una segunda cisteína mediante la sustitución de E166, expuesta al solvente, del IF3-CTD mediante mutagénesis específica.

6.2.2. Vectores de expresión (plásmidos) y transformación de *E. coli* BL21

En este estudio, se utilizaron vectores de expresión con los genes codificantes para IF3-E166C e IF1 *wt*. Los genes fueron sintetizados químicamente y clonados en plásmidos pET-24a con resistencia a kanamicina (Genscript, New Jersey, EEUU). Se obtuvieron células competentes de *E. coli* BL21 mediante el kit Mix & Go (ZymoResearch, Irvine, EEUU). Este kit proporciona un sistema estandarizado basado en choque osmótico por cloruro de calcio para incrementar la competencia de *E. coli*. En resumen, se incubó 100 ng de cada plásmido con 50 µl de células competentes por 10 min a 4°C. Luego se agregó 200 µl de medio SOC y se incubó a 37°C por 1h en agitación. Se cultivaron las bacterias en placas SOC con kanamicina (30 µg/ml) por 10 ± 2 h a 37°C. Posteriormente, se sembró colonias únicas en placas de Luria Bertani (LB) con kanamicina (30 µg/ml) y se incubó por 10 ± 2 h a 37°C. Las colonias únicas fueron seleccionadas y cultivadas en medio líquido LB suplementado con kanamicina (30 µg/ml) a 37 °C y 150 rpm de agitación. Se utilizaron cultivos saturados para hacer stocks de glicerol y almacenados a -80°C.

6.2.3. Expresión y purificación

Se inoculó una colonia aislada de cada cepa transformada en 30 mL de medio LB con kanamicina (30 µg/ml) (LB kan+). Se incubó por 12 horas a 37°C y 140 RPM. Se utilizó este inóculo para cultivar 4 matraces con 500 mL de LB kan+ que se incubaron a 37°C y 140 RPM hasta que la absorbancia a 600nm (OD_{600nm}) fuera 0.5. Se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. Luego de 3h, se recolectó las células por medio de centrifugación a 6,250 RCFs (De las siglas en inglés, *Relative Centrifugal Force*), 4°C y 10min. El *pellet* de células se lavó en *buffer* HAKM_® (50mM HEPES, 10mM MgCl, 30mM KCl, 70mM NH₄Cl) y se volvió a centrifugar para descartar el sobrenadante. Se resuspendió cada gramo de células en 3 mL de *buffer* de lisis (50mM HEPES, 70mM NH₄Cl, 6mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol , pH 7.1) y se sonicaron las células con un equipo de sonicación (ThermoFisher Scientific, Waltham, EEUU) (16 ciclos de sonicación, 10s de pulso y 30s de reposo por ciclo, con una intensidad de 30%). Se centrifugó la solución (11,000 RCFs por 30min) dos veces y el sobrenadante se pasó por filtros Milipore Millex-HV de 45 µm (Merck Millipore, Kenilworth, EEUU).

Para verificar la expresión de las proteínas en la inducción, se recolectó una muestra de 1 mL antes de agregar IPTG y cada hora luego de la inducción y se analizaron en un gel denaturante (*SDS-PAGE desodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) al 16% (Figura 3). Se observó un aumento de IF3 en función del tiempo de inducción; mientras que para IF1, se observó una banda constante desde la primera hora de inducción (Figura 3).

Para la purificación de las proteínas (IF3-E166C y IF1) se realizó una cromatografía por medio de un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, HPLC) (Jasco, Tokyo, Japón) y una columna de intercambio iónico HiTrap Canto SP de 1mL (GE Healthcare, Chicago, EEUU). Se cargó el sobrenadante filtrado en la columna. Se utilizó una gradiente de sal NH_4Cl (50mM HEPES, 50mM-1M NH_4Cl , 6mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 7.1) y se recolectaron fracciones de 500 μL . Las fracciones recolectadas, junto a muestras del lavado y *flow through*, fueron verificadas en un gel SDS-PAGE al 16%. Se observó que la mayoría de los contaminantes no se unen a la columna o son eluidos en el lavado de 100mM de NH_4Cl . Sin embargo, se observaron contaminantes de alto peso molecular en las fracciones de IF1 (Figura 4).

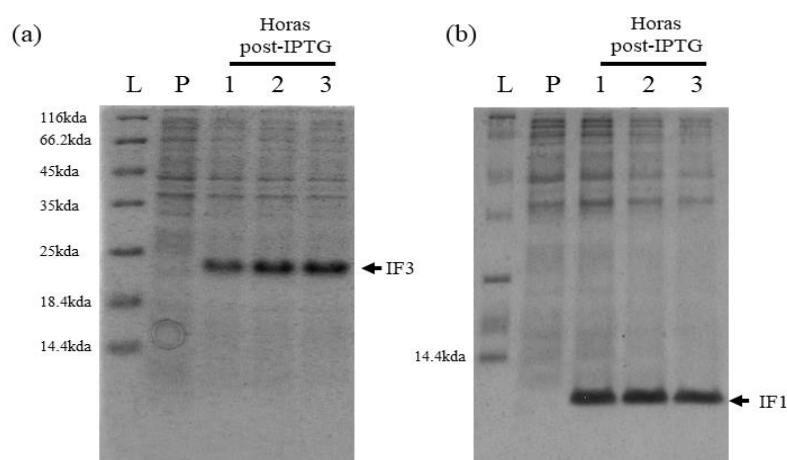


Figura 3. Expresión de IF3-E166C e IF1. Inducción de BL21 (DE3) pET-24^a *InfC* e *InfA* para la expresión de IF3 e IF1. SDS-PAGE al 16% de la inducción de IF3-E166C (a) e IF1 (b). L: Marcador de peso molecular (ThermoFisher Scientific, Waltham, EEUU). P: Muestra obtenida antes de la inducción por IPTG. 1-3, horas de inducción.

Las fracciones que contenían IF1 fueron sometidas a purificación por filtración en sistema Amicon (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda) utilizando una membrana

de 30 kDa, donde contaminantes de alto peso molecular fueron retenidos por la membrana mientras que IF1 (8 kDa) pasaron los poros, y se obtuvieron preparaciones de IF1 de alto grado de pureza (Figura 5a). Finalmente se dializó las proteínas en *buffer* de marcado (50mM HEPES, 100mM NH₄Cl, 10% glicerol, pH 7.1) con tubos D-tube Dialyzer de 3kDa (EMD Millipore, Billerica, EEUU) por 18 h y se centrifugó a 14000 RCFs por 10 min antes de ser alicuotado y almacenado a -80 °C.

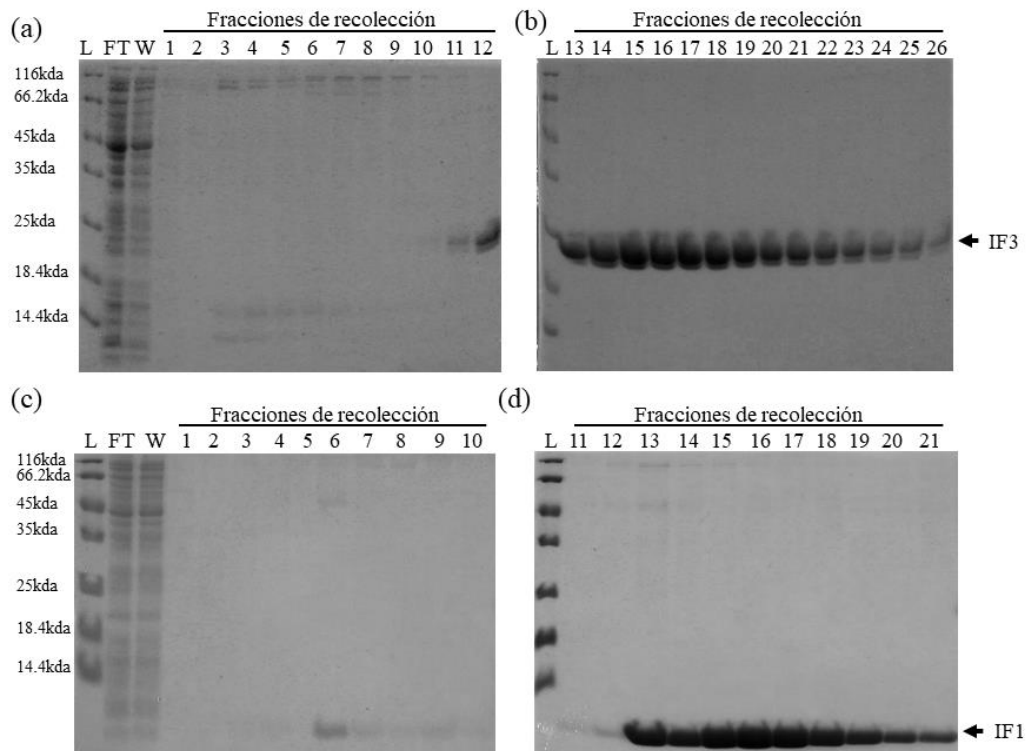


Figura 4. Purificación de IF3-E166C e IF1. SDS-PAGE al 16% de la purificación de los factores de iniciación. a) y b) Purificación de IF3-E166C. c) y d) Purificación de IF1. L: Marcador de peso molecular. FT: Flow through. W: Lavado a 100mM NH₄Cl.

6.2.4. Marcado fluorescente

IF3-E166C (100 μM) se marcó con Atto-540Q-maleimida (2 mM) durante 30 min en *buffer* de marcado al que se le adicionó 1 mM de tris(2-carboxietil)fosfina

(TCEP). La reacción se detuvo agregando 2-mercaptoetanol (6 mM) y se purificó del exceso de fluoróforo usando una columna Hitrap Capto SP de manera similar a lo descrito previamente. Con el fin de superar la baja reactividad de Cys65, el IF3 marcado con Atto-540Q se dializó en *buffer* de marcado que contenía urea (2 M) y posteriormente se hizo reaccionar con Atto488-maleimida (2 mM) durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 2-mercaptoetanol (6 mM) y la proteína se purificó del exceso del fluoróforo como se describió previamente.

Se realizó diálisis secuenciales de las proteínas en *Storage buffer* (200 mM NH₄Cl, 6 mM 2-mercaptoetanol, 50 mM HEPES, pH 7.1) para disminuir la concentración de urea a 1, 0.5 y 0 M, en cada paso, por 8 horas a 4°C. Se verificó la pureza de IF3-DL y el marcado por medio de un SDS-PAGE al 16% junto a un estándar de BSA (Figura 5b-c). Antes de la tinción y con una exposición a luz UV se observó que IF3 contenía fluoróforos y luego con tinción mediante azul de Comassie, se observó que el factor estaba puro. Finalmente se midió la absorbancia de los fluoróforos Atto-488 (λ_{Abs} : 500nm, ϵ_{max} : $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y Atto-540Q (λ_{Abs} : 543nm, ϵ_{max} : $1.05 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, EEUU) en la solución para determinar la eficiencia de marcado (definida como Moles de fluoróforo/Moles de Proteína). Se obtuvo que hubo una eficiencia de marcado de 0.50 ± 0.02 con Atto-540Q y 0.69 ± 0.04 con Atto-488. Estudios previos determinaron que modificaciones individuales no alteran la actividad de IF3 (17,68)

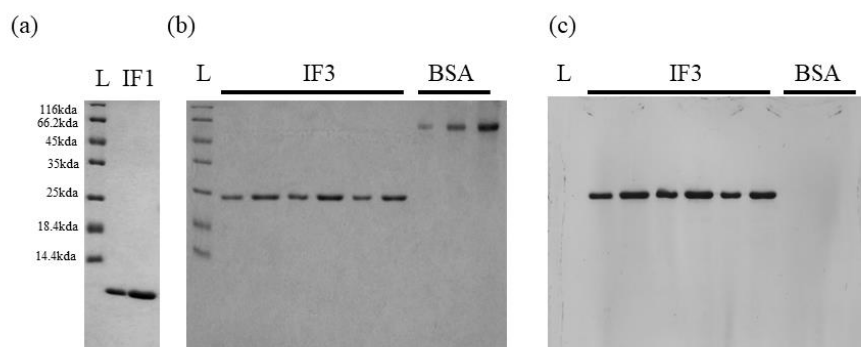


Figura 5. IF1 purificado y marcado fluorescente de IF3-DL. a) SDS-PAGE al 15% de IF1 luego de la filtración. b) SDS-PAGE al 15% de IF3-DL luego de la purificación de la proteína del exceso de fluoróforo teñido con azul de Comassie. Se muestra diluciones distintas de IF3. c) Gel pre-tinción bajo luz UV. L: marcador de peso molecular.

6.2.5. Ensayos cinéticos

Para medir cambios de fluorescencia en función de reacciones de la iniciación, se utilizó un equipo de *stopped-flow* que permite mezclar rápidamente (< 1 ms) dos soluciones y medir en tiempo real los cambios espectroscópicos que resulten de la interacción entre los componentes de cada solución (Figura 6a). La lista de todas las reacciones que se llevaron a cabo se puede observar en la Tabla 1.

En resumen, se mezcló IF3-DL en distintos intermediarios del 30S-PIC con componentes de la iniciación. Adicionalmente a ello, para evaluar el efecto de la presencia o ausencia de IF3 y el efecto del dominio IF3-CTD, se cambiaron la posición de los fluoróforos para la señal de FRET. En estos casos, se utilizó fMet-ARNt^{fMet} con fluoresceína (ARNt-Flu) e IF1 marcado con Atto540Q.

Cada componente tuvo un volumen de 800 μ L para 7 a 10 replicados y 1000 puntos de medición. Todas las reacciones se realizaron en buffer TAKM₁₀ (50 mM Tris,

70 mM NH₄Cl, 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂), a 25 °C con una longitud de onda de excitación de 470 nm. Se usó un filtro óptico de 515 nm para el detector de fluorescencia emitida (Figura 6b). Los replicados fueron promediados y analizados mediante regresión no lineal usando funciones exponenciales. Cada parámetro calculado resulta en un promedio y su desviación entre la regresión y los datos medidos. Para verificar la especificidad de la señal de FRET también se produjo una variante del factor modificado solo con el donador Atto-488 (NTD) (Figura 3b) a partir de IF3 *wt*.

Las subunidades 30S y 50S, el factor IF2, el dominio IF3-CTD, el ARNm, fMet-ARNt^{fMet}, fMet-ARNt-Flu y GTP fueron proporcionados por el Dr. Attilio Fabbretti de la escuela de Biociencias y Medicina Veterinaria de la Universidad de Camerino, Italia. La preparación de estos se encuentra detallada en Milón et al., 2007 (68)

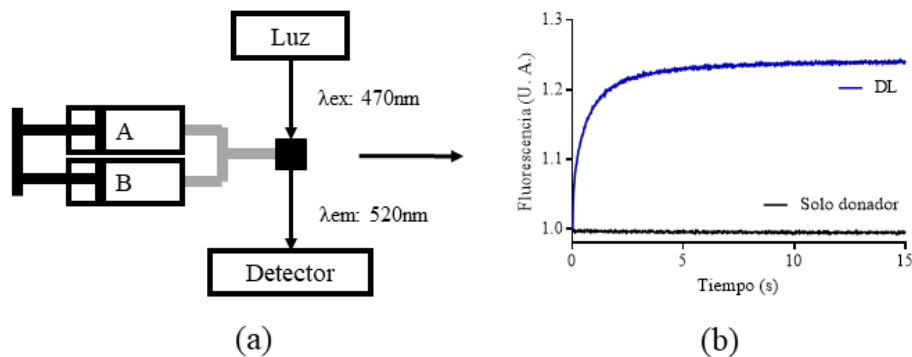


Figura 6. Esquema experimental del *stopped-flow*. a) Modelo del funcionamiento de un *stopped-flow*. b) Señal típica que se obtiene de mezclar IF3-DL con la subunidad 30S (Azul) con un control con solo el fluoróforo donador presente (Negro).

Tabla 1. Reacciones de cinéticas rápidas en el *stopped-flow*. Los componentes de cada jeringa se incubaron previamente a 37°C por 10min.

Reacción	Jeringa Izquierda	Jeringa Derecha
1	IF3-DL 0.05 μ M	30S 0.1 μ M
2	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M	IF1 0.15 μ M
3	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M	IF2 0.15 μ M
4	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M	ARNm 0.3 μ M
5	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M	ARNt 0.3 μ M
6	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt 0.3 μ M
7	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + ARNt 0.3 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	50S 0.1 μ M
8	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + ARNt 0.3 μ M + GTP 100 μ M	50S 0.1 μ M
9	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	50S 0.1 μ M + ARNt 0.3 μ M
10	30S 0.1 μ M + IF3-DL 0.05 μ M + IF1 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M	50S 0.1 μ M + ARNt 0.3 μ M
11	30S 0.1 μ M + IF3 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M
12	30S 0.1 μ M + IF3-CTD 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M
13	30S 0.1 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M
14	30S 0.1 μ M + IF3 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M + ARNt-Flu 0.05 μ M	50S 0.1 μ M
15	30S 0.1 μ M + IF3-CTD 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M + ARNt-Flu 0.05 μ M	50S 0.1 μ M
16	30S 0.1 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M + ARNt-Flu 0.05 μ M	50S 0.1 μ M
17	30S 0.1 μ M + IF3 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M + 50S 0.1 μ M
18	30S 0.1 μ M + IF3-CTD 0.15 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M + 50S 0.1 μ M
19	30S 0.1 μ M + IF1Q 0.15 μ M + IF2 0.15 μ M + GTP 100 μ M + ARNm 0.3 μ M	ARNt-Flu 0.05 μ M + 50S 0.1 μ M

ARNt = fMet-ARNt^{fMet}

ARNt-Flu = fMet-ARNt^{fMet} con fluoreceína

6.3. Análisis cinético en estado pre-estacionario

Se realizaron entre 7 a 10 replicados de ensayos cinéticos en el *stopped-flow* y se promedió el resultado. Para determinar los parámetros cinéticos de los cambios de fluorescencia en el tiempo, se realizó una regresión no lineal de los trazos en el tiempo con Graphpad 7 (Prism, La Jolla, EEUU). Debido a que la formación de un complejo a partir de dos componentes resulta en una ecuación exponencial (ecuación 1) (74), se aproximó las regresiones no lineales a ecuaciones exponenciales (ecuaciones 2 y 3). Los resultados consolidados de las regresiones no lineales pueden observarse en la Tabla S1.

Ecuación 1

$$F = F_0 + F_n e^{-k_{appn}t}$$

Ecuación 2.

$$F = F_0 + F_1 e^{-k_{app1}t} + F_2 e^{-k_{app2}t}$$

Ecuación 3

$$F = F_0 + F_1 e^{-k_{app1}t} + F_2 e^{-k_{app2}t} + F_3 e^{-k_{app3}t}$$

6.4. Análisis estructural

Se analizaron las estructuras de criomicroscopía electrónica del 30S PIC para determinar las distancias entre los volúmenes accesibles de los fluoróforos para cada posición de IF3 (69). Se utilizó el programa de Maestro (Maestro, Schrodinger, Nueva York, EEUU) para obtener las dimensiones de longitud de la cadena carbonada y del radio del fluoróforo. Luego, se utilizó el programa de *FRET-restrained position and screening* FPS (75) para obtener el volumen accesible (AV) de los fluoróforos a partir de las estructuras. Se utilizó el programa de Matlab para

determinar la distancia entre cada coordenada obtenida de los AV de los fluoróforos de las distintas configuraciones de IF3 (ver anexos) y se evaluó la distribución con Graphpad 7. En el estudio de referencia, los PDBs 5LMN, 5LMS y 5LMT corresponden a los estados intermedios del complejo de pre-iniciación PIC1, PIC2 y PIC3, respectivamente. En tanto, el PDB 5LMU fue asignado al complejo 30S-IC (PIC4). La visualización de las estructuras fue por medio del software de Chimera (66). Las distancias obtenidas se encuentran en las tablas A1 y A2 de anexos.

6.5. Consideraciones éticas

El trabajo fue exonerado por los comités de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas debido a que se trata de un proyecto experimental *in vitro*, sin uso de muestras de animales, plantas o seres humanos.

VII. RESULTADOS

7.1. FRET intramolecular en IF3 y su unión a la subunidad 30S.

IF3 consiste de dos dominios globulares unidos por una región flexible (28,29,35). Cada dominio se une dos o más sitios distintos en el complejo de iniciación 30S (35,69,77). Para poder estudiar cómo dichos dominios se disponen espacialmente en función del tiempo se diseñó una aproximación de intramolecular FRET, donde cada dominio fue marcado específicamente con un compuesto fluorescente, donador (Atto-488) al amino terminal y aceptor (Atto-540Q) al carboxilo terminal (ver métodos) para generar IF3-DL. Atto-540Q es un aceptor no emisor de fluorescencia (*quencher*) que, de manera óptima, absorbe fotones de longitudes de onda similares a los emitidos por Atto-488. La señal de fluorescencia resultante dependerá directamente a la distancia entre los fluoróforos.

IF3 es el primer factor que se une a la subunidad 30S, por este motivo se evaluó el cambio de fluorescencia de IF3-DL al unirse a la subunidad en un ensayo de cinéticas en estado pre-estacionario usando un equipo *stopped-flow* (17). Al mezclar IF3-DL con la subunidad 30S (Reacción 1, Figura 7a) se observó un aumento de fluorescencia (Figura 7b), indicando que los dominios del factor se alejan entre sí al unirse a la subunidad. Se observa que la señal no es afectada por el efecto de dilución con el buffer y la magnitud de la señal es mucho menor cuando se utiliza IF3 sin aceptor como control para descartar que el cambio de fluorescencia fue debido a cambios en el entorno del fluoróforo donador (Figura 6b). La señal de unión de IF3-DL a la subunidad 30S tuvo una dependencia exponencial en el tiempo bifásica, lo que sugiere que la unión inicial es seguida por una acomodación del

factor. Se realizó un análisis de regresión no lineal con una ecuación de dos exponenciales (Ecuación 2). Las constantes aparentes estimadas fueron $kapp1 = 4.87 \pm 0.162 \text{ s}^{-1}$ y $kapp2 = 0.47 \pm 0.011 \text{ s}^{-1}$; mientras que las respectivas intensidades de fluorescencia asociadas fueron $F1 = 0.38 \pm 0.006$ y $F2 = 0.26 \pm 0.004$.

Las constantes aparentes determinadas son similares a las reportadas en estudios previos (17), donde IF3 se une rápidamente a la subunidad 30S. Los resultados indican que la unión del factor es acompañada por un cambio conformacional. Dicho cambio indica una transición entre un estado en donde los dominios están cercanos y otro en donde la distancia entre los dominios aumenta. La unión de IF3 se presenta en dos fases de intensidad similar, una de interacción rápida seguida de un cambio conformacional a una velocidad diez veces menor.

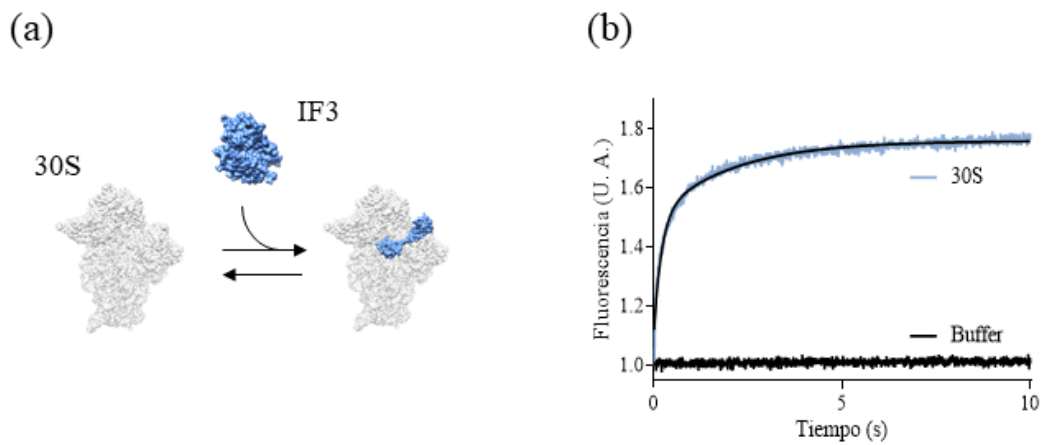


Figura 7. Unión de IF3-DL a la subunidad 30S. a) Esquema de la reacción. b) Cambio de fluorescencia de IF3-DL ante la llegada de la subunidad 30S (celeste), control con buffer (negro). Cada línea representa el promedio de 7 a 10 experimentos independientes. La línea continua negra representa la aproximación resultante de la regresión lineal a una ecuación de dos exponenciales ($F = F_0 + F_1 e^{-kapp1*t} + F_2 e^{-kapp2*t}$).

7.2. Cambios conformacionales de IF3-DL unido a la subunidad 30S en respuesta a la llegada de componentes de la iniciación.

IF3 e IF1 se estabilizan mutuamente en la subunidad 30S (27). IF1 aumenta la afinidad de IF3 y viceversa (17). Esta cooperatividad genera una reducción de la velocidad de disociación de los factores (5,17,67). La presencia de ambos factores en la subunidad 30S genera una disminución de la velocidad de unión de la subunidad mayor 50S, resultando en un estado de mayor fidelidad al reducir la formación de complejos 70S prematuros (18). Para evaluar si IF1 influye en la disposición de los dominios de IF3 ya unidos a la subunidad 30S, se mezcló rápidamente subunidades 30S pre-unidas a IF3-DL con un exceso molar de IF1 en un *stopped-flow* (Reacciones 2 y 3, Figura 8a). Se observó que la fluorescencia decrece exponencialmente en el tiempo. Esto indica un acercamiento de los dominios en respuesta a la unión de IF1. De manera similar, se estudió el efecto de la unión de IF2 y se observó una disminución de señal considerablemente menor comparada a la de IF1 (Figura 8b).

Las señales de unión de IF1 e IF2 a la subunidad 30S con IF3-DL tuvieron una dependencia bifásica en el tiempo. El análisis de regresión no lineal usó una ecuación de dos exponenciales (Ecuación 2) en ambos casos. Para el cambio de fluorescencia generado por IF1, las constantes aparentes estimadas fueron $k_{app1} = 0.55 \pm 0.021 \text{ s}^{-1}$ y $k_{app2} = 0.11 \pm 0.017 \text{ s}^{-1}$, y sus respectivas intensidades de fluorescencia asociadas fueron $F1 = 0.11 \pm 0.004$ y $F2 = 0.04 \pm 0.003$. En tanto, para la unión de IF2, las constantes e intensidades estimadas fueron $k_{app1} = 2.50 \pm 0.282 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.30 \pm 0.035 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.02 \pm 0.001$, y $F2 = 0.01 \pm 0.001$.

El análisis de regresión mostró diferencias en los cambios de intensidad generados por los factores. IF1 causa un acercamiento de los dominios de IF3 al menos 5 veces mayor al observado por IF2. Sin embargo, la velocidad asociada al cambio ocasionado por IF1 es 20 veces menor al ocasionado por IF2. Dichas diferencias indican que cada factor influencia diversamente la disposición de IF3 en la plataforma de la subunidad 30S. Las diferencias cinéticas de los efectos observados podrían ser explicados por las diferencias intrínsecas en la unión de IF1 y IF2. Estudios previos han mostraron que IF2 se une entre 20 y 30 veces más rápido que IF1 (17), y los resultados presentados indican que la unión rápida de dichos factores podrían ocasionar una reacomodación en IF3 y/o sus sitios de unión en el ribosoma.

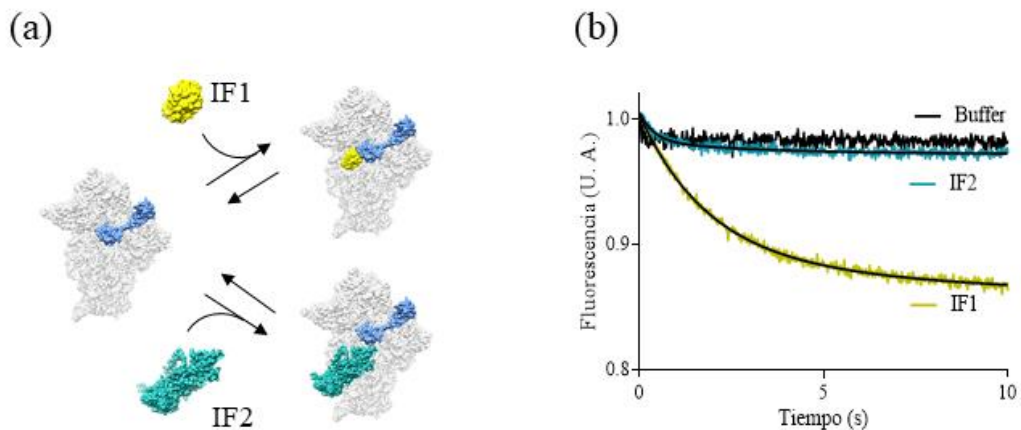


Figura 8. Unión de los factores IF1 e IF2 y reacomodación de IF3-DL en la subunidad 30S. a) Esquema de la reacción. b) Cambio de FRET en el tiempo de IF3-DL unido a la subunidad 30S ante la llegada de IF1 (amarillo) e IF2 (verde). Cada línea representa el promedio de 7 a 10 experimentos independientes. La línea continua negra representa la aproximación resultante de la regresión lineal a una ecuación de dos exponenciales ($F = F_0 + F_1 e^{-k_{app1} * t} + F_2 e^{-k_{app2} * t}$).

IF3 afecta la velocidad de unión del fMet-ARNt^{fMet} a la subunidad menor del ribosoma (17). Luego de la unión del fMet-ARNt^{fMet} al ribosoma, la formación de la interacción codón-anticodón entre el ARNt y ARNm es necesaria para continuar

con el proceso de iniciación (12). La formación de dicha interacción genera un cambio en las afinidades de los factores, incluyendo IF3 (18).

En primer lugar, se evaluó la influencia de la unión del ARNm complejo 30S con los tres factores de iniciación (30S-IFs, Reacción 4, Figura 9a) para descartar posibles diferencias conformacionales en IF3-DL debidas a la interacción del ARNm con la subunidad 30S. No hubo ningún cambio de fluorescencia en el tiempo por la llegada del ARNm al complejo 30S-IFs, indicando que IF3 no modifica su disposición en la plataforma de la subunidad 30S en función de la unión del ARNm (Figura 9b).

Luego, para evaluar si la unión del ARNt genera algún cambio conformacional sobre IF3, se mezcló subunidades 30S pre-unidas a IF3-DL y los otros factores con un exceso molar de fMet-ARNt^{fMet} en un instrumento *stopped-flow* y se midió el cambio de FRET en el tiempo. Se realizó un experimento en ausencia y otro en presencia del ARNm (Reacciones 5 y 6, Figura 9a) para evaluar si los potenciales cambios de distancia entre los dominios de IF3 son específicos a la unión del ARNt o a la formación del codón-anticodón. Se observó que hay un aumento de la fluorescencia similar en ambas combinaciones (Fig. 9b).

La señal de unión del fMet-ARNt^{fMet} en ambos casos tuvo una dependencia exponencial en el tiempo bifásica. En ausencia de ARNm, las constantes aparentes y las intensidades de fluorescencia de la unión del fMet-ARNt^{fMet} fueron $kapp1 = 1.86 \pm 0.093 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.16 \pm 0.011 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.05 \pm 0.001$ y $F2 = 0.02 \pm 0.001$. Para la unión del fMet-ARNt^{fMet} en presencia del ARNm, las constantes e

intensidades estimadas fueron $kapp1 = 1.45 \pm 0.071 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.12 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.042 \pm 0.001$, y $F2 = 0.03 \pm 0.001$. El análisis mostró que la presencia del ARNm tampoco afecta la velocidad de unión del fMet-ARNt^{fMet} y el cambio en la intensidad de fluorescencia es similar.

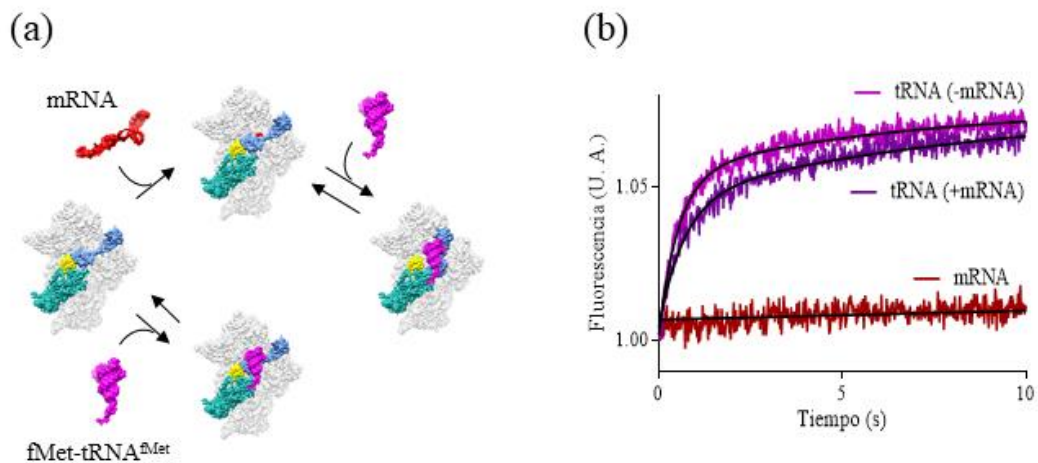


Figura 9. Cambios de FRET en IF3-DL durante la unión del fMet-ARNt^{fMet} y del ARNm. a) Esquema de la reacción. b) Cambio de fluorescencia en el tiempo ante la llegada del ARNm y del fMet-ARNt^{fMet} en presencia y ausencia del ARNm. Cada medición representa el promedio de 7 a 10 experimentos independientes. La línea continua negra representa la aproximación resultante de la regresión lineal a una ecuación de dos exponenciales ($F = F_0 + F_1e^{-kapp1*t} + F_2e^{-kapp2*t}$).

7.3. Liberación de IF3 en la formación del 70S-IC

La unión de la subunidad 50S con el 30S-IC genera la formación del complejo de iniciación 70S, la liberación de los factores de iniciación y el inicio de la elongación (14). Este proceso ocurre secuencialmente en varios pasos y es en estos donde IF3 ejerce su función de reguladora para asegurar la fidelidad del proceso (79). La liberación de IF3 es rápida cuando los complejos son formados adecuadamente (18). Durante la unión de IF3-DL a la subunidad 30S se observó un aumento de distancia entre sus dominios (Figura 7b). Se espera que, si IF3 se libera del ribosoma

en respuesta a la llegada de la subunidad 50S, la distancia entre los dominios disminuya y se observe una disminución de fluorescencia.

Se mezcló el complejo 30S-IC pre-incubadas con IF3-DL contra la subunidad 50S en un *stopped-flow* y se midió los cambios de fluorescencia en el tiempo (Reacción 7, Figura 10a). La llegada de la subunidad 50S al 30S-IC (con IF3-DL) resultó en una disminución de fluorescencia, lo que indica que los dominios de IF3 se acercan (Figura 10b). Esto indica que IF3 recupera su conformación previa a la unión con la subunidad 30S. La señal de unión de la subunidad 50S al 30S-IC tuvo una dependencia bifásica en el tiempo. Las constantes aparentes e intensidades de fluorescencia estimadas fueron $k_{app1} = 0.55 \pm 0.012 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.05 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.04 \pm 0.001$ y $F2 = 0.03 \pm 0.001$.

Los complejos formados incorrectamente, por ejemplo con un codón distinto al de iniciación, un ARNt erróneo o en ausencia del ARNm, ocasionan una disminución de la velocidad de asociación de la subunidad 50S, principalmente por una disociación lenta de IF3 (18,20). Sin la formación de la interacción codón-anticodón, no ocurriría la transición del 30S-PIC al 30S-IC, lo que limitaría la transición hacia el complejo 70S-IC y su progresión a la fase de elongación (80).

Para estudiar como IF3-DL responde a la unión de la subunidad 50S a complejos prematuros de 30S-PIC, se realizaron mediciones de unión de la subunidad 50S a un 30S-PIC en ausencia del ARNm (Reacción 8). Se observó una disminución de la fluorescencia inicial, rápida, de poca intensidad; seguida de una recuperación de fluorescencia (Figura 10b). Esto indica que IF3 no se disocia y potencialmente se reposiciona en la subunidad 30S en respuesta a la llegada de la subunidad 50S. En

ausencia del ARNm, las constantes cinéticas e intensidades estimadas fueron $kapp1 = 0.71 \pm 0.024 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.04 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.08 \pm 0.001$ y $F2 = 0.07 \pm 0.01$.

La disminución de fluorescencia seguida de un aumento en respuesta a la llegada de la subunidad 50S al 30S-PIC sin ARNm indicaría un acercamiento de los dominios de IF3 seguido de un alejamiento, lo que sugiere que IF3 no adopta su conformación más abierta que probablemente señala al sistema su disociación.

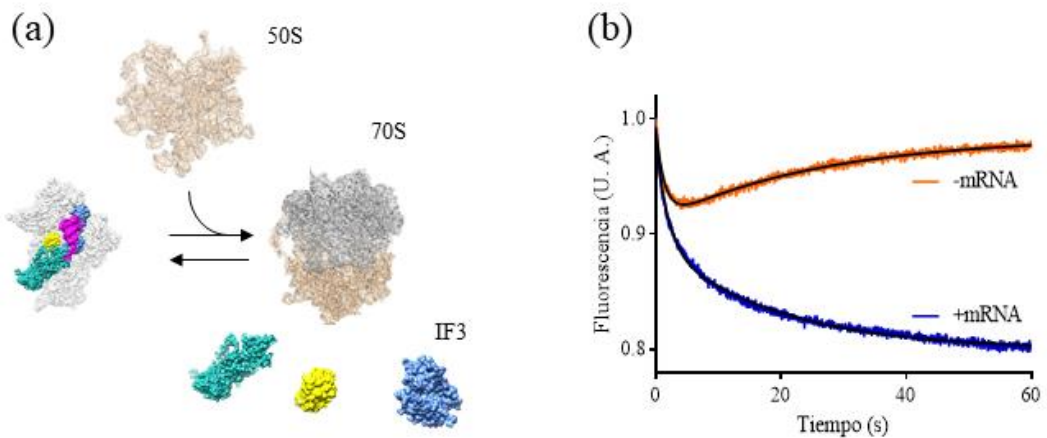


Figura 10. Unión de la subunidad 50S al 30S-IC y al 30S-PIC sin ARNm. a) Esquema de la reacción se muestra la unión de la 50S a un 30S-IC resultando en la formación del 70SIC y la liberación de factores. b) Cambio de fluorescencia en el tiempo del IF3-DL unido al 30S-IC (Azul) y unido al 30S-PIC en ausencia de ARNm (Anaranjado) ante la llegada del 50S. Cada línea representa el promedio de 7 a 10 experimentos independientes. La línea continua negra representa la aproximación resultante de la regresión lineal a una ecuación de dos exponenciales ($F = F_0 + F_1 e^{-kapp1*t} + F_2 e^{-kapp2*t}$).

7.4. Respuesta conformacional de IF3-DL unido a la 30S-PIC a la llegada del 50S junto al fMet-ARNt^{fMet}.

Los ensayos de unión del fMet-ARNt^{fMet} al complejo 30S-PIC no mostraron un cambio de IF3-DL en la formación del codón-anticodón (Figura 9). Investigaciones previas, usando otras combinaciones de FRET entre IF1 y el ARNt o entre IF3 y el ARNt, indican que la unión inicial de ARNt es predominante en las señales

estudiadas (12,62). Un mecanismo probable sería la unión inicial del ARNt seguida de un cambio conformacional correspondiente al reconocimiento del codón de iniciación. Esta acomodación del ARNt puede tener una velocidad mayor a la velocidad de unión inicial o puede ser más lenta. En el primer caso, la cinética observada sería limitada por la reacción de unión. En el segundo caso podría resultar en una fase más lenta. En un contexto fisiológico, una acomodación lenta limitaría la velocidad con la cual el ribosoma entra en la fase de elongación.

Para evaluar ambas opciones, se mezcló el complejo 30S-PIC (con IF3-DL), en presencia y ausencia del ARNm, con el 50S junto al fMet-ARNt^{fMet} y se observó cambios de fluorescencia de IF3-DL en el tiempo mediante la técnica de *stopped-flow* (Reacciones 9 y 10, Figura 11a).

En presencia de ARNm, se observó que hubo un aumento inicial de fluorescencia seguido por una disminución lenta de señal (Figura 11b). El aumento inicial fue similar al visto en ensayos de unión del ARNt (Figura 9b); mientras que la disminución posterior fue similar al observado durante la disociación de IF3 durante la unión del 50S (Figura 10b). Las constantes aparentes e intensidades de fluorescencias fueron $k_{app1} = 3.51 \pm 0.141 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.11 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.11 \pm 0.003$ y $F2 = 0.07 \pm 0.001$. Los datos sugieren el fMet-ARNt^{fMet} se une primero y la subunidad 50S puede rápidamente catalizar la disociación de IF3, por lo que el reconocimiento del codón de iniciación sería más rápido que la unión inicial.

En ausencia del ARNm, la señal inicialmente aumentó, luego disminuyó y volvió a aumentar (Figura 11b), de manera similar a lo observado en ensayos de unión del fMet-ARNt^{fMet} o del 50S a complejos 30S-PIC sin ARNm (Figura 10b). En

ausencia del ARNm la señal tuvo una dependencia trifásica (Ecuación 3). Las constantes e intensidades estimadas fueron $k_{app1} = 4.01 \pm 0.684 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.37 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$, $k_{app3} = 0.07 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.07 \pm 0.006$, $F2 = 0.08 \pm 0.004$, y $F3 = 0.13 \pm 0.004$. Dicha respuesta compleja de IF3 podría indicar una unión del ARNt seguida por la llegada de la subunidad 50S que, por la falta del ARNm y la formación del codón-anticodón, no puede formar el complejo 70S.

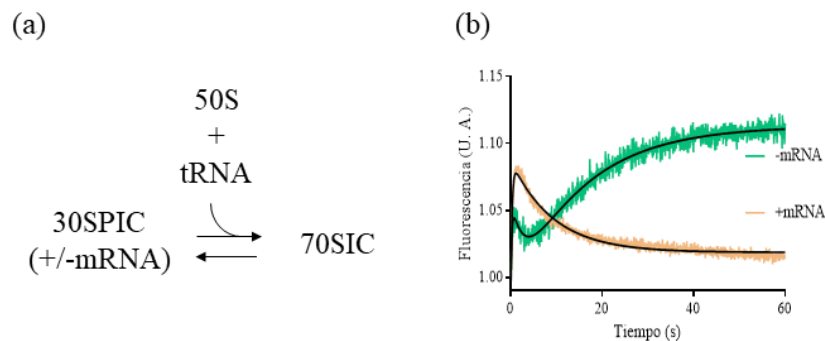


Figura 11. Efecto de la llegada conjunta del fMet-ARNt^{fMet} y la subunidad 50S al 30S-PIC. a) Esquema de la reacción. b) Cambio de fluorescencia en el tiempo de IF3-DL en el 30S-PIC en respuesta a la llegada de fMet-ARNt^{fMet} junto a la 50S (Crema) y en ausencia de ARNm (Verde). Cada medición representa el promedio de 7 a 10 experimentos independientes. La línea continua negra representa la aproximación resultante de la regresión lineal a una ecuación de dos exponenciales ($F = F_0 + F_1 e^{-k_{app1}t} + F_2 e^{-k_{app2}t}$) o de tres exponenciales ($F = F_0 + F_1 e^{-k_{app1}t} + F_2 e^{-k_{app2}t} + F_3 e^{-k_{app3}t}$).

7.5. Efecto de la ausencia del dominio amino terminal de IF3 (IF3-NTD).

IF3 cumple diversas funciones que mantienen la fidelidad de la iniciación. Estudios pasados atribuyen esas funciones al dominio IF3-CTD (23). Estudios recientes han demostrado que el dominio IF3-NTD no es esencial para la supervivencia de la célula; sin embargo, su ausencia disminuye los niveles de traducción y, por extensión, el fitness de la célula (37). Para observar el efecto que la ausencia del dominio IF3-NTD genera en la iniciación, se utilizó un fMet-ARNt^{fMet} modificado

con fluoresceína como fluoróforo donador (ARNt-Flu) y un IF1 marcado con ATTO540Q como aceptor (IF1Q). Dicha pareja de FRET permite evaluar la asociación del ARNt al complejo de iniciación 30S y la liberación del IF1 durante la formación del complejo 70S de iniciación (56,81).

Para evaluar el efecto de la ausencia del IF3-NTD en la formación del complejo 30S-PIC, se mezcló el complejo 30S-PIC (con IF1Q) y en presencia de IF3, solo el dominio IF3-CTD o sin IF3; con ARNt fluorescente en un sistema de *stopped-flow* (Reacciones 11 al 13). En presencia del IF3 completo, la señal de fluorescencia del ARNt disminuyó en el tiempo indicando que el ARNt fluorescente se está acercando al fluoróforo aceptor en IF1 (Figura 12a). En ausencia del IF3-NTD, se observó una disminución de fluorescencia de menor amplitud comparada con lo obtenido con IF3 completo (Figura 12a). En ausencia del IF3, se observó una disminución de fluorescencia menor a la observada con IF3 y mayor a la del IF3-CTD (Figura 12a). Para las mediciones en presencia de IF3, los parámetros cinéticos obtenidos fueron $k_{app1} = 0.69 \pm 0.013 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.05 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.25 \pm 0.001$ y $F2 = 0.11 \pm 0.001$. En tanto, en ausencia del IF3-NTD, los parámetros fueron $k_{app1} = 0.62 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.04 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.11 \pm 0.01$ y $F2 = 0.07 \pm 0.01$. Finalmente, en ausencia de IF3, los parámetros fueron $k_{app1} = 0.53 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$, $k_{app2} = 0.03 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.18 \pm 0.001$ y $F2 = 0.09 \pm 0.001$.

Los análisis muestran que la presencia del NTD en el IF3 completo pudo estar aumentando la proporción de ARNt que se une al 30S-PIC, mientras que la ausencia del dominio resultó en un comportamiento que se asemeja a un complejo sin IF3.

IF3 disminuye la velocidad de unión de la subunidad 50S a complejo de preiniciación (23). Para evaluar el efecto de la ausencia del IF3-NTD en este

proceso, se mezcló complejos 30S-IC preincubados con las variantes de IF3 (es decir, en presencia o ausencia de IF3 o solo con el dominio IF3-CTD), IF1Q y el ARNt-Flu con la subunidad 50S en un instrumento *stopped-flow* (Reacciones 14 al 16).

En ausencia del dominio IF3-NTD, la unión del 50S al complejo 30S-IC mostró un aumento de fluorescencia con una dependencia bifásica (Figura 12b), indicando un aumento de distancia de IF1-540Q del ARNt-Flu o la disociación de los factores a la subunidad 30S. Las constantes aparentes e intensidades de fluorescencia estimadas (Ecuación 2) fueron $kapp1 = 2.91 \pm 0.072 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.12 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.21 \pm 0.003$ y $F2 = 0.08 \pm 0.001$.

Cuando se utilizó IF3 completo, se observó un mayor aumento de fluorescencia en comparación a IF3-CTD, con un comportamiento similar, pero a una velocidad menor (Figura 12b). Las cinéticas asociadas a la reacción fueron similares a aquellas observadas para la disociación de IF1 (17). Las constantes calculadas (Ecuación 2) fueron $kapp1 = 0.67 \pm 0.011 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.09 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.30 \pm 0.001$ y $F2 = 0.10 \pm 0.001$.

En ausencia de IF3, la señal de fluorescencia se mantuvo elevada desde un inicio y el cambio fue mucho más rápido (Figura 12b). Esto concuerda con estudios precedentes, donde la ausencia de IF3 permitió una asociación rápida de la subunidad 50S, lo cual lleva a una aceleración de la liberación de IF1 (23). Las constantes calculadas fueron $kapp1 = 2.27 \pm 0.523 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 5.73 \pm 1.182 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.09 \pm 0.052$ y $F2 = 0.18 \pm 0.049$.

En conjunto, los resultados aquí presentados en combinación con reportes previos indican que el aumento de fluorescencia asociado a la unión de la subunidad 50S corresponde a la liberación de IF1Q del complejo 70S IC. La ausencia del dominio IF3-NTD resultó en intensidades de cambio de fluorescencia menores a las observadas tanto en presencia o ausencia del IF3, lo cual podría indicar una reducción en la capacidad de disociación de IF1. A su vez, esta reducción podría deberse a una incompleta formación del complejo 30S-IC; por ejemplo, por una menor unión del ARNt fluorescente.

En los resultados de la llegada simultánea del ARNt con la subunidad 50S, se observó una reacomodación compleja de los dominios de IF3 (Figura 11). Para evaluar si la ausencia del IF3-NTD afecta en la coordinación de la unión del ARNt iniciador seguida de la unión inmediata de la 50S, se mezcló complejos 30S-PIC preincubados con las variantes de IF3 e IF1Q con ARNt-Flu y subunidades 50S en un instrumento *stopped-flow* (Reacciones 17 al 19).

En la reacción del 30S-PIC formado en ausencia del IF3-NTD contra las subunidades 50S más ARNt-Flu, se observó una disminución de fluorescencia (Figura 12c) con una tendencia bifásica ($kapp1 = 0.76 \pm 0.012 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.05 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.24 \pm 0.001$ y $F2 = 0.22 \pm 0.001$). Sin embargo, cuando se utilizó el IF3 completo, inicialmente se observó que la fluorescencia disminuye y fue seguida de una segunda fase en la que la fluorescencia aumenta. Los parámetros asociados fueron $kapp1 = 0.42 \pm 0.009 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.03 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.11 \pm 0.001$ y $F2 = 0.07 \pm 0.001$. La primera fase estaría reflejando la unión del ARNt-Flu, que al acercarse a IF1Q, la fluorescencia disminuyó por el fenómeno *quenching*. Luego, IF1 se liberó por la formación del 70S-IC, alejando los fluoróforos correspondientes

en el IF1Q y en el ARNt. Este distanciamiento ocasionaría el aumento de fluorescencia observado en la segunda fase.

En ausencia de IF3, el comportamiento es similar que en presencia de IF3, pero la intensidad de los cambios es menor (Figura 12c). Los parámetros cinéticos estimados fueron $kapp1 = 0.72 \pm 0.062 \text{ s}^{-1}$, $kapp2 = 0.08 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$, $F1 = 0.02 \pm 0.001$ y $F2 = 0.03 \pm 0.001$. El poco cambio de intensidad podría deberse a que sin IF3, la afinidad entre las subunidades 30S y 50S es alta y sin la función de IF3 de ser antagonista a la formación del 70S-IC prematuros, se estarían formando complejos mayormente sin la presencia del ARNt-Flu. La ausencia del IF3-NTD podría estar impidiendo la formación del 70S-IC a través de ambas reacciones observadas. La unión del ARNt parece ser perturbada al observarse que la disminución de fluorescencia inicial es mucho menor en ausencia del IF3-NTD con respecto a IF3 completo. Por otro lado, el aumento sucesivo de fluorescencia, que refleja la liberación del IF1, también se ve afectado por la ausencia del IF3-NTD.

En conclusión, la ausencia del dominio IF3-NTD parece resultar en una disminuida unión del ARNt, sin perturbar las cinéticas aparentes de unión a complejos 30S-IC. Dichos resultados no se verificaron en parte cuando la unión del ARNt de inicio fue inmediatamente seguida por la unión de la subunidad 50S, donde se ve una velocidad de unión dos veces menor. En general, cualquier aproximación evaluada indica que en ausencia del IF3-NTD, solo una fracción del ARNt de inicio logró formar un complejo de iniciación.

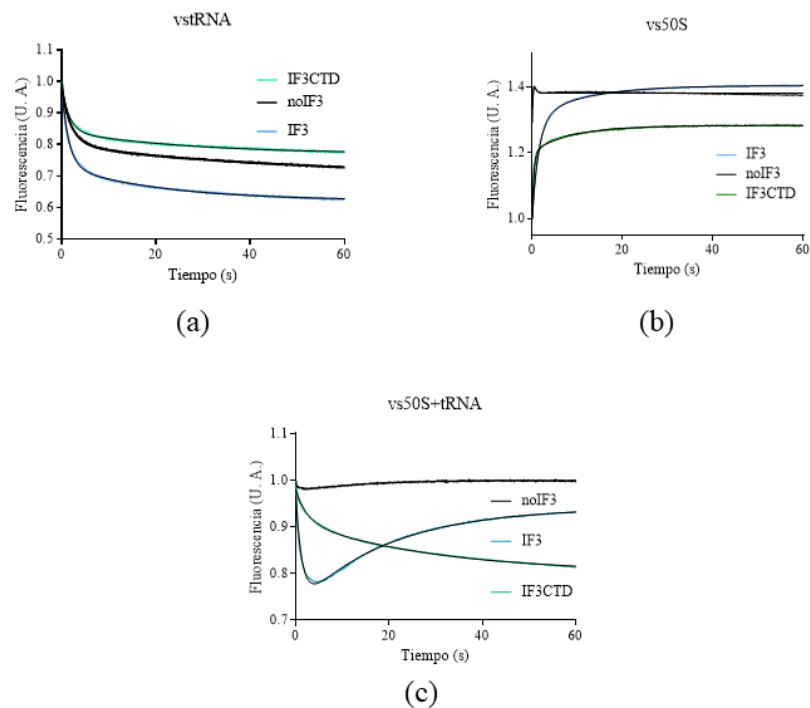


Figura 12. Efecto de la ausencia del IF3-NTD. a) Curva de fluorescencia de la llegada de ARNt-Flu a un 30S-PIC (IF1Q) con IF3, IF3CTD o sin IF3. b) Curva de fluorescencia en el tiempo de la llegada conjunta de la 50S a un 30S-PIC (IF1Q y ARNt-Flu) con IF3, IF3CTD o sin IF3. c) Curva de fluorescencia en el tiempo de la llegada conjunta del ARNt-Flu y la 50S a un 30S-PIC (IF1Q) con IF3, IF3CTD sin IF3.

7.6. Aproximación estructural

Los resultados de los ensayos de cinéticas rápidas indicaron cambios en la distancia entre los dominios de IF3 durante la iniciación de la traducción. Si bien dicha aproximación brinda información cinética, no revela detalles estructurales de la disposición de los dominios en el ribosoma. Un estudio reciente de crio-EM determinó la estructura de un complejo 30-PIC previa a la unión del fMet-ARNt^{fMet} y estructuras correspondientes a intermediarios entre el 30S-PIC y el 30S-IC (69). El estudio de Hussain *et. al* observó que los dominios de IF3 se reacomodaron en función de la unión del fMet-ARNt^{fMet} al 30S-PIC. Esta unión generó un movimiento del IF3-NTD hacia la cabeza del ribosoma. En tanto, la formación de

la interacción codón-anticodón resultó en un movimiento del IF3-CTD, alejándose de IF1 (69). Estos movimientos fueron registrados en 4 estados intermedios (PIC1-4) (Figura 13a-b).

El estudio mencionado permite utilizar las estructuras para modelar las posibles combinaciones de distancia entre los dominios de IF3 y así evaluar su correlación espacial con los datos determinados mediante FRET intramolecular del presente estudio. Para evaluar la posible correlación, se modeló el volumen accesible (AV) de los fluoróforos en las posiciones de IF3 en cada estado de unión reportado por Hussain *et al* (Figura 13c). Luego, se determinó la distribución de distancias entre todos los puntos AV de Atto488 y el Atto540q correspondiente a cada estado propuesto (PIC1-4).

Para el PIC1, que corresponde a un 30S-PIC previo a la unión del fMet-ARNt^{fMet}, la distancia fue 44.38 ± 7.21 Å. Mientras, esta distancia aumentó a 54.01 ± 5.26 para el PIC2, el estado que indica la unión inicial del ARNt (Tabla S2). De manera similar, nuestros resultados indican que la distancia entre los dominios de IF3 aumenta en correspondencia de la llegada del fMet-ARNt^{fMet} (Figura 9b).

Para el estado PIC3, la distancia entre los fluoróforos fue 48.56 ± 4.52 Å. Finalmente, en la formación del 30S-IC (el estado PIC4), el IF3-CTD se movió y la distancia entre los fluoróforos fue 54.29 ± 5.92 Å (Tabla S2). Hussain *et al.* indicaron que estos los estados PIC3 y PIC4 corresponden a la interacción del codón-anticodón y la transición de un 30S-PIC a un 30S-IC. Sin embargo, en nuestros resultados, no se observó el acercamiento de los dominios durante el reconocimiento del codón-anticodón que se obtuvo en la transición de PIC2 a PIC3.

En nuestro caso, solo se observó un aumento en la fluorescencia durante todo el proceso (Figura 9b).

Entre las combinaciones analizadas, resaltó la distancia obtenida entre la posición inicial del IF3-NTD (PIC1) con la posición final del IF3-CTD (PIC4), en la cual se obtuvo la mayor distancia posible entre fluoróforos: $56.19 \pm 7.11 \text{ \AA}$ (Tabla S2). Estas posiciones (aquí denominadas PIC0) podrían representar la configuración relativa de los dominios de IF3 en la subunidad 30S en ausencia de los otros factores de iniciación. La disminución de distancia de los fluoróforos entre el estado hipotético PIC0 y el experimental PIC1 es de $11.7 \pm 7.6 \text{ \AA}$. Esta reducción de la distancia es compatible con los cambios observados mediante mediciones de FRET intramolecular de IF3 en función de la unión de los factores IF1 e IF2 (Figura 8b). IF3, al unirse a la subunidad 30S, adoptaría la configuración observada en PIC0. Luego, con la unión de los otros factores de iniciación, la distancia entre dominios disminuiría en el estado PIC1. Con la unión del fMet-ARNt^{fMet}, los dominios se acercan inicialmente y ocurre la formación de la interacción condón-anticodón (PIC2-4).

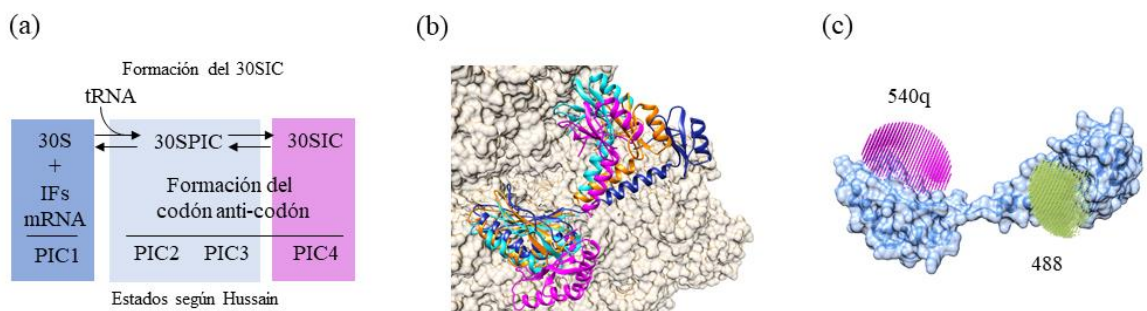


Figura 13. Análisis de cambios estructurales de IF3 en respuesta a la llegada del fMet-ARNt^{fMet}. a) Esquema de comparación entre la transición del 30S+IFs al 30S-PIC y finalmente al 30S-IC con los estados determinados por Hussain *et al.* b) Posiciones de IF3 determinadas según los estados de Hussain *et al.* PIC1 (Azul), PIC2 (Anaranjado), PIC3 (Celeste), y PIC4 (Morado). c) Volumen accesible (AV) de los fluoróforos en el IF3-DL.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Interacción de IF3 con la subunidad 30S del ribosoma.

IF3 es el primer factor que se une a la subunidad 30S del ribosoma (17) y previene que la subunidad 50S se una prematuramente con la subunidad menor (23,65,82). Estudios previos de cinéticas en estado pre-estacionario han demostrado que IF3 se une reversiblemente a la subunidad 30S, con una constante de velocidad de asociación $k_{on} = 10^3 \mu\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación $k_{off} = 0.001 \text{ s}^{-1}$ (17). Asimismo, se sugiere que luego de la primera interacción de IF3 con la subunidad 30S, puede ocurrir una reacomodación del IF3, de alguno de sus factores o del sitio de su unión en la subunidad 30S (17). Sin embargo, no se concluye cuál o cuáles ocurren, ni en qué orden.

Este trabajo mide cambios intramoleculares entre los dominios del IF3 durante los pasos de la iniciación de la traducción, lo que permite describir un mecanismo más preciso de la unión del factor a la subunidad 30S. Nuestros resultados indican que, en promedio, el factor IF3 en solución tiene sus dominios situados cerca entre sí (Figura 7). Además, se muestra que la unión de IF3 a la subunidad 30S es una reacción de dos fases, una rápida seguida de una más lenta (Figura 7), con velocidades similares a aquellas previamente descritas. Finalmente, se observa que luego de llegar a la subunidad 30S, IF3 pasa a un estado transitorio donde sus dominios se alejan (Figura 7). Estos resultados demuestran que el proceso de formación del complejo 30S-IF3 es acompañado por un reposicionamiento de los dominios de IF3 sucesivo a la primera interacción del factor con la subunidad.

Si bien los datos de cinéticas rápidas no permiten concluir la dirección que toman los dominios de IF3 al acomodarse cuando el factor llega a la subunidad 30S, se pudo aproximar la naturaleza dicho reposicionamiento mediante un análisis de estructuras de complejos 30S-IF3 publicados. Estudios previos acerca del complejo 30S-IC bacteriano indican que cada dominio de IF3 posee dos sitios de unión independientes (33,35,69,77). El dominio IF3-CTD se une alternativamente en dos posiciones en la plataforma de la subunidad 30S: una cercana a IF1, parcialmente sobre el sitio P (C1) y otra en la región 790 del ARN ribosomal (C2) (Figura 14a). Por otro lado, el dominio IF3-NTD puede interactuar con la punta de la plataforma (N1), en cercanía a la proteína ribosomal uS11, o con el ARNt de iniciación (N2) (Figura 14a) (35,69). Nuestro análisis del AV de los fluoróforos en los dominios de IF3 (Figura 13) indicaría que el IF3-CTD se posiciona en el sitio de unión C2, mientras que el NTD se une al sitio N1 en la plataforma en la unión inicial de IF3 a la subunidad 30S.

Por otro lado, estudios de sondeo químico en tiempo real sugirieron que el IF3-CTD es el primero en interactuar con la subunidad 30S, seguido inmediatamente por el IF3-NTD (62). Tomando en cuenta esto último, se puede indicar que la primera fase rápida de la unión de IF3 a la subunidad 30S correspondería a la interacción del dominio IF3-CTD con el sitio de unión C2. Posteriormente a ello, el dominio IF3-NTD se acomodaría al sitio N1 en la plataforma de la subunidad 30S en una fase más lenta.

8.2. Formación del complejo intermedio de iniciación 30S-IFs

El proceso de formación de complejos 30S-IC es rápido, en donde la unión de los tres factores de iniciación ocurre en menos de 30 ms (17). Las propiedades de unión de cada uno de los factores son afectadas por los otros de manera cooperativa: la presencia de los tres maximiza la afinidad de cada factor a la subunidad 30S (17). IF1 disminuye 100 veces la constante de velocidad de disociación de IF3 y, de manera recíproca, IF3 aumenta la afinidad de IF1 por la subunidad 30S (17). La cooperatividad entre los factores ha sido materia de controversia con dos modelos alternativos propuestos. El primero se basa en una cooperación alostérica a través de cambios conformacionales en la subunidad 30S que resulta en la reconfiguración de los sitios de unión de los factores (61,83). La segunda se basa en una interacción directa entre IF1 e IF3, la cual aumentaría la afinidad de ambas proteínas con la subunidad 30S (61,69). En ambos casos, se esperaría que la unión de IF1 modifique la disposición de IF3, ya sea por una interacción directa de IF1 con alguno de los dominios de IF3 o por cambios conformacionales en alguno de los sitios de unión de IF3.

Nuestros resultados indican que los dominios de IF3 se acercan en respuesta a la unión de IF1 con el complejo 30S-IF3 (Figura 8). La velocidad del movimiento de los dominios es similar a aquella descrita para la interacción de IF1 con la subunidad 30S (17), lo que indica que el cambio de configuración de IF3 es inmediato. De manera similar, la unión de IF2 promueve un acercamiento de los dominios, pero de menor magnitud (Figura 8). La unión IF1 e IF2 maximiza el acercamiento de los dominios de IF3; sin embargo, no se puede determinar la dirección del movimiento por esta aproximación experimental. Se ha mostrado, en estructuras del complejo

30S-PIC, que el IF3-NTD se une al sitio N1 en ausencia del ARNt (69). Adicionalmente, estas estructuras muestran que el dominio IF3-CTD, en presencia de IF1 e IF2, ocupa principalmente el sitio de unión C2. El análisis estructural de las posiciones de los fluoróforos en IF3-DL en función a dichas estructuras revela efectivamente que IF1 estaría promoviendo un reposicionamiento del dominio IF3-CTD, de su sitio C1 al C2. Este reposicionamiento correspondería a un cambio de 12.45 Å entre los fluoróforos de IF3-DL, lo cual resultaría en el cambio de FRET observado en el presente estudio (Figura 8).

El complejo 30S-IFs maximiza la afinidad de IF3 por la subunidad 30S y al mismo tiempo minimiza la asociación prematura de la subunidad 50S. En otras palabras, cuando IF3 está en el complejo 30S-IFs, su actividad de impedir la unión de la subunidad 50S en un momento incorrecto es elevada. El presente estudio postula que dicha actividad podría asociarse a un estado donde su el dominio IF3-CTD interactúa con el sitio de unión C1, mientras que el dominio IF3-NTD se une al sitio N1. Adicionalmente, el análisis cinético permite señalar que el arreglo conformacional de IF3 durante la unión de IF1 corresponde a un cambio del sitio de unión del dominio IF3-CTD y que este ocurre inmediatamente después de la llegada del otro factor.

8.3. Formación del complejo de iniciación 30S-IC

Luego de la unión de los factores de iniciación con la subunidad 30S, el siguiente componente de la iniciación que se acopla al sistema es el fMet-ARNt^{fMet}, mientras que el ARNm puede unirse a la subunidad 30S en cualquier punto del proceso (17). Los dominios de IF3 responden a la unión del fMet-ARNt^{fMet} y siguen una serie de

movimientos que corresponden a la formación del codón-anticodón (69). Ante la unión del fMet-ARNt^{fMet}, el IF3-NTD se traslada del sitio de unión N1, en la punta de la plataforma, hacia la cabeza de la subunidad 30S (N4) (Figura 14a) (69). Luego del movimiento del IF3-NTD, el IF3-NTD se posiciona del sitio de unión C2 al sitio C1 (Figura 14a) (69).

Nuestros resultados indican que los dominios de IF3 se separan en respuesta a la unión del fMet-ARNt^{fMet} y que la unión del ARNm no genera cambios en la fluorescencia (Figura 10). Los resultados experimentales de la unión del ARNt concuerdan con la aproximación estructural, en donde se determinó un aumento en la distancia entre los fluoróforos de 9.8 Å en la transición del estado PIC1 al PIC2 (Figura 13). Sin embargo, no se logró observar el acercamiento de dominios (que ocurre en PIC3), ni el movimiento del IF3-CTD que sigue y que finalmente resulta en la interacción codón-anticodón (69).

También se observó que la unión del ARNt, en ausencia de ARNm, resultó en un cambio en la distancia de los dominios con una amplitud y cinética similares a lo obtenido en la unión del ARNt a un complejo completo (Figura 10). Esto podría indicar que no se está formando la interacción codón-anticodón; sin embargo, en nuestros experimentos sobre la formación del complejo 70S-IC han demostrado que sí está ocurriendo (Figura 11). Por este motivo, es probable que los movimientos intermedios de la formación condón-anticodón estén ocurriendo y no pueden ser detectados por el *stopped-flow* debido a que la velocidad de la reacción asociada al cambio estructural del IF3-CTD es mayor que la velocidad de unión. En ese caso, el cambio de fluorescencia observado reflejaría un promedio de diversos complejos intermedios y finales. Otra alternativa es que las diferencias experimentales entre

este estudio y las aproximaciones estructurales por crio-EM (69) favorezcan la estabilidad algunos intermedios.

8.4. IF3-DL y la progresión hacia la elongación de la síntesis de proteínas.

Una vez que el complejo de iniciación se forma, y la interacción codón-anticodón es establecida, la subunidad 50S se une para formar el complejo 70S-IC y continuar con el paso de la elongación (13,56,83). Los factores de iniciación se liberan del 70S-IC para ser reciclados en un nuevo proceso de la iniciación en subunidades 30S libres (14).

En nuestros resultados, se observó que la unión de la subunidad 50S al 30S-IC resulta en una disminución de fluorescencia de IF3 (Figura 10). Esta disminución tuvo velocidades similares a aquellas reportadas previamente donde se utilizó un FRET entre IF3 y el ARNt de iniciación (17). En dicho estudio, se observó que IF3 se libera en respuesta a la llegada de la subunidad 50S y en estricta dependencia del complejo 30S-IC correctamente formado. La ausencia del ARNm y/o la presencia de codones erróneos en el mismo ocasionaban que la transición hacia la elongación se interrumpa (17,79,80). El presente trabajo no solo confirma que IF3 se disocia durante la formación del complejo 70S-IC, sino que también indica que el factor adopta una conformación donde sus dominios están cercanos entre sí.

La unión de la subunidad 50S a complejos formados en ausencia del ARNm resultó en una pérdida de la señal fluorescente, seguida de un aumento de esta (Figura 10). Esto indicaría que IF3 no se liberó de la subunidad 30S; por tanto, que no se están formando complejos 70S-IC. Esto a su vez se respalda en estudios previos donde indican que la formación de la interacción entre el codón en el ARNm y anticodón

en el fMet-ARNt^{fMet} preceden la unión de la subunidad 50S (14). La afinidad de IF3 se elevó en complejos incompletos, en correspondencia con una reducción en la velocidad de disociación (18). Nuestros resultados revelan como los dominios de IF3 podrían reacomodarse en complejos incompletos, y así prevenir la asociación prematura de la subunidad 50S.

En la célula, el fMet-ARNt^{fMet} y la subunidad 50S están presentes en concentraciones similares y al mismo tiempo comparten complejos 30S-PIC como ligando (17,62). La velocidad con la que dichos complejos reconocen la correcta formación de la interacción codón y anticodón no ha sido determinada en detalle. El sistema experimental de este estudio permitió medir por separado la velocidad de llegada del fMet-ARNt^{fMet}, a través de un aumento de la fluorescencia en IF3-DL, y la liberación del factor durante la llegada de la subunidad 50S (Figura 11). Para evaluar el comportamiento de IF3 en un contexto más fisiológico, se midieron ambas reacciones en un mismo evento de mezcla. En el caso de la llegada simultánea del ARNt y de la subunidad 50S (Figura 11), se observó como los dominios de IF3 se separan y luego se acercan, lo que corresponde a los resultados previos: la unión del fMet-ARNt^{fMet} generó un aumento de la distancia (Figura 9) y la liberación del IF3-DL resultó en un acercamiento de sus dominios (Figura 10). Sin embargo, hubo un aumento de velocidad de la separación de los dominios relacionada a la unión del ARNt. Esto indica que la presencia de la subunidad 50S agiliza el proceso de formación del 30S-IC para la formación del 70S-IC.

En ausencia del ARNm, se observó inicialmente un aumento rápido de fluorescencia, con un comportamiento similar a lo obtenido con ARNm, pero de menor amplitud; y posteriormente, un segundo aumento de la fluorescencia de una

mayor magnitud, pero velocidades más lentas. La disminución de fluorescencia observada entre estos dos aumentos podría deberse a un acercamiento de la subunidad 50S al complejo. Al no formar el complejo 70-IC, debido a la falta de la interacción codón-anticodón, IF3-DL no es liberado y la amplitud del aumento de fluorescencia final correspondería al efecto de la unión del fMet-ARNt^{fMet} a todos los complejos 30S-PIC en la reacción.

Al comparar los cambios de distancias relativas con las amplitudes resultantes de las cinéticas rápidas, se observó coherencia en la direccionalidad y amplitud relativa de los movimientos de IF3 (Figura 14b). Al no tratarse de mediciones en moléculas individuales, nuestra plataforma de mediciones no pudo detectar estados intermedios tardíos, como aquellos que ocurren durante el reconocimiento de la interacción codón-anticodón (PIC2-4) (69).

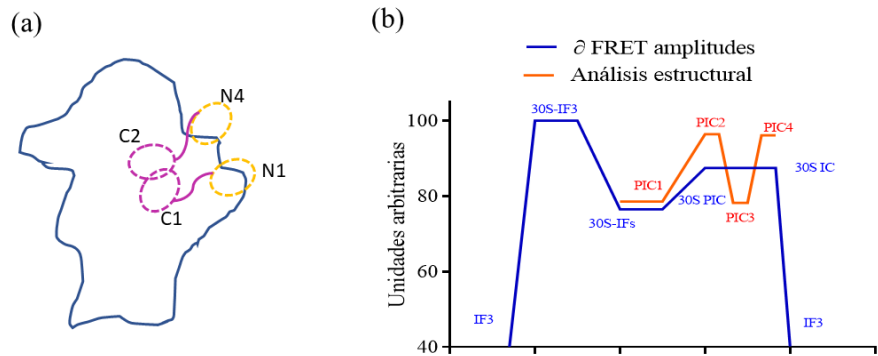


Figura 14. Esquema de amplitudes de FRET y análisis estructural. a) Esquema de la subunidad 30S mostrando los sitios de unión de los dominios de IF3 (Morado: CTD, Anaranjado: NTD). b) Comparación de cambios relativos encontrados en el análisis estructural (Anaranjado) con los cambios relativos de amplitudes de fluorescencia en los ensayos cinéticos (Azul).

8.5. La ausencia de IF3-NTD en diversos intermedios de la iniciación de la traducción

Hasta hace unos años, no había evidencia que atribuyese alguna de las funciones de regulación al dominio IF3-NTD. Todas las funciones de IF3 se atribuían al IF3-CTD (23). Sin embargo, estudios recientes muestran que el IF3-NTD interactúa con el fMet-ARNt^{fMet} y su interacción con la subunidad 30S cambia durante la iniciación (69). Estudios *in vivo* sugieren que la ausencia de este dominio, si bien no es esencial para la supervivencia de la célula, disminuye la eficiencia de la traducción, reduce el *fitness* de la célula y parece esencial para la unión de ARNts que contienen pares de GC, típicos de la iniciación (37).

Los experimentos de FRET entre el fMet-ARNt^{fMet} marcado con fluoresceína y el IF1540Q mostraron que la ausencia del IF3-NTD afectó la unión del fMet-ARNt^{fMet} fluorescente a un complejo 30S-PIC (Figura 11a). Si bien las velocidades de unión no difirieron en gran magnitud, la amplitud del cambio fue menor y fue similar al efecto de unión del ARNt a un complejo sin IF3. Esta disminución en la amplitud indica que una menor proporción de ARNts se está uniendo al complejo. En el caso de la formación del complejo 70S-IC, los resultados indican que la ausencia del IF3-NTD disminuyó la capacidad de unión de la subunidad 50S (Figura 11b). La unión ocurre rápidamente en ausencia del factor completo, lo que concuerda con estudios previos que indican que una de las principales funciones del factor es la disminución de la afinidad de la subunidad 50S al complejo (23,84). La llegada conjunta del ARNt y la subunidad 50S mostró que, en ausencia del IF3-NTD, la unión del fMet-ARNt^{fMet} fluorescente ocurrió a una menor velocidad y que el IF1 no se liberó del complejo (Figura 11c). Esto es un indicador que, en ausencia del

IF3-NTD, no se llega a formar el complejo 70S-IC en el tiempo que el experimento dura. La ausencia de cambios en la fluorescencia observada sin IF3 nos indica que la unión de la subunidad 50S sobrepasa a la unión del fMet-ARNt^{fMet} fluorescente. Esto respalda la función antagonista de IF3 a la unión de las subunidades del ribosoma (23,84).

Este trabajo y estudios recientes sugieren que el IF3-NTD facilita la unión del fMet-ARNt^{fMet}, aumentando la afinidad entre el 30S-PIC y el ARNt inicial (Figura 11). Estudios de cinéticas en estado pre-estacionario, donde se evaluó las constantes microscópicas de la interacción fMet-ARNt^{fMet} con la subunidad 30S en función de IF3, sugirieron que el factor aumentaba tanto la velocidad de asociación como la velocidad de disociación de los ARNts (25). La máxima velocidad de unión del fMet-ARNt^{fMet} era causada por la acción conjunta del IF2 e IF3 (25).

Una reducida unión del fMet-ARNt^{fMet} tendría un efecto negativo para la célula al disminuir la velocidad en la formación del complejo 30S-IC, independientemente la presencia o ausencia del ARNm. Por otro lado, la liberación de IF1Q por la llegada de la subunidad 50S fue más rápida en ausencia del IF3-NTD (Figura 12b). Es factible que la ausencia de dicho dominio tenga un efecto similar, promoviendo la unión prematura de la subunidad 50S a complejos incompletos o mal posicionados. Un efecto similar fue observado en complejos formados con estreptomicina, la cual aceleraba la formación del complejo 70S-IC, independientemente del codón de iniciación programado en el ARNm (18).

IX. CONCLUSIONES

- Los dominios de IF3 se reacomodan en la subunidad 30S durante el proceso de iniciación con velocidades aparentes entre 0.55 y 4.87 s⁻¹.
- La unión de IF3 al ribosoma y la unión del ARNt al 30S-PIC alejan los dominios de IF3, mientras que la unión de IF1 o de IF2 genera que los dominios se acerquen.
- El reconocimiento de la interacción codón-anticodón no resultó en cambios estructurales en IF3-DL detectables por el *stopped-flow*. Sin embargo, se estimó que esta reacción ocurre a una velocidad mayor que la de unión del ARNt (1.86 s⁻¹), por lo que la formación del complejo de iniciación no debería estar limitada en el tiempo por dicho reconocimiento.
- La ausencia del dominio IF3-NTD resultó en una disminución en la unión del fMet-ARNt^{fMet} hacia el complejo 30S-PIC y una formación lenta del 70S-IC.
- Los análisis estructurales de IF3 en distintas conformaciones guardaron relación con los cambios de distancia observados en ensayos de cinéticas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Green MH, Hall BD. A Comparison of the Native and Derived 30S and 50S Ribosomes of *Escherichia coli*. *Biophys J*. 1961;1(6):517–23.
2. Laursen B, Sørensen H. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol ...* [Internet]. 2005;236(3):747–71. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1996.00747.x/full%5Cnhttp://mibr.asm.org/content/69/1/101.short>
3. Butler JS, Springer M, Grunberg-Manago M. AUU-to-AUG mutation in the initiator codon of the translation initiation factor IF3 abolishes translational autocontrol of its own gene (*infC*) in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1987;84(12):4022–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=305013&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Van Etten WJ, Janssen GR. An AUG initiation codon, not codon-anticodon complementarity, is required for the translation of unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1998;27(5):987–1001.
5. Blanchard SC, Kim HD, Gonzalez RL, Puglisi JD, Chu S. tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(35):12893–8.
6. Agirrezabala X, Valle M. Structural insights into tRNA dynamics on the ribosome. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):9866–95.
7. Youngman EM, He SL, Nikstad LJ, Green R. Stop Codon Recognition by Release Factors Induces Structural Rearrangement of the Ribosomal Decoding Center that Is Productive for Peptide Release. *Mol Cell*.

- 2007;28:533–43.
8. Trobro S, Åqvist J. A Model for How Ribosomal Release Factors Induce Peptidyl-tRNA Cleavage in Termination of Protein Synthesis. *Mol Cell*. 2007;27(5):758–66.
 9. Korostelev A, Asahara H, Lancaster L, Laurberg M, Hirschi A, Zhu J, et al. Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(50):19684–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064930>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2604991>
 10. Hirokawa G, Demeshkina N, Iwakura N, Kaji H, Kaji A. The ribosome-recycling step: Consensus or controversy? *Trends Biochem Sci*. 2006;31(3):143–9.
 11. Gutteridge A, Thornton JM. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(11):622–9.
 12. Milon P, Carotti M, Konevega AL, Wintermeyer W, Rodnina M V, Gualerzi CO. The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Rep* [Internet]. 2010;11(4):312–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/embor.2010.12>
 13. Milón P, Rodnina M V. Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2012;47(January):334–48.
 14. Gualerzi CO, Pon CL. Initiation of mRNA translation in bacteria: Structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(22):4341–67.

15. Shine J, Dalgarno L. The 3'-Terminal Sequence of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1974;71(4):1342–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.71.4.1342>
16. Canonaco M a, Pon CL, Pawlik RT, Calogero R, Gualerzi CO. Relationship between size of mRNA ribosomal binding site and initiation factor function. *Biochimie* [Internet]. 1987;69(9):957–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3126833>
17. Milón P, Maracci C, Filonava L, Gualerzi CO, Rodnina M V. Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2012;19(6):609–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2285>
18. Milon P, Konevega AL, Gualerzi CO, Rodnina M V. Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation. *Mol Cell*. 2008;30(6):712–20.
19. Antoun A, Pavlov MY, Lovmar M, Ehrenberg M. How Initiation Factors Maximize the Accuracy of tRNA Selection in Initiation of Bacterial Protein Synthesis. *Mol Cell*. 2006;23(2):183–93.
20. Grigoriadou C, Marzi S, Kirillov S, Gualerzi CO, Cooperman BS. A Quantitative Kinetic Scheme for 70 S Translation Initiation Complex Formation. *J Mol Biol* [Internet]. 2007;373(3):562–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228360700959X>
21. Pon CL, Gualerzi CO. Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. *FEBS Lett* [Internet]. 1984;175(2):203–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014579384807371>

22. Huang C, Mandava CS, Sanyal S. The Ribosomal Stalk Plays a Key Role in IF2-Mediated Association of the Ribosomal Subunits. *J Mol Biol* [Internet]. 2010;399(1):145–53. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283610003608>
23. Petrelli D, La Teana A, Garofalo C, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO. Translation initiation factor IF3: Two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J*. 2001;20(16):4560–9.
24. Gualerzi C, Risuleo G, Pon CL. Initial rate kinetic analysis of the mechanism of initiation complex formation and the role of initiation factor IF-3. *Biochemistry* [Internet]. 1977;16(8):1684–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/322704>
25. Wintermeyer W, Gualerzi C. Effect of *Escherichia coli* initiation factors on the kinetics of N-Acphe-tRNA^{Phe} binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study. *Biochemistry* [Internet]. 1983;22(3):690–4. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6340723
26. Tedin K, Moll I, Grill S, Resch A, Graschopf A, Gualerzi CO, et al. Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs. *Mol Microbiol*. 1999;31(1):67–77.
27. La Teana A, Gualerzi C, Brimacombe R. From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors [Internet]. Vol. 1, *RNA* (New York, NY). 1995. p. 772–82. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7493323%5Cnpapers2://publication/uuid/03981398-B571-46CE-BCB9-32D127B2712E

28. Biou V, Shu F, Ramakrishnan V. X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact alpha/beta domains linked by an alpha-helix. *EMBO J* [Internet]. 1995;14(16):4056–64. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Garcia C, Fortier PL, Blanquet S, Lallemand JY, Dardel F. 1H and 15N resonance assignments and structure of the N-terminal domain of *Escherichia coli* initiation factor 3. *Eur J Biochem* [Internet]. 1995;228(2):395–402. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705354>
30. de Cock E, Springer M, Dardel F. The interdomain linker of *Escherichia coli* initiation factor IF3: a possible trigger of translation initiation specificity. *Mol Microbiol* [Internet]. 1999;32(1):193–202. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216872>
31. Moreau M, de Cock E, Fortier PL, Garcia C, Albaret C, Blanquet S, et al. Heteronuclear NMR studies of *E. coli* translation initiation factor IF3. Evidence that the inter-domain region is disordered in solution. *J Mol Biol* [Internet]. 1997;266(1):15–22. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054966>
32. Milón P, Maracci C, Filonava L, Gualerzi CO, Rodnina M V. Real-time

- assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2012;19(6):609–15. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.2285>
33. Fabbretti A, Pon CL, Hennelly SP, Hill WE, Lodmell JS, Gualerzi CO. The Real-Time Path of Translation Factor IF3 onto and off the Ribosome. *Mol Cell* [Internet]. 2007;25(2):285–96. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276506008690>
34. Petrelli D, Garofalo C, Lammi M, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO, et al. Mapping the Active Sites of Bacterial Translation Initiation Factor IF3. *J Mol Biol* [Internet]. 2003;331(3):541–56. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603007319>
35. Julián P, Milon P, Agirrezabala X, Lasso G, Gil D, Rodnina M V., et al. The cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from *Escherichia coli*. *PLoS Biol*. 2011;9(7):1–11.
36. Grigoriadou C, Marzi S, Pan D, Gualerzi CO, Cooperman BS. The Translational Fidelity Function of IF3 During Transition from the 30 S Initiation Complex to the 70 S Initiation Complex. *J Mol Biol* [Internet]. 2007;373(3):551–61. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607009588>
37. Ayyub S, Dobriyal D, Varshney U. Contributions of the N-terminal and C-terminal domains of initiation factor 3 towards its functions in the fidelity of initiation and anti-association of the ribosomal subunits. *J Bacteriol* [Internet]. 2017;199(11):JB.00051-17. Available from:
<http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.00051-17>

38. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 2007;130(5):797–810.
39. Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. NIH Public Access. 2009;135(4):679–90.
40. Davies JE. REVIEW ARTICLE Aminoglycosides : Ancient and Modern. 2006;59(9):529–32.
41. Wilson DN. The A–Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2009;44(6):393–433. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409230903307311>
42. Gold L, Stormo G. Translational initiation. *Escherichia coli Salmonella typhimurium Cell Mol Biol*. 1987;1302–7.
43. Rodnina M V. Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2018;a032664. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a032664>
44. Boelens R, Gualerzi CO. Structure and function of bacterial initiation factors. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2002;3(1):107–19. Available from: <http://www.eurekaselect.com/81359/article>
45. Nomura M, Lowry C V., Guthrie C. The initiation of protein synthesis: joining of the 50S ribosomal subunit to the initiation complex. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1967;58(4):1487–93. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.58.4.1487>
46. Allen GS, Frank J. Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol* [Internet].

- 2007;63(4):941–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05574.x>
47. de Smit MH, van Duin J. Translational initiation on structured messengers. *J Mol Biol* [Internet]. 1994;235(1):173–84. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605800245>
 48. Osterman IA, Evfratov SA, Sergiev P V., Dontsova OA. Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):474–86.
 49. Espah Borujeni A, Channarasappa AS, Salis HM. Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at upstream standby sites. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(4):2646–59.
 50. Carter a P, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Hartsch T, Wimberly BT, et al. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science.* 2001;291(5503):498–501.
 51. Simonetti A, Marzi S, Myasnikov AG, Fabbretti A, Yusupov M, Gualerzi CO, et al. Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature* [Internet]. 2008;455(7211):416–20. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07192>
 52. Studer SM, Joseph S. Unfolding of mRNA Secondary Structure by the Bacterial Translation Initiation Complex. *Mol Cell* [Internet]. 2006;22(1):105–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727650600116X>
 53. Eiler D, Lin J, Simonetti A, Klaholz BP, Steitz T a. Initiation factor 2

- crystal structure reveals a different domain organization from eukaryotic initiation factor 5B and mechanism among translational GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(39):15662–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3785736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Spurio R, Brandi L, Caserta E, Pon CL, Gualerzi CO, Misselwitz R, et al. The C-terminal subdomain (IF2 C-2) contains the entire fMET-tRNA binding site of initiation factor IF2. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2447–54.
 55. Severini M, Spurio R, Teana a. L, Pon CL, Gualerzi CO. Ribosome-independent GTPase activity of translation initiation factor IF2 and of its G-domain. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22800–2.
 56. Goyal A, Belardinelli R, Maracci C, Milón P, Rodnina M V. Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(22):10700–12.
 57. Milon P, Tischenko E, Tomsic J, Caserta E, Folkers G, La Teana A, et al. The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006;103(38):13962–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606384103>
 58. Fivush R. *HHS Public Access*. 2015;25(4):368–79.
 59. Antoun A, Pavlov MY, Lovmar M, Ehrenberg M. How initiation factors tune the rate of initiation of protein synthesis in bacteria. *EMBO J* [Internet]. 2006;25(11):2539–50. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601140>
 60. Chulluncuy R, Espiche C, Nakamoto JA. Allosteric perturbations of the

- 30S platform by A-site binders Streptomycin and Kanamycin. 2016;1–24.
61. Dallas a, Noller HF. Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol Cell*. 2001;8(4):855–64.
 62. Fabbretti A, Milon P, Giuliadori AM, Gualerzi CO, Pon CL. Real-Time Dynamics of Ribosome-Ligand Interaction by Time-Resolved Chemical Probing Methods. 2007;430(07):45–58. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687907300037>
 63. January FL, Pawlik RT. Hypothesis THE TOPOGRAPHICAL LOCALIZATION OF IF3 ON. 1982;137(2):0–4.
 64. MacDougall DD, Gonzalez RL. Translation Initiation Factor 3 Regulates Switching between Different Modes of Ribosomal Subunit Joining. *J Mol Biol [Internet]*. 2015;427(9):1801–18. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283614005270>
 65. Maar D, Liveris D, Sussman JK, Ringquist S, Moll I, Heredia N, et al. A Single Mutation in the IF3 N-Terminal Domain Perturbs the Fidelity of Translation Initiation at Three Levels. *J Mol Biol [Internet]*. 2008;383(5):937–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283608011340>
 66. Forster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*. 1946;33(6):166–75.
 67. Journal THE. Mapping of Yeast Cytochrome Resonance Energy Transfer c Oxidase by Fluorescence. 1978;(1).
 68. Milon P, Konevega AL, Peske F, Fabbretti A, Gualerzi CO, Rodnina M V. Transient Kinetics, Fluorescence, and FRET in Studies of Initiation of

- Translation in Bacteria. 2007;430(07):1–30. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687907300013>
69. Hussain T, Llacer JL, Wimberly BT, Kieft JS, Ramakrishnan V. Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation. *Cell*. 2016;167(1):133–144.e13.
 70. Gelband H. the State of the World ' S Antibiotics. *State World ' S Antibiot*. 2015;8(2):30–4.
 71. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current*. 2013;114. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>
 72. de Kraker MEA, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*. 2016;13(11):1–6.
 73. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2013;12(1):35–48. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3155>
 74. Bernasconi CF. *Basic Principles*. De: Bernasconi CF. *Relaxation Kinetics*. New York: Academic Press INC; 1976;288.
 75. Kalinin S, Peulen T, Sindbert S, Rothwell PJ, Berger S, Restle T, et al. A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nat Methods*. 2012;9(12):1218–25. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2222>
 76. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research

- and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605–12.
77. López-Alonso JP, Fabbretti A, Kaminishi T, Iturrioz I, Brandi L, Gil-Carton D, et al. Structure of a 30S pre-initiation complex stalled by GE81112 reveals structural parallels in bacterial and eukaryotic protein synthesis initiation pathways. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;gkw1251. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1251>
78. Myasnikov AG, Marzi S, Simonetti A, Giuliodori AM, Gualerzi CO, Yusupova G, et al. Conformational transition of initiation factor 2 from the GTP- to GDP-bound state visualized on the ribosome. *Nat Struct & Mol Biol* [Internet]. 2005;12(12):1145–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb1012>
79. Goyal A, Belardinelli R, Rodnina M V. Non-canonical Binding Site for Bacterial Initiation Factor 3 on the Large Ribosomal Subunit. *Cell Rep* [Internet]. 2017;20(13):3113–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124717312731>
80. Antoun A, Pavlov MY, Tenson T, Ehrenberg MM. Ribosome formation from subunits studied by stopped-flow and Rayleigh light scattering. *Biol Proced Online* [Internet]. 2004;6(1):35–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15103398
81. Celano B, Pawlik RT, Gualerzi CO. Interaction of *Escherichia coli* translation-initiation factor IF-1 with ribosomes. *Eur J Biochem* [Internet]. 1988;178(2):351–5. Available from:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14457.x/full>
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14457.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3061814>

82. Pon C, Cannistraro S, Giovane A, Gualerzi C. Structure-Function Relationship in Escherichia coli Initiation Factors Escherichia coli translational initiation factor IF3 contains a single Cys residue at position 66 of its primary structure . The environment and the relevance of this residue for the. 1982;217(1).
83. Qin D, Fredrick K. Control of translation initiation involves a factor-induced rearrangement of helix 44 of 16S ribosomal RNA. Mol Microbiol. 2009;71(January):1239–49.
84. Pon CL, Gualerzi CO. Mechanism of translational initiation in prokaryotes. IF3 is released from ribosomes during and not before 70 S initiation complex formation. FEBS Lett. 1986;195(1–2):215–9.

ANEXOS

Tabla S1. Parámetros cinéticos de las reacciones del *stopped-flow*. Se muestra el valor para cada parámetro y su desviación estándar.

Reacción	A	B	E ¹	k _{app1} (s ⁻¹)	k _{app2} (s ⁻¹)	k _{app3} (s ⁻¹)	F1 (u. a.) ²	F2 (u. a.)	F3 (u. a.)
1	IF3-DL	30S	2exp	4.87±0.162	0.47±0.011	-	0.38±0.006	0.26±0.004	-
2	30S+IF3-DL	IF1	2exp	0.55±0.021	0.11±0.017	-	0.11±0.004	0.04±0.003	-
3	30S+IF3-DL	IF2	2exp	2.50±0.282	0.30±0.035	-	0.02±0.001	0.01±0.001	-
4	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP	ARNm	-	-	-	-	-	-	-
5	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP	ARNt	2exp	1.86±0.093	0.16±0.011	-	0.05±0.001	0.02±0.001	-
6	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP+ARNm	ARNt	2exp	1.45±0.071	0.12±0.007	-	0.04±0.001	0.03±0.001	-
7	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP+ARNm+ARNt	50S	2exp	0.55±0.012	0.05±0.001	-	0.04±0.001	0.04±0.000	-
8	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP+ARNt	50S	2exp	0.71±0.024	0.04±0.001	-	0.08±0.001	0.07±0.000	-
9	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP+ARNm	50S+ARNt	2exp	3.51±0.141	0.11±0.001	-	0.11±0.003	0.07±0.001	-
10	30S+IF3-DL+IF1+IF2+GTP	50S+ARNt	3exp	4.01±0.684	0.37±0.034	0.07±0.002	0.07±0.006	0.08±0.004	0.13±0.004
11	30S+IF3+IF1Q+IF2+GTP+ARNm	ARNt-Flu	2exp	0.69±0.013	0.05±0.001	-	0.25±0.001	0.11±0.001	-
12	30S+IF3-CTD+IF1Q+IF2+GTP +ARNm	ARNt-Flu	2exp	0.04±0.003	0.62±0.007	-	0.07±0.001	0.11±0.001	-
13	30S+IF1Q+IF2+GTP+ARNm	ARNt-Flu	2exp	0.03±0.002	0.53±0.004	-	0.09±0.001	0.18±0.001	-
14	30S+IF3+IF1Q+IF2+GTP+ARNm +ARNt-Flu	50S	2exp	0.67±0.011	0.09±0.001	-	0.30±0.001	0.10±0.001	-
15	30S+IF3-CTD+IF1Q+IF2+GTP+ARNm+ARNt-Flu	50S	2exp	2.91±0.072	0.12±0.002	-	0.21±0.003	0.08±0.001	-
16	30S+IF1Q+IF2+GTP+ARNm +ARNt-Flu	50S	2exp	2.27±0.523	5.73±1.182	-	0.09±0.052	0.18±0.049	-
17	30S+IF3+IF1Q+IF2+GTP+ARNm	ARNt-Flu+50S	2exp	0.76±0.012	0.05±0.001	-	0.24±0.001	0.22±0.001	-
18	30S+IF3-CTD+IF1Q+IF2+GTP +ARNm	ARNt-Flu+50S	2exp	0.03±0.001	0.42±0.009	-	0.11±0.001	0.07±0.001	-
19	30S+IF1Q+IF2+GTP+ARNm	ARNt-Flu+50S	2exp	0.72±0.06	0.08±0.002	-	0.02±0.001	0.03±0.001	-

1. Numero de fases exponenciales de la regresión no lineal.
2. Unidades arbitrarias de fluorescencia.

Tabla S2. Distancia entre los AV de los fluoróforos en las estructuras de Hussain *et al.* Se muestra el promedio de la distribución de frecuencias y su desviación estándar.

Donador ¹	Acceptor ²	Distancia (Å)
PIC1A	PIC1A	44.38 ± 7.21
PIC2C	PIC2C	54.01 ± 5.26
PIC3	PIC3	48.56 ± 4.52
PIC4	PIC4	54.29 ± 5.92
PIC1A	PIC4	56.93 ± 6.77
PIC1A	PIC2C	55.87 ± 6.39
PIC1A	PIC3	53.26 ± 5.66
PIC2C	PIC1A	42.86 ± 5.97
PIC2C	PIC3	51.13 ± 4.52
PIC2C	PIC4	53.75 ± 5.55
PIC3	PIC1A	37.83 ± 5.84
PIC3	PIC2C	50.46 ± 5.35

1. Volumen accesible del fluoróforo donador correspondiente a la posición del NTD en dicho intermediario de la iniciación.
2. Volumen accesible del *quencher* correspondiente a la posición del CTD en dicho intermediario de la iniciación.