

An. R. Acad. Nac. Farm., 2010, 76 (1): 119-136

## **Nobel de Química 2009: estructura atómica de la maquinaria celular para sintetizar proteínas**

**Carlos Fernández Tornero \***

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

### **RESUMEN**

El Premio Nobel de Química de 2009 ha sido otorgado a Venkattraman Ramakrishnan (MRC Laboratory of Molecular Biology, Reino Unido), Thomas Steitz (Yale University, Estados Unidos) y Ada Yonath (Weizmann Institute of Science, Israel) por sus estudios sobre la estructura y función del ribosoma, la máquina macromolecular que lleva a cabo la síntesis de proteínas dentro de la célula. Los científicos, en un extraordinario esfuerzo de más de veinte años, aplicaron la cristalografía de rayos X para determinar la estructura atómica de este enorme complejo macromolecular, de forma aislada y en asociación con los principales componentes que intervienen en el proceso de síntesis proteica. Los modelos resultantes han sido esenciales para entender los mecanismos que subyacen a dicho proceso, en particular cómo el ribosoma es capaz de descifrar el ARN de mensajero (que porta la información genética contenida en el ADN), cómo procede la catálisis del enlace peptídico, y el modo en que varios antibióticos nos defienden de las infecciones bacterianas.

**Palabras clave:** Ribosoma; Traducción; Síntesis de proteínas; Cristalografía de rayos X; Antibióticos.

## ABSTRACT

### **Nobel Prize in Chemistry 2009: atomic structure of the cellular machinery for protein synthesis**

The 2009 Nobel Prize in Chemistry has been awarded to Venkatraman Ramakrishnan (MRC Laboratory of Molecular Biology, United Kingdom), Thomas Steitz (Yale University, United States) and Ada Yonath (Weizmann Institute of Science, Israel) for their studies in the structure and function of the ribosome, a macromolecular machine that carries out protein synthesis within the cell. The scientists, in an incredible *tour de force* that took over twenty years, applied X-ray crystallography in order to determine the atomic structure of this large macromolecular complex, alone and in association with the major components in the protein synthesis process. The resulting models have been essential to understand the mechanisms underlying this process, in particular how the ribosome is able to decode messenger RNA (which carries the genetic information stored in DNA), how peptide bond catalysis proceeds, and the way in which several antibiotics protect us from bacterial infections.

**Keywords:** Ribosome; Translation; Protein synthesis; X-ray crystallography; Antibiotics.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ribosoma es sin duda uno de los complejos macromoleculares más importantes de la célula. Junto con la ARN polimerasa, otra máquina macromolecular esencial para la vida, lleva a cabo el paso de la información genética contenida en el ADN hasta las proteínas, que son las encargadas de realizar las diferentes funciones celulares. Este proceso de transferencia de información que, dada su relevancia, es conocido como Dogma Central de la Biología Molecular (1), ocurre en dos etapas. En la primera, la ARN polimerasa transcribe el mensaje genético contenido en la doble cadena de ADN a una molécula similar pero de cadena sencilla denominada ARN mensajero (ARNm). Durante la segunda, el ribosoma traduce la informa-

ción contenida en el ARNm a proteínas, mediante polimerización de los aminoácidos a través de la catálisis del enlace peptídico.

Hace tan sólo tres años, Roger Kornberg, hijo de otro eminente científico que compartiera el Premio Nobel de Medicina con Severo Ochoa en 1959, fue galardonado con el Nobel de Química por la determinación de la estructura atómica del primer componente del dogma, la ARN polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae*, empleando la técnica de cristalografía de rayos X. Con el Nobel de este año, otorgado a Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz y Ada Yonath por la determinación de la estructura atómica del ribosoma bacteriano mediante la misma técnica, se cierra una de las páginas más apasionantes de la investigación en el campo de la Biología Molecular.

## **2. LA CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X ES UN MÉTODO ESENCIAL PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MACROMOLÉCULAS**

La cristalografía de rayos X permite determinar la disposición espacial de los átomos dentro de un cristal. De manera esquemática consta de tres etapas fundamentales. La primera, también a menudo la más complicada, consiste en la obtención de un cristal tridimensional. Resulta esencial que los cristales posean un elevado grado de orden interno, pues esto determina que la estructura final tenga un nivel de detalle máximo, la llamada resolución atómica, que está por debajo de unos 3,5 ångströms (Å). En la segunda el cristal es expuesto a un haz de rayos X, lo que produce imágenes de difracción. La tercera consiste básicamente en una serie de cálculos matemáticos que permiten determinar, a partir de dichas imágenes, la estructura atómica del cristal.

Su aplicación al estudio de las macromoléculas data de los años cincuenta, cuando hizo posible determinar las estructuras atómicas del ADN (2) y de algunas proteínas globulares (3, 4). En 1962 ambos trabajos fueron reconocidos con sendos Premios Nobel, en Medicina y Química, respectivamente. Desde entonces se han determinado varias decenas de miles de estructuras macromoleculares mediante la aplicación de esta técnica. En algunos casos, como el centro de reacción fotosintético, la ATPasa, los canales iónicos o la ya mencio-

nada ARN polimerasa, ha merecido la concesión del Premio Nobel de Química al haber hecho posible la comprensión de procesos biológicos clave.

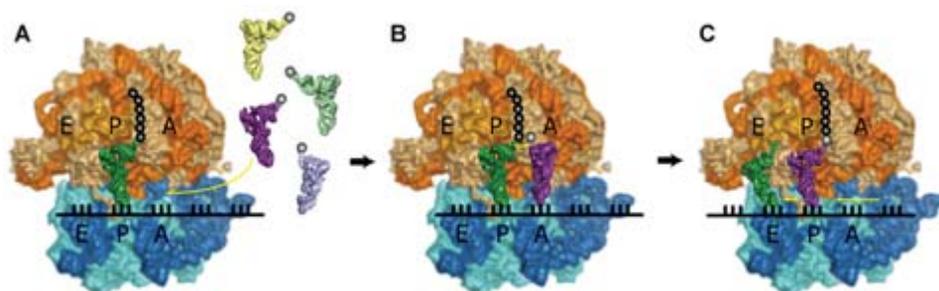
La relevancia de la cristalografía de rayos X radica en que produce fotografías tridimensionales al más alto grado de detalle (la resolución atómica) de una determinada macromolécula. Esto permite integrar toda la información bioquímica conocida hasta entonces en una distribución espacial, ayudando así a comprender mejor la función de dicha macromolécula. En el caso además de que se trate de un estudio con interés biomédico, las estructuras atómicas pueden servir de base para el diseño racional de compuestos orgánicos capaces de modificar su actividad y que, en ocasiones, terminan por convertirse en fármacos eficaces contra una determinada enfermedad.

### **3. EL RIBOSOMA ES UNA MÁQUINA NANOSCÓPICA PARA SINTETIZAR PROTEÍNAS**

El ribosoma es una ribonucleoproteína de gran tamaño, con una masa que alcanza los 2,5 MDa en el caso de las bacterias y unos 4 MDa en las células eucarióticas. Consta de dos subunidades de tamaño diferente que poseen funciones distintas, correspondiendo la catálisis del enlace peptídico a la más grande y la descodificación del código contenido en el ARNm a la pequeña. En las bacterias, la subunidad grande (que recibe el nombre de 50S) consta de unas 30 proteínas y de dos cadenas de ARN ribosómico (ARNr) que comprenden unos 3.000 nucleótidos, mientras que la pequeña (llamada 30S) contiene una sola cadena de ARNr de unos 1.500 nucleótidos y unas 20 proteínas. El ribosoma bacteriano completo se conoce con el nombre de 70S.

Para sintetizar las proteínas, el ribosoma se basa en el molde que le proporciona la ARN polimerasa durante la etapa de transcripción, es decir, el ARNm. Se trata de una molécula lineal compuesta por nucleótidos que sólo pueden ser leídos por el ribosoma en grupos de tres, denominados codones (Figura 1). Los sustratos que emplea el ribosoma son los ARN de transferencia (ARNt), moléculas en forma de L que portan los aminoácidos individuales en uno de sus ex-

tremos y, en el otro, contienen una secuencia de tres nucleótidos complementarios a los codones, llamada anticodón. La secuencia de nucleótidos del anticodón determina el aminoácido que es transportado por un determinado ARNt. El ribosoma presenta tres sitios de unión diferentes para los ARNt. El sitio P (o del peptidilo) aloja al ARNt que porta la cadena polipeptídica en curso de síntesis. El sitio A (o del aminoacilo) recibe al ARNt que trae el nuevo aminoácido para ser incorporado a la cadena polipeptídica tras la catálisis. El sitio E (o de salida) alojará al ARNt vacío que se genera tras cada ciclo de catálisis.



**Figura 1. Las tres etapas fundamentales del proceso de elongación: descodificación (A), catálisis (B) y traslocación (C).** El ribosoma está representado con las subunidades 50S y 30S en naranja y azul, respectivamente (en ambos casos el ARNr se ha coloreado más claro y las proteínas más oscuras). El ARNm se muestra como una línea recta negra, y sus nucleótidos se han apilado artificialmente en grupos de tres para destacar los codones. Los aminoácidos aparecen como círculos grises, bien unidos directamente a un extremo de los ARNt (moléculas con forma de L) o bien formando la cadena polipeptídica. Las flechas amarillas indican los movimientos más importantes que ocurren en cada una de las etapas (selección del ARNt correcto, transferencia del peptidilo y deslizamiento del molde y los sustratos).

Se pueden distinguir tres etapas fundamentales en la síntesis proteica: iniciación, en la que se ensamblan las dos subunidades del ribosoma con el ARNm y el primer ARNt; elongación, en la que se produce la polimerización de la cadena polipeptídica; y terminación, en la que se libera la proteína recién sintetizada y se reciclan los componentes del ribosoma. La elongación es un proceso repetitivo en el que cada ciclo, que corresponde a la adición de un aminoácido, consta a su vez de tres pasos (Figura 1). El primero, conocido con

el nombre de descodificación del ARNm, se lleva a cabo en la subunidad 30S y consiste en la elección del ARNt correcto entre los muchos posibles, por apareamiento de su anticodón con el codón colocado en el sitio A. El segundo es la catálisis del enlace peptídico, que ocurre en la subunidad 50S y conlleva la transferencia del peptidilo desde el ARNt del sitio P al ARNt del sitio A. El tercero es la traslocación de los sustratos y el molde a lo largo del ribosoma, por la que el ARNt vacío del sitio P pasa al sitio E, el ARNt del sitio A que ahora porta la cadena polipeptídica pasa al sitio P, y un nuevo codón entra en el sitio A, quedando preparado para un nuevo ciclo de adición de aminoácido.

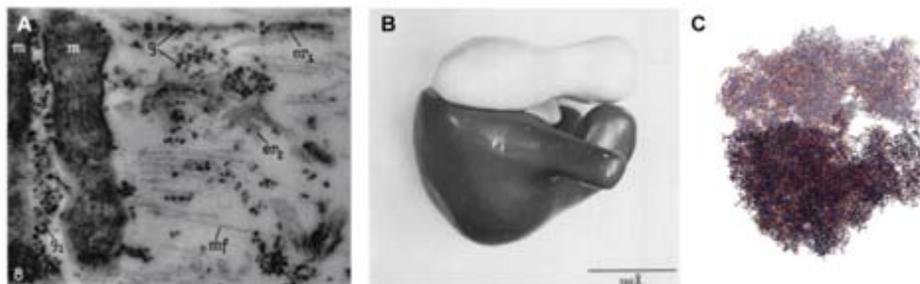
#### **4. UNA CIERTA PERSPECTIVA HISTÓRICA**

La secuencia de acontecimientos que han desembocado en la concesión del Premio Nobel de Química de este año no es sólo interesante en sí misma, sino que también nos ayuda a comprender la evolución de la cristalografía de rayos X durante los últimos cincuenta años y su impacto en el campo de la Biología Molecular.

Los ribosomas fueron visualizados por primera vez a mediados de los cincuenta por Palade (5) utilizando la técnica de microscopía electrónica (ME) sobre células enteras sombreadas con tinción negativa (Figura 2A), por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en 1974.

Los avances técnicos en ME y el desarrollo de métodos computacionales de proyección inversa permitieron a Lake conseguir la primera estructura tridimensional del ribosoma bacteriano años más tarde (6). Esta estructura fue obtenida a partir de reconstrucciones independientes de cada subunidad del ribosoma, seguida de una composición del ribosoma completo a partir de ellas. Aunque la resolución era todavía muy limitada, sí que resultaba posible distinguir ciertos detalles en ambas subunidades (Figura 2B).

Fue en esa misma década cuando se iniciaron los primeros trabajos encaminados a la obtención de la estructura atómica del ribosoma. Al tratarse de un ensamblaje macromolecular de gran tamaño y sin simetría, no estaba claro si sería posible conseguir cristales tridimensionales que difractaran a alta resolución. Este primer esco-



**Figura 2. Evolución histórica de la caracterización estructural del ribosoma.** **A)** Primera imagen de ME de tinción negativa de los ribosomas, que se observan como puntos negros dentro de la célula (extraída de la referencia 5). **B)** Primera estructura tridimensional del ribosoma bacteriano obtenida mediante ME, con subunidades las 50S y 30S coloreadas en negro y blanco, respectivamente (extraída de la referencia 6). **C)** Estructura atómica del ribosoma bacteriano a 2.8 Å de resolución obtenida mediante cristalografía de rayos X (7) a una escala similar a B). Los átomos de N, O y S aparecen en azul, rojo y verde, respectivamente, mientras que los de C se han coloreado en negro para la subunidad 50S y gris claro para 30S.

llo fue salvado por el laboratorio de Yonath durante la década de los ochenta, logrando producir cristales de calidad creciente de las subunidades 50S y 30S, que a principios de los años noventa ya difractaban a resolución atómica. Además, este grupo consiguió en la misma época obtener cristales del ribosoma bacteriano completo, aunque todavía con capacidad de difracción limitada (8).

Sin embargo, hubo que esperar casi otra década para que el desarrollo de métodos avanzados de colección de datos de difracción y de determinación estructural (ver más arriba) permitiera obtener la estructura atómica de ambas subunidades de forma aislada. En primer lugar se determinó la estructura atómica de 50S de la arqueobacteria *Haloarcola marismuorti* en el equipo de Steitz, mediante un laborioso proceso de cálculo de las fases a resoluciones crecientes hasta llegar a la estructura atómica (9). Ese mismo año y de forma independiente, los laboratorios de Ramakrishnan y Yonath obtuvieron la estructura de la subunidad 30S de la bacteria *Thermus thermophilus* (10, 11). El año siguiente, Yonath determinó la estructura atómica de 50S de la eubacteria *Deinococcus radiodurans*, que ha resultado crucial para el estudio del mecanismo de acción de algunos antibióticos (12).

La estructura del ribosoma bacteriano completo, aunque a resolución intermedia, fue determinada por primera vez en 2001 en el laboratorio de Harry Noller, científico que de no estar limitado el reparto del Nobel a tres personas habría sin duda pertenecido al grupo de galardonados (13). Fue precisamente un investigador formado en su laboratorio quien cuatro años más tarde obtuviese por fin la estructura atómica de 70S vacío (14), es decir, en ausencia de molde y sustratos. El equipo de Ramakrishnan cristalizó y determinó la estructura atómica del ribosoma de *Thermus thermophilus* en presencia de ARNm y ARNt a una resolución de 2,8 Å (7), que representa la descripción más completa y detallada de que disponemos de esta enorme máquina macromolecular (Figura 2C).

## **5. LO QUE LAS ESTRUCTURAS ATÓMICAS NOS HAN DESVELADO SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIBOSOMA**

### **5.1. Descodificación del ARN mensajero**

Durante el proceso de iniciación, la acción coordinada de tres proteínas independientes llamadas factores de iniciación permite el ensamblaje de los cuatro componentes necesarios para comenzar el proceso de traducción. En primer lugar, el ARNm se une a la subunidad 30S por apareamiento de la secuencia Shine-Dalgarno, con lo que el primer codón (AUG) queda posicionado en el sitio P de dicha subunidad. Entonces los factores de iniciación colocan el primer ARNt, que porta siempre el aminoácido formil-metionina, de forma que su anticodón aparece con el codón de iniciación en el sitio P. Por último, se acopla la subunidad 50S y se liberan los factores de iniciación, quedando el ribosoma listo para comenzar la fase de elongación de la cadena polipeptídica.

En ese punto el segundo codón del ARNm se encuentra en el sitio A de la subunidad 30S. El ribosoma debe entonces tener la capacidad de seleccionar el ARNt adecuado, es decir, el que posee un anticodón complementario al codón en el sitio A, para que el siguiente aminoácido añadido a la cadena polipeptídica sea el correcto. Si este proceso, conocido con el nombre de descodificación, no fuera realizado con alta fidelidad, las proteínas producidas po-

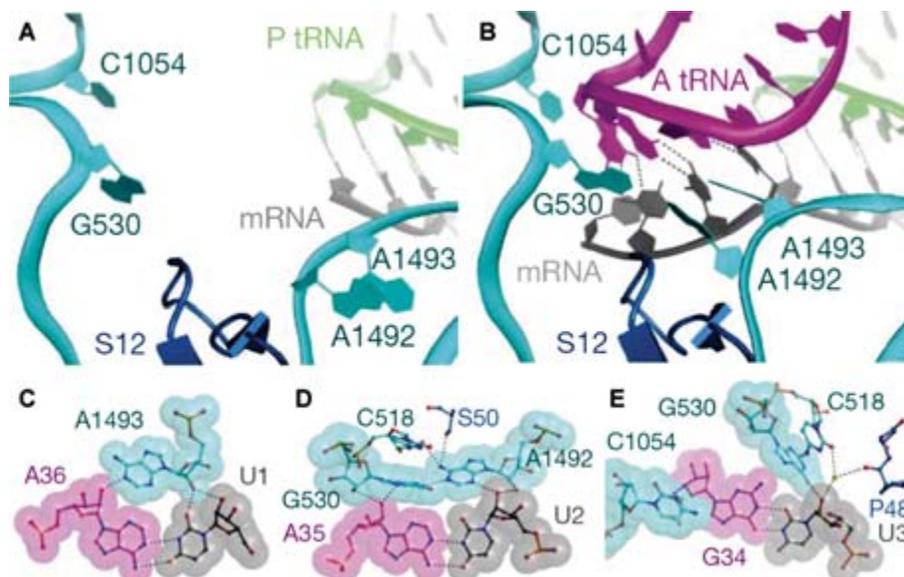
drían contener mutaciones, lo que tendría graves consecuencias para la vida de la célula. El problema dista de resultar sencillo, pues existen unos 50 ARNt diferentes en la célula bacteriana, que portan los 20 aminoácidos distintos que constituyen las proteínas.

Las estructuras atómicas de la subunidad 30S con el sitio A vacío y ocupado por un ARNt correctamente apareado con el ARNm, determinadas en el grupo de Ramakrishnan, han mostrado cómo se produce el proceso de descodificación (15). Al comparar ambas estructuras (Figura 3A-B) se observa que tres bases nitrogenadas del ARNr de 30S, concretamente G530, A1492 y A1493, cambian drásticamente su conformación cuando el ARNt correcto aparece con el codón situado en el sitio A de la subunidad 30S. Sólo en este caso, es decir, cuando se han formado los puentes de hidrógeno Watson-Crick entre los nucleótidos de codón y anticodón, las tres bases anteriores crean una nueva red de puentes de hidrógeno que de alguna manera fijan al ARNt en el sitio A y no le permiten disociarse del ribosoma. Dicha red se ve reforzada, aunque su contribución sea menor, por tres residuos de la proteína S12.

Cabe destacar que los puentes de hidrógeno formados en las posiciones 1 y 2 del par codón/anticodón dependen exclusivamente de que se produzca un apareamiento correcto en los nucleótidos de estas posiciones, mientras que los puentes de hidrógeno establecidos en posición 3 permiten una cierta incorrección en el apareamiento (Figura 3C-E). Esto explica de manera simple el conocido hecho de la redundancia del código genético, por el que 20 aminoácidos están conjugados con unos 50 ARNt diferentes.

Cuando el ARNt que llega al sitio A no es el correcto, la red de puentes de hidrógeno creada por G530, A1492 y A1493 no puede formarse, y por tanto, dicho ARNt no quedará fijado y se disociará fácilmente del ribosoma. Por tanto, el simple cambio conformacional de tres bases nitrogenadas (y otros tantos residuos en la proteína S12) constituye el fundamento que permite la fidelidad del ribosoma, hecho sorprendente si se tiene en cuenta que este complejo macromolecular está compuesto por unos 4.500 nucleótidos y alrededor de 50 proteínas.

La secuencia de acontecimientos que siguen al proceso de descodificación ha sido minuciosamente descrita en un reciente trabajo



**Figura 3. Proceso de descodificación. A-B)** Las tres bases descodificadoras A1492, A1493 y G530 cambian drásticamente su conformación al unirse el aminoacil-ARNt correcto en el sitio A. El ARNr está coloreado en azul claro, la proteína S12 en azul oscuro, el ARNm en gris, el peptidil-ARNt del sitio P en verde y el aminoacil-ARNt en morado. **C-E)** Red de puentes de hidrógeno (representados con líneas de puntos) que se establece entre el par codón/anticodón y las bases descodificadoras de la subunidad 30S, que es más estricta en los casos de las posiciones 1 y 2 (C, D) que en el caso de la posición 3 (E). Figura extraída de Schmeing & Ramakrishnan (16), a lo que se debe la nomenclatura en inglés.

(aparecido el mismo mes en el que se anunció la concesión del Nobel) del laboratorio de Ramakrishnan (17). El ARNt, que llega al ribosoma en un complejo ternario con el factor de elongación EF-Tu y una molécula de GTP, sufre una distorsión en su estructura al quedar fijado por las tres bases nitrogenadas descodificadoras. Esto provoca un importante cambio conformacional en EF-Tu que conduce a la hidrólisis de la molécula de GTP, con lo que EF-Tu se separa del ribosoma. El ARNt, liberado entonces de la distorsión provocada durante la descodificación, recupera su estructura de mínima energía de forma espontánea. Como consecuencia de dicho proceso, que se conoce con el nombre de *acomodación*, su extremo aminoacil pasa a ocupar el sitio A de 50S en el sitio activo del ribosoma, quedando así preparado para la catálisis.

## 5.2. Catálisis del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico, una de las reacciones más importantes de la Biología Molecular, ocurre en el sitio activo del ribosoma y permite añadir un aminoácido a la cadena polipeptídica que se está sintetizando para dar lugar a una proteína. La reacción consiste en un ataque nucleofílico del átomo de N en el grupo amino libre del aminoácido que porta el ARNt del sitio A, sobre el átomo de C del grupo carbonilo del último aminoácido de la cadena polipeptídica que está conjugado mediante enlace éster con el ARNt del sitio P. Como consecuencia, la cadena polipeptídica (o peptidilo) pasa del ARNt del sitio P al del sitio A, alargándose en un aminoácido y quedando el primer ARNt vacío.

Aunque el fundamento químico de la reacción se conocía desde los años setenta, el papel catalítico del ribosoma, que en la célula permite llevar a cabo dicha reacción a una velocidad aproximada de 20 aminoácidos por segundo, era un misterio. Entre otros, el debate se centraba en si su poder catalítico residía en su ARNr, lo que implicaría que se trata de una ribozima y, por tanto, sustentaría la hipótesis de la existencia de un mundo del ARN previo al mundo de las proteínas que conocemos en la actualidad.

Las estructuras atómicas de la subunidad 50S vacía y en complejo con diversos análogos de los sustratos, intermedios y productos de reacción obtenidas en el laboratorio de Steitz han permitido comprender cómo ocurre la catálisis del enlace peptídico con un elevado nivel de detalle (18-20). La reacción se lleva a cabo en el llamado Centro de Transferencia del Peptidilo (PTC, en sus siglas inglesas), que se encuentra en el corazón de la subunidad 50S, protegido del disolvente por la subunidad 30S, y en donde existen dos surcos que corresponden con los sitios A y P (Figura 4A-B). Los últimos tres nucleótidos de los ARNt (un triplete que siempre es CCA) son reconocidos por nucleótidos complementarios del ARNr de 50S, con los que aparean. Esto provoca un cambio conformacional en 50S que coloca los sustratos en una posición óptima para el ataque nucleofílico (Figura 4C).

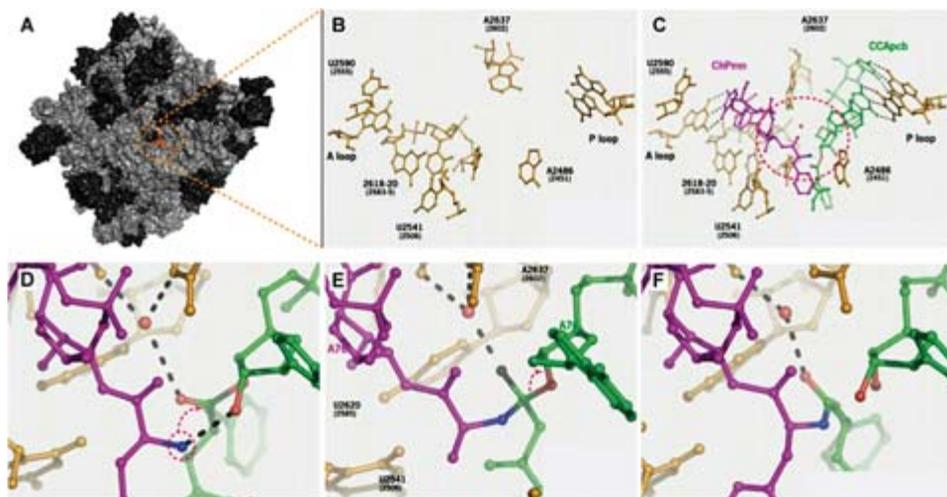
El átomo de N en el grupo amino libre del aminoácido que porta el ARNt del sitio A (en morado) es parcialmente desprotonado por

el grupo hidroxilo en posición 2' del último nucleótido del ARNt en el sitio P (en verde), quedando así con una cierta carga negativa que lo convierte en nucleófilo. A su vez, una molécula de agua colocada en un lugar estratégico por el ARNr de 50S, de manera indirecta, empobrece en electrones el átomo de C del grupo carbonilo del último aminoácido de la cadena polipeptídica que está conjugado mediante enlace éster con el ARNt del sitio P, convirtiéndolo en un electrófilo (Figura 4D). El ataque propiamente dicho, se produce entonces de forma espontánea (Figura 4E), dando lugar a la transferencia de la cadena polipeptídica del ARNt del sitio P al del sitio A y quedando el primero vacío (Figura 4F).

Estos resultados, combinados con diversos estudios enzimáticos (21), han permitido concluir que la principal fuerza catalítica del ribosoma es la colocación de los sustratos en una posición y orientación idóneas para que se produzca la reacción, no participando de modo directo en la catálisis. Esto, unido al reciente trabajo del laboratorio de Ramakrishnan en el que se demuestra la participación de ciertos residuos de las proteínas L12 y L16 en el posicionamiento de los ARNt (22), sugiere que la idea de que el ribosoma es una ribozima debe ser tomada con cautela.

La siguiente etapa es la traslocación del molde (ARNm) y los ARNt en los sitios P y A a lo largo del ribosoma, pasando a ocupar éstos los sitios E y P, respectivamente, y quedando el nuevo codón preparado para comenzar un nuevo ciclo de adición de aminoácido a la cadena polipeptídica. Un reciente trabajo (aparecido el mismo mes en el que se anunció la concesión del Premio Nobel) del laboratorio de Ramakrishnan (23) explica el mecanismo de este proceso, que ocurre con la ayuda del factor de elongación EF-G y liberación de energía.

La repetición de los tres pasos que constituyen la elongación (descodificación, catálisis del enlace peptídico y traslocación) tiene como consecuencia la formación de la cadena polipeptídica. Dicha cadena debe atravesar un túnel de salida que recorre de parte a parte la subunidad 50S y que tiene forma tubular, por lo que no es posible el plegamiento de la proteína en su interior (9). Sin embargo este túnel posee propiedades dinámicas para el control del avance de la cadena polipeptídica y, por tanto, interviene en el control del proceso de traducción (24).



**Figura 4. Serie de estructuras que explican la catálisis del enlace peptídico.**

**A)** Subunidad 50S que muestra la localización del PTC, en naranja, en el fondo de un túnel en dicha subunidad, coloreada en gris para el ARNr y negro para las proteínas. **B)** Detalle del PTC vacío con los nucleótidos más importantes en modelo de varillas. Se distinguen dos surcos que corresponden a los sitios de unión A (izquierda) y P (derecha) de los ARNt. **C)** Estructura de 50S con los análogos de los sustratos aminoacil-ARNt (morado) y peptidil-ARNt (verde) posicionados en la orientación adecuada para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico. **D)** Detalle del área rodeada por una línea de puntos roja en el panel anterior (C). Se destacan el nucleófilo con un círculo rojo y los puentes de hidrógeno que asisten la catálisis mediante líneas punteadas negras. El ataque nucleofílico se simboliza con una flecha roja. **E)** Estructura de 50S en complejo con un análogo del intermediario de la reacción. **F)** Estructura de 50S en complejo con un análogo del producto de la catálisis. Los paneles B-F han sido extraídos de un video preparado en el laboratorio de Steitz ([http://www.youtube.com/watch?v=OaQan400K\\_Q](http://www.youtube.com/watch?v=OaQan400K_Q)).

### 5.3. Terminación

La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación alcanza el sitio A en la subunidad 30S. El codon de terminación es reconocido por un factor de terminación de clase I (RF1 o RF2), que se une al ribosoma en conformación extendida como han mostrado las estructuras cristalográficas obtenidas en los laboratorios de Noller y Ramakrishnan (25, 26). En dicha conformación, el motivo de tres aminoácidos conservados (GGQ) se inserta en el sitio activo del ribosoma y lleva a cabo la catálisis de

liberación del peptidilo. Tras la unión del RF, una base nitrogenada del ARNr de 50S que en otras condiciones protege el enlace éster entre el peptidilo y el ARNt del sitio P se desplaza exponiendo dicho enlace. La glutamina del motivo conservado en el RF participa de algún modo en el ataque nucleofílico que conduce a la liberación del polipéptido del ribosoma. Otros factores de terminación (RF3 y RRF) participan en el reciclado de los componentes de la maquinaria de traducción antes de que pueda llevarse a cabo la síntesis de una nueva molécula de proteína.

#### 5.4. Mecanismo de acción de los antibióticos

Por último, las estructuras cristalográficas han conseguido explicar el bloqueo de la función del ribosoma que realizan diversos antibióticos. Aproximadamente la mitad de los antibióticos empleados hoy día en el tratamiento de infecciones bacterianas tienen como diana el ribosoma. Sin embargo, debido principalmente a la presión selectiva impuesta por su uso inadecuado, la resistencia a la mayoría de ellos está adquiriendo proporciones preocupantes. Por esta razón, las estructuras atómicas del complejo entre el ribosoma y los distintos antibióticos constituyen una excelente base para el diseño racional de nuevos antibióticos.

Más de una docena de antibióticos han sido cristalizados en complejo con el ribosoma y, en general, puede decirse que tienen como diana los puntos esenciales en donde se realizan las diversas actividades individuales que constituyen la traducción. En la subunidad 30S cabe destacar los aminoácidos que interfieren con el proceso de descodificación (como los aminoglicósidos), mientras que en la subunidad 50S podemos destacar aquéllos que bloquean el sitio activo (como los *anfénicoles* o las pleuromutilinas) y los que bloquean el canal de salida (macrólidos). A continuación se discuten ejemplos de cada uno de estos grupos.

La paromomicina es un antibiótico del grupo de los aminoglicósidos que consiste en una serie de cuatro de anillos de azúcares aminados. La estructura de su complejo con la subunidad 30S muestra que se une al ARNr en una zona que contiene nucleótidos no conservados entre el ribosoma bacteriano y el eucariota, explicando

su selectividad (27). La unión de la paromomicina provoca un desequilibrio en el centro de descodificación de 30S, pues hace que las tres bases descodificadoras (ver más arriba) adopten de forma permanente una conformación prácticamente idéntica a la que tomarían cuando hay un apareamiento codón/anticodón correcto. Esto provoca que el ribosoma no sea capaz de distinguir si el ARNt del sitio A es correcto y, por tanto, que las proteínas sintetizadas incorporen mutaciones, lo que conduce a la muerte celular.

Las pleuromutilinas son un grupo de antibióticos de uso reciente que contienen un anillo de catorce miembros compartiendo un enlace con otro de cinco. Las estructuras de sus complejos con la subunidad 50S de una eubacteria, determinadas en el laboratorio de Yonath (28), demuestran que interaccionan con el sitio activo del ribosoma (PTC) impidiendo la catálisis del enlace peptídico y, por tanto, la síntesis de proteínas. Las pleuromutilinas se unen mediante un mecanismo de *induced-fit* aprovechando la flexibilidad de dos bases conservadas, al mismo tiempo que crean numerosos contactos en los que intervienen nucleótidos lejanos poco conservados, lo que les confiere selectividad hacia el ribosoma bacteriano.

Los macrólidos constituyen un grupo de antibióticos de amplio uso en la actualidad que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de 14 a 16 carbonos. Diversos macrólidos han sido cristalizados en complejo con la subunidad 50S por el grupo de Yonath (revisado en referencia 29). En las estructuras derivadas se observa que todos se unen al canal de salida de la cadena polipeptídica, bloqueando el paso de la misma y por tanto deteniendo la progresión de la síntesis proteica. En el sitio de unión destacan dos residuos de adenina no conservados (en el ARNr eucariota se trata de guanina), que confieren selectividad a estos antibióticos.

En la actualidad, estas y otras estructuras están siendo empleadas con la finalidad de diseñar nuevos fármacos que nos permitan luchar contra las cada vez más difíciles de atacar infecciones bacterianas.

## 6. CONCLUSIÓN: LO QUE AÚN NOS QUEDA POR DESCUBRIR

En este documento he pretendido resumir los hallazgos más importantes que han conducido a la concesión del Premio Nobel de Química en 2009, al habernos desvelado, al nivel de detalle atómico, numerosos misterios acerca de cómo el ribosoma lleva a cabo la síntesis de proteínas. Recomiendo al lector interesado el visionado de un excelente video, preparado en el laboratorio de Ramakrishnan, que integra la mayor parte de la información estructural sobre dicho proceso biológico de que se dispone: [http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/movies/translation\\_bacterial.wmv](http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/movies/translation_bacterial.wmv).

Sin embargo existen todavía algunas etapas del proceso de traducción, como la iniciación y la terminación, que sería interesante comprender mejor. Además, las estructuras atómicas resueltas hasta el momento corresponden a ribosomas bacterianos, por lo que todas las miradas se dirigen ahora hacia el ribosoma eucariota, más complejo y dinámico. No cabe duda de que la cristalografía de rayos X seguirá constituyendo una herramienta esencial en esta dirección, pero no debemos olvidar que la microscopía electrónica está alcanzando niveles de detalle cada vez más elevados, y hoy día existen ejemplos de estructuras atómicas obtenidas mediante su aplicación. Puesto que esta técnica permite abordar procesos de mayor dinamismo y complejidad, resulta lógico pensar que su combinación con la cristalografía de rayos X nos proporcionará una visión más completa sobre los fascinantes mecanismos que subyacen al proceso de la síntesis proteica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*. 227: 561-563.
2. Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171: 737-738.
3. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*. 181: 662-666.
4. Perutz, M. F.; Rossmann, M. G.; Cullis, A. F.; Muirhead, H.; Will, G. & North, A. C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 185: 416-422.

5. Palade, G. E. (1955) A small particulate component of the cytoplasm. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1: 59-68.
6. Lake, J. A. (1976) Ribosomal structure determined by electron microscopy of *E. coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *Journal of Molecular Biology*. 105: 131-159.
7. Selmer, M.; Dunham, C. M.; Murphy, F. V. 4th, Weixlbaumer, A.; Petry, S.; Kelley, A. C.; Weir, J. R. & Ramakrishnan V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.
8. Berkovitch-Yellin, Z.; Bennett, W. S. & Yonath, A. (1992) Aspects in Structural Studies on Ribosomes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 27: 403-444.
9. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920.
10. Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M. Jr.; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vonrhein, C.; Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407: 327-339.
11. Schlutzenzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*. 102: 615-623.
12. Harms, J.; Schlutzenzen, F.; Zarivach, R.; Bashan, A.; Gat, S.; Agmon, I.; Bartels, H.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*. 107: 679-688.
13. Yusupov, M. M.; Yusupova, G. Z.; Baucom, A.; Lieberman, K.; Earnest, T. N.; Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292: 883-896.
14. Schuwirth, B. S.; Borovinskaya, M. A.; Hau, C. W.; Zhang, W.; Vila-Sanjurjo, A.; Holton, J. M. & Cate, J. H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310: 827-834.
15. Ogle, J. M.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M. Jr.; Tarry, M. J.; Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. 292: 897-902.
16. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461: 1234-1242.
17. Schmeing, T. M.; Voorhees, R. M.; Kelley, A. C.; Gao, Y. G.; Murphy, F. V. 4th, Weir, J. R. & Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science*. 326: 688-694.
18. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289: 920-930.
19. Hansen, J. L.; Schmeing, T. M.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2002) Structural insights into peptide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 99: 11670-11675.
20. Schmeing, T. M.; Huang, K. S.; Kitchen, D. E.; Strobel, S. A. & Steitz, T. A. (2005) Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Molecular Cell*. 20: 437-448.

21. Rodnina, M. V.; Beringer, M. & Wintermeyer, W. (2007) How ribosomes make peptide bonds. *Trends in Biochemical Science*. 32: 20-26.
22. Voorhees, R. M.; Weixlbaumer, A.; Loakes, D.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2009) Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*. 16: 528-533.
23. Gao, Y. G.; Selmer, M.; Dunham, C. M.; Weixlbaumer, A.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*. 326: 694-699.
24. Berisio, R.; Schlutzen, F.; Harms, J.; Bashan, A.; Auerbach, T.; Baram, D. & Yonath, A. (2003) Structural insight into the role of the ribosomal tunnel in cellular regulation. *Nature Structural Biology*. 10: 366-370.
25. Laurberg, M.; Asahara, H.; Korostelev, A.; Zhu, J.; Trakhanov, S. & Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*. 454: 852-857.
26. Weixlbaumer, A.; Jin, H.; Neubauer, C.; Voorhees, R. M.; Petry, S.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science*. 322, 953-956.
27. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T. & Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 407: 340-348.
28. Davidovich, C.; Bashan, A.; Auerbach-Nevo, T.; Yaggie, R. D.; Gontarek, R. R. & Yonath, A. (2007) Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 104: 4291-4296.
29. Yonath (2005) Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism, and cellular regulation. *Annual Reviews Biochemistry*. 74: 649-679.

\* **Información de contacto:**

Dr. Carlos Fernández Tornero.  
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.  
C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid.  
e-mail: [cftornero@cib.csic.es](mailto:cftornero@cib.csic.es)