

24
12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EL PAPEL DE LOS ARN RIBOSOMALES

EN LA TRADUCCIÓN

Trabajo Monográfico de Actualización
que Presenta

Martin Bonfil Olivera

Para Obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo

— 1989 —

—♦♦♦—

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Prefacio	1
Abreviaturas	3
Capitulo I. Introducción: Conceptos básicos sobre el ribosoma	4
1. Generalidades sobre el ribosoma:	5
A) Los componentes de los ribosomas: proteínas y ácidos ribonucleicos.	6
1) Proteínas:	6
2) Ácidos ribonucleicos:	7
B) Estructura de los ribosomas:	8
1) Ribosomas procarionticos.	11
2) Ribosomas eucarióticos.	14
3) Ribosomas organelares	14
C) Biosíntesis de los ribosomas:	16
1) Transcripción de los ARNr.	16
2) Biosíntesis de las proteínas ribosomales.	17
3) Autoensamblaje del ribosoma.	19
D) Función del ribosoma:	19
1) Activación de los aminoácidos.	20
2) Iniciación de la síntesis de proteínas.	21
a) La iniciación en los procariontes.	22
b) La iniciación en los eucariontes.	24
3) Prolongación de la cadena polipeptídica.	26
a) Factores de prolongación.	26
b) Unión del aminoacil-ARNt entrante.	27
c) Formación del enlace peptídico.	28
d) Translocación.	29
4) Terminación de la traducción.	30
5) Requerimientos energéticos de la síntesis de proteínas.	32
2. Papel del ARN en la evolución temprana de la vida y en el origen de la maquinaria de síntesis de proteínas:	33
Apéndice: Definición del Coeficiente de Sedimentación	37
Capitulo II. El papel de los ARNr en la estructura y el ensamblaje de los ribosomas.	37
1. Nomenclatura:	37
2. Estructura de los ARNr:	38
A) Estructura del ARNr 5S.	41
B) Estructura del ARNr 5.8S.	42
C) Estructura del ARNr chico.	42
D) Estructura del ARNr grande.	45
3. Papel de los ARNr en el ensamblaje de los ribosomas.	47
A) Conformación de los ARNr: Algunos ARNr adquieren por sí solos su conformación.	48

B) Unión del ARNr 5.8S al ARNr 28S: El ARNr 5.8S se une al ARNr 28S por apareamiento de bases.	50
C) Unión de proteínas ribosomales a los ARNr y ensamblaje del ribosoma. Los ARNr sirven como soporte para la unión de proteínas en el ribosoma.	52
1) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr 5S.	53
2) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr 5.8S.	54
3) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr chico.	54
4) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr grande.	56
4. Cambios conformacionales de los ARN ribosomales en la traducción. Algunos cambios en la conformación de los ARNr pueden tener importancia funcional en la traducción.	57
A) Cambios en la conformación del ARNr chico: Un cambio en la conformación del ARNr chico inactiva a los ribosomas.	58
B) Cambios en la conformación del ARNr 23S: Un cambio en la conformación del ARNr 23S parece intervenir en la translocación y debilita la unión entre las subunidades ribosomales.	60
C) Cambios conformacionales en los ARNr 5S y 5.8S: Es posible que los ARNr 5S y 5.8S cambien su conformación durante la traducción.	64
Capítulo III. Funciones de los ARNr en la iniciación de la traducción.	69
1. Unión de factores de iniciación:	69
A) Factor de iniciación 3:	70
1) En procariontes:	70
2) En eucariontes:	72
B) Factor de iniciación 2:	73
2. Unión del ARN mensajero a la subunidad pequeña del ribosoma.	73
A) La interacción Shine-Dalgarno en procariontes:	74
1) Pruebas de la existencia de la interacción Shine-Dalgarno:	75
2) Importancia de la interacción ARNr-ARNm:	77
3) Regulación de la iniciación por unión del ARNm:	78
4) Otros factores que intervienen:	80
5) Otros modelos:	81
B) La interacción Shine-Dalgarno en eucariontes:	82
1) Intervención de otros factores en la unión del ARNm:	85
2) Función regulatoria:	85
3) Otros mecanismos en la unión del ARNm:	86

4) Antigüedad evolutiva de la intervención del ARNr en la unión del ARNm:	88
C) Otras interacciones del ARNm con los ARNr.	89
3. Unión de las subunidades ribosomales.	91
Capítulo IV. Funciones de los ARNr en la fase de prolongación de la cadena polipeptídica.	95
1. Unión de factores de prolongación:	95
2. Unión de ARN de transferencia:	98
A) Unión del ARNt al ARNr chico:	99
B) Unión de aminoacil-ARNt al ARNr grande:	104
C) Papel de los ARNr 5S y 5.8S en la unión del ARNt:	108
3. Transferasa de peptidilo:	110
A) Participación del ARNr grande:	112
1) Evidencias de la participación del ARNr grande: marcaje por afinidad.	112
2) Evidencias de la participación del ARNr grande: resistencia a antibióticos.	113
a) Mutantes resistentes a la eritromicina:	114
b) Mutantes resistentes al cloranfenicol:	118
c) Mutantes resistentes a la anisomicina:	118
3) Evidencias de la participación del ARNr grande: métodos de reconstitución.	120
B) Evidencias de la participación del ARNr chico.	122
4. Función del ARNr en la translocación:	125
Capítulo V. Participación de los ARNr en otras funciones del ribosoma	130
1. Participación de los ARNr en la terminación de la traducción.	130
2. Participación de los ARNr en la translocación cotraduccionaI de proteínas a través de membranas.	132
Capítulo VI. Conclusiones.	134
1. Resumen de las funciones ribosomales en las que participan los ARNr.	134
A. Papel estructural de los ARNr:	134
B. Funciones de los ARNr en la iniciación de la traducción.	135
C. Funciones de los ARNr en la prolongación de la cadena polipeptídica.	136
D. Funciones de los ARNr en la terminación de la traducción.	137
E. Papel de los ARNr en el transporte cotraduccionaI de proteínas a través de membranas.	137
2. Capacidad de los ARNr para llevar a cabo la síntesis de proteínas.	138

3. Comentarios finales.	142
Bibliografía	143
Libros	143
Artículos de revistas	144

Prefacio

El objetivo de este trabajo es revisar las investigaciones que se han realizado en los últimos años sobre el papel de los ácidos ribonucleicos ribosomales en las distintas funciones del ribosoma.

Se ha descubierto recientemente que el ARN es capaz de tener actividad enzimática.

En el periodo que va de aproximadamente 1955 a 1969, se estudió ampliamente al ribosoma⁽¹⁾. Se caracterizaron sus componentes, se describió el mecanismo general de la síntesis de proteínas, etc. En la década de los 70s, sin embargo, se perdió el interés en este organelo. Las principales causas de ello fueron la imposibilidad de profundizar más allá de los estudios estructurales, el desconocimiento de las posibilidades catalíticas de los ARN, y la misma dificultad que había para trabajar con ellos antes del advenimiento de las modernas técnicas de biología molecular.

A partir de 1981-82 el interés por los estudios sobre el ribosoma ha renacido, a partir del descubrimiento de la actividad catalítica de los ARN. Esta vez su estudio se ve muy facilitado por las nuevas técnicas, y se beneficia de los avances obtenidos por los grupos que siguieron estudiando a este organelo durante los años en que su popularidad se vio disminuida: actualmente se tiene la secuencia de la mayoría de las proteínas ribosomales y se está muy cerca de descifrar la estructura tridimensional detallada del ribosoma.

Durante todos estos años, la actividad enzimática más importante del ribosoma, la transferasa de peptidilo, no ha podido ser localizada en ninguna de las proteínas ribosomales. Aunque existe la posibilidad

de que se requieran varias de ellas para que se manifieste la actividad, la evidencia actual, que se revisa en este trabajo junto con la de la participación de los ARNr en casi todas las demás funciones del ribosoma, parece dejar claro que estas moléculas son un componente indispensable, si no es que el esencial, de dicha actividad.

En muchos casos, la revisión bibliográfica no ha sido exhaustiva. No obstante, creo haber logrado reunir referencias suficientes para tener una visión clara de la investigación que se ha hecho en éste campo en los últimos 9 años, y de los resultados que se han obtenido.

La investigación bibliográfica en la que se basa éste trabajo se realizó partiendo de las referencias originales citadas en el *Science Citation Index* y en *Biological Abstracts*. La búsqueda de los artículos se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas de la UNAM:

- Biblioteca de Centro de Información Científica y Humanística (CICH)*
- Hemerobiblioteca de Investigación "José Joaquín Izquierdo" de la Facultad de Medicina.*
- Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular.*
- Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas.*
- Biblioteca de la división de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química.*
- Biblioteca del Instituto de Biología.*

Deseo agradecer su ayuda y amabilidad al personal de estas bibliotecas, especialmente a la Sra. Alba Tuena de Cobos (IFC) y al querido Don Carlitos Perez Paramo (Facultad de Medicina).

ABREVIATURAS

3

Las abreviaturas usadas en este trabajo son las siguientes:

ADN	Acido desoxirribonucleico.
AMP	Monofosfato de adenosina (ácido adenilico).
ARN	Acido ribonucleico.
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia.
ATP	Trifosfato de adenosina.
b	Bases (nucleótidos)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
eEF-Tu	Factor de prolongación Tu eucariótico.
EF-1	Factor de prolongación Tu eucariótico.
EF-G	Factor de prolongación G procariótico.
EF-Tu	Factor de prolongación Tu procariótico.
eIF-2	Factor de iniciación 2 eucariótico.
eIF-3	Factor de iniciación 3 eucariótico.
GTP	Trifosfato de guanosina.
IF-2	Factor de iniciación 2 procariótico.
IF-3	Factor de iniciación 3 procariótico.
pb	Pares de bases.
RNasa	Ribonucleasa.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.

INTRODUCCION

CONCEPTOS BASICOS SOBRE EL RIBOSOMA

En este capítulo introductorio se presenta la información básica sobre la estructura, la biosíntesis y la función de los ribosomas, y una discusión breve sobre la importancia de las funciones de los ARNr en la traducción, dentro del marco de las teorías recientes sobre evolución molecular, que sitúan a los ARN en un papel central en la aparición de las primeras moléculas con las propiedades fundamentales (en un sentido amplio) de la vida: la autorreplicación y la capacidad de evolucionar.

Entre los objetivos principales de este trabajo, se halla el de reunir evidencias de las funciones que los ARN continúan llevando a cabo en los ribosomas modernos. Los ribosomas son considerados por muchos como "fósiles moleculares", debido a que su estructura y su función se han conservado admirablemente a lo largo de la evolución. El que se hayan conservado también las funciones catalizadas por ARN, como se sostiene en este trabajo, permite realmente que se considere a los ribosomas como fósiles del "mundo de las ribonucleoproteínas", que se ha postulado como la etapa intermedia entre el "mundo del ARN" primitivo y el actual "mundo del ADN". La información que nos proporciona el estudio de las funciones de los ARNr en los ribosomas actuales nos

permitirá entender mejor el papel que los ARN pudieron jugar en la evolución temprana de la vida.

NOTA: El contenido de este capítulo se obtuvo de los libros citados en la bibliografía (referencias I-VII) y de las referencias 2,3,4 y 5.

1. Generalidades sobre el ribosoma.

Los ribosomas son organelos subcelulares de tamaño muy pequeño. Es por esto que aunque se hallan en gran número en las células, no fueron descubiertos sino hasta mediados de este siglo, cuando el microscopio electrónico permitió el estudio de la ultraestructura celular.

Desde 1840, Altman había descrito pequeños gránulos parecidos a bacterias en el interior de las células, a los que llamó *bioblastos*. Altman utilizó el microscopio óptico para sus observaciones, que son los primeros reportes de organelos dentro de la célula. Entre 1940 y 1960, los estudios de fraccionamiento celular permitieron relacionar ciertas funciones con organelos específicos.

Los ribosomas fueron descubiertos por A. Claude, quien los localizó en el microscopio electrónico como partículas de ribonucleoproteína. K. R. Porter y G. E. Palade localizaron a los ribosomas sobre el retículo endoplásmico.

La identificación de la función de los ribosomas, la síntesis de proteínas, fue lograda por Zamecnik en la década de los cincuentas. Antes de sus estudios, se pensaba que las proteínas eran sintetizadas por una inversión de la actividad de las peptidasas (enzimas que degradan proteínas), en forma quizá similar a la síntesis del glu-

Los experimentos de Zamecnik relacionaron a los ribosomas indiscutiblemente con la síntesis de proteínas, pues demostraron que aminoácidos radiactivos que eran inyectados a ratas aparecían primero en la llamada "fracción microsomal" (que comprende a los ribosomas y fragmentos de retículo endoplásmico) al separar lisados de células por centrifugación diferencial. Posteriormente, los aminoácidos marcados aparecían en las proteínas del citoplasma. Multitud de estudios posteriores han confirmado que es en los ribosomas en donde se sintetizan las proteínas, y han permitido conocer la estructura de estos organelos y el proceso de la síntesis con gran detalle.

Antes de describir la estructura de los ribosomas, conviene mencionar que se trata de los organelos más abundantes en la célula. Un ejemplo típico es la célula de la bacteria *Escherichia coli*, en la que se pueden hallar aproximadamente 15.000 ribosomas, que constituyen casi la tercera parte del peso seco de la célula. En el ribosoma, 2/3 del peso consisten en los ARNr, por lo que tan sólo éstos constituyen el 21% de la masa celular. Como punto de comparación, la membrana celular constituye sólo el 10% de la masa celular; el ADN el 2%, y las proteínas ribosomales el 9%. Es claro, entonces que si los ribosomas son de importancia central en la organización celular, los ARNr parecen ser parte vital de los ribosomas.

A) Los componentes de los ribosomas: proteínas y ácidos ribonucleicos.

1) Proteínas:

Las proteínas son heteropolímeros no-ramificados formados por la unión de residuos de aminoácidos (compuestos de carbono que tienen un grupo amino, un grupo carboxilo y un tercer grupo o cadena lateral, los tres unidos a un mismo carbono). La secuencia de dichos residuos, cono-

cida como la estructura primaria de la proteína, está determinada por la secuencia de los nucleótidos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que forma los genes. Toda proteína tiene un extremo con un grupo amino (extremo N-terminal) y otro con un extremo carboxilo (extremo C-terminal).

En los seres vivos, hay 20 aminoácidos que normalmente forman parte de las proteínas. Otros aminoácidos se hallan muy raramente.

Los aminoácidos se hallan unidos por un enlace entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente formando un enlace amídico, también conocido como enlace peptídico.

Las cadenas proteicas son flexibles y pueden adquirir diversas conformaciones. Algunas de las estructuras estables que pueden formarse en tramos de cadenas proteicas (también llamadas cadenas polipeptídicas) son la hélice α , la hoja plegada β , etc. Estas estructuras constituyen la estructura secundaria de la proteína. A su vez, las porciones con estructura secundaria y las regiones no-estructuradas de la proteína pueden adquirir conformaciones estables, las cuales constituyen la estructura terciaria. Por último, se dice que las proteínas que pueden unirse con otras, para formar una proteína multimérica, tienen estructura cuaternaria.

2) Ácidos ribonucleicos:

Los ácidos nucleicos son heteropolímeros formados por la unión de monómeros llamados nucleótidos. Los nucleótidos están formados por un carbohidrato, el cual puede ser ribosa o 2-desoxirribosa, al cual se hallan unidos dos grupos: en el carbono 1 se halla unida una base purica o pirimidica, y en el carbono 5 un fosfato.

Existen dos clases de ácido nucleico: el ácido desoxirribonucleico (ADN), en el que el carbohidrato es 2-desoxirribosa y las bases son adenina (A) y guanina (G) (púricas) y timina (T) y citosina (C) (pirimidicas), y el ácido ribonucleico (ARN), en el que se halla ribosa en vez de 2-desoxirribosa y uracilo (U) en vez de timina.

La estructura de las bases permite que haya formación de enlaces de hidrógeno entre algunas de ellas. Específicamente, se forman los pares A:T ó A:U y C:G.

El ADN normalmente se halla como dos cadenas unidas por enlaces de hidrógeno como los descritos anteriormente entre cada uno de los nucleótidos de una cadena con los de la otra. Siendo así, dondequiera que en una de las cadenas hay una A, en la opuesta debe haber una T, y viceversa. Lo mismo sucede con C y G. Debido a esto, se dice que las dos cadenas del ADN son complementarias. Las dos cadenas complementarias unidas se hallan enrolladas formando una doble hélice.

El ARN, que es el ácido nucleico presente en los ribosomas, normalmente no se halla formando dobles hélices, aunque tramos de una molécula sí pueden tomar esta estructura.

B) Estructura de los ribosomas.

La estructura de las tres clases principales de ribosomas es equivalente.

La estructura general de los ribosomas tanto de eucariontes como de procariontes y de organelos que tienen maquinaria de síntesis de proteínas (cloroplastos y mitocondrias) es muy similar. Sus componentes básicos y su organización estructural y funcional son virtualmente iguales, lo que permite establecer homologías entre los tres tipos de ribosomas.

La tabla siguiente presenta un resumen general de la estructura de los diferentes tipos de ribosomas: (véase la figura 2- página 13)

TABLA 1
TAMANO DE ALGUNOS COMPONENTES DE RIBOSOMAS:

Sistema	Ribosoma	Subunidades	ARNr
Citoplasma eucariótico (rata)	80S	Grande: 60S Chica: 40S	28S, 5S, 5.8S 18S
Citoplasma procariótico	70S	Grande: 50S Chica: 30S	23S, 5S 16S
Mitocondria	55-74S	Grande: 39-60S Chica: 28-37S	16-25S 13-19S
Cloroplasto	70S	Grande: 50S Chica: 30-35S	23S, 5S, 4.5S (o 3S y 7S) 16S

Los ribosomas tienen la capacidad de unir dos ARNt simultáneamente en sitios específicos. El primero de estos sitios, conocido como sitio A (por *aminoacilo*), puede unir ARNt que estén cargados con un aminoácido (aminoacil-ARNt). El llamado sitio P (por *peptidilo*) puede unir el ARNt al que está unida la cadena polipeptídica en formación (peptidil-ARNt).

Tanto el sitio P como el A se extienden abarcando parte de las dos subunidades ribosomales. La parte de los sitios A y P que se une al aminoácido (o al péptido) del ARNt se halla en la subunidad grande, y la parte que aloja al anticodón unido al ARNm se halla en la subunidad chica.

Cuando las subunidades ribosomales están separadas, la porción del sitio P que está en la subunidad chica tiene la capacidad adicional de unir al aminoacil-ARNt iniciador, *i.e.* el ARNt que acarrea al primer aminoácido de la proteína que se va a sintetizar. El aminoacil-ARNt iniciador no puede unirse al sitio A ni al sitio P completo del ribo-

soma. Ningún otro aminoacil-ARNt puede unirse al sitio P incompleto de la subunidad chica.

En lo que respecta a su forma, los ribosomas en general parecen ser muy similares. Únicamente los ribosomas procarióticos se han estudiado con suficiente detalle como para poder conocer su forma con detalle.

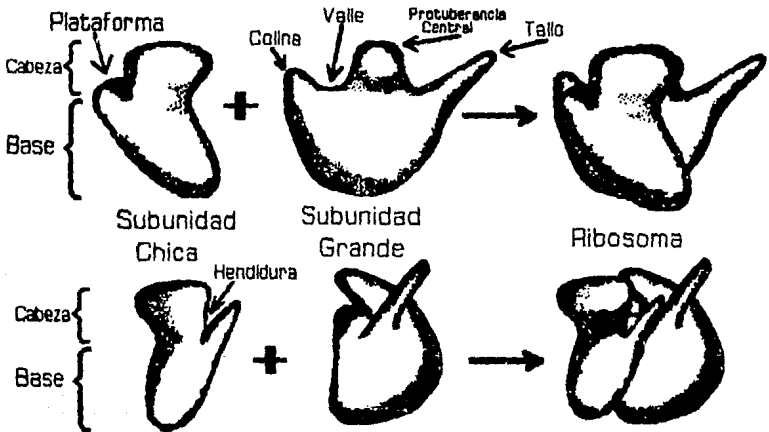


Figura 2: Modelo del ribosoma y sus subunidades (Ref. 85)

La subunidad chica tiene tres características evidentes: una protuberancia grande, llamada la cabeza, y una más pequeña llamada la

plataforma. Entre la cabeza y la plataforma se encuentra la hendidura (*cleft*). Por debajo de las protuberancias se halla la base, que forma el cuerpo principal de la subunidad ($2/3$ partes).

La subunidad grande tiene también un cuerpo principal y tres protuberancias, con ángulos de aproximadamente 50° entre sí: la protuberancia central, el tallo (*stalk*) formado por las proteínas L7 y L12 (que en realidad son dos formas de la misma proteína), y la colina (*ridge*). Entre la colina y la protuberancia central se halla el valle. También hay una muesca (*notch*) en la cara de la subunidad grande que se une a la chica.

En el ribosoma, la hendidura de la subunidad chica queda aproximadamente alineada con la muesca de la subunidad grande, con lo que se forma un canal por el que posiblemente emerja la proteína recién sintetizada.

1) Ribosomas procarióticos.

El ribosoma procariótico, cuyo ejemplo clásico es el ribosoma de *Escherichia coli*, fue el primero en ser estudiado y caracterizado. Es una partícula ribonucleoprotéica de aproximadamente 18 nm de diámetro y 2.8 megaDaltons de peso, con un coeficiente de sedimentación de 70S (para una definición de coeficiente de sedimentación, véase el apéndice a este capítulo, en la página 37).

El ribosoma 70S de *Escherichia coli* puede ser "desarmado" por disminución de la concentración de Mg^{2+} y uso de agentes desnaturizantes como la urea. Está formado por dos subunidades con coeficientes de sedimentación de 50S y 30S, conocidas respectivamente como subunidades grande y chica. Los pesos moleculares de las subunidades, que se separan al disminuir la concentración de Mg^{2+} , son aproximadamente 1.45 y 0.85 megaDaltons. La adición de urea causa un desensamblaje de las su-

bunidades, con lo que pueden separarse las proteínas de los ARN ribosomales (ARNr).

La subunidad grande está formada por dos ARNr: el ARNr 23S, de 2904 bases y un peso molecular de un megaDalton, y el ARNr 5S, de 120 bases y 40 kiloDaltons. Además, la subunidad 50S contiene 31 clases de proteínas, llamadas L1, L2, ..., L34 (la numeración no corresponde debido a asignaciones erróneas durante los primeros estudios).

La subunidad chica, 30S, consta de un sólo ARNr; el 16S, de 1541 nucleótidos y 0.5 megaDaltons, y 21 clases de proteínas, llamadas S1, S2, ..., S21.

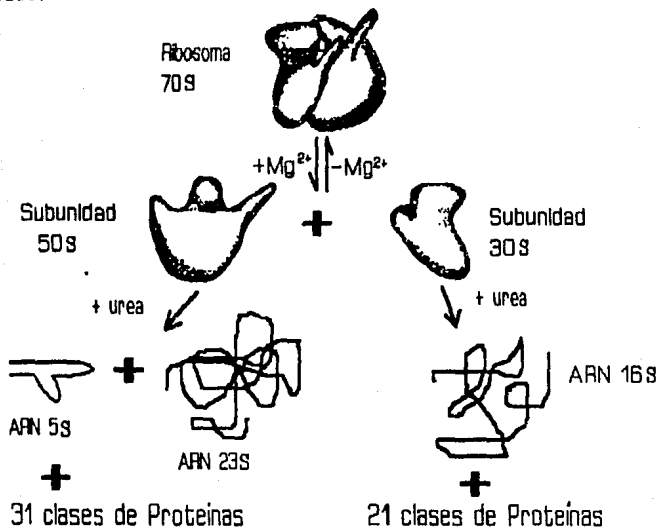


Figura 2: Componentes del ribosoma procariótico

La disposición tridimensional de los componentes del ribosoma procariótico apenas está comenzando a ser entendida. Se sabe, sin embargo, que los ARNr se hallan plegados en forma compleja dentro de las subunidades, por medio de interacciones secundarias y terciarias (véase el capítulo II). Algunas proteínas ribosomales se hallan unidas directamente a los ARNr, o con otras proteínas ribosomales, obteniéndose así la estructura compacta característica de las subunidades ribosomales (véase la figura 1).

2) Ribosomas eucarióticos.

Los ribosomas eucarióticos son en general más grandes que los bacterianos (con diámetro de aproximadamente 21 nm), aunque sus coeficientes de sedimentación varían entre 73 y 80S y sus pesos son de aproximadamente 4 megaDaltons, dependiendo de la especie. Las subunidades chica y grande tienen coeficientes de sedimentación de 40S y 60S, en promedio.

El ribosoma 80S de hígado de rata, por ejemplo, tiene una masa de 4.22 megaDaltons. La subunidad chica, de 40S y 1.4 megaDaltons, contiene el ARNr 18S, de 1874 bases, y 33 proteínas ribosomales. El ARNr de la subunidad chica tiene coeficientes de sedimentación de 18S en la mayoría de los animales, mientras que entre diversas plantas varía de 16 a 18S. En los protozoarios estos valores son más variables.

La subunidad grande del ribosoma rata, de 60S y 2.82 megaDaltons, contiene tres ARNr (a diferencia de su equivalente procariótico, que contiene sólo dos): el ARNr 28S, de 4718 bases; el ARNr 5.8S, de 160, y el ARNr 5S de 120. El valor del ARNr más grande es de 28S en otros animales, y de 25S en plantas. 49 proteínas ribosomales completan la estructura de esta subunidad.

3) Ribosomas organelares

Los ribosomas organelares varían en tamaño entre las diferentes especies: 70S en cloroplastos de *Euglena*, 78S en las mitocondrias de maíz, 73S en las de levadura, y 60S en las de *Xenopus* y las humanas. La proporción de ARNr también es variable, desde menos del 30% hasta 70%, aproximadamente. Algunos datos sobre la estructura de varios ribosomas mitocondriales y uno cloroplástico, comparada con la de ribosomas eucarióticos (citoplásmicos) y procarióticos (bacterianos), se muestran en la tabla siguiente (modificada de la referencia VI, p.238):

TABLE 2
PROPIEDADES DE SEDIMENTACIÓN DE RIBOSOMAS MITOCONDRIALES:

	Ribosoma	Subunidades		ARNr	
		grande	chica	grande	chico
Humano	60S	45S	35S	16S	12S
Rata	55S	39S	28S	16S	13S
Planta	77S	60S	44S	24S	18S
<i>N. crassa</i>	73S	50S	37S	25S	19S
<i>S. cerevisiae</i>	74S	50S	37S	21S	15S
Cloroplasto	70S	50S	30-35S	23S	16S
*Citoplásmico	80S	60S	40S	28S	18S
*Bacteriano	70S	50S	30S	23S	16S

Los ribosomas cloroplásticos de plantas superiores contienen, además de los ARNr grande, chico y 5S, un ARNr 4.5S en la subunidad grande. En algunas algas como *Chlamydomonas reinhardtii*, en vez de este último se encuentran dos ARNr, el 3S y el 7S, los cuales están fuertemente asociados con los ARNr 23S y 5S.

A pesar de estas diferencias, los ribosomas de los organelos son en general similares a los ribosomas bacterianos, tanto por su estructura y su funcionamiento como por su sensibilidad a antibióticos que inactivan específicamente a los ribosomas procarióticos, pero no a los eucarióticos, e.g. el cloranfenicol y la eritromicina.

Asimismo, la estructura secundaria de los ARNr mitocondriales y cloroplásticos corresponde con los modelos generales propuestos para los bacterianos (*véase el capítulo II*).

C) Biosíntesis de los ribosomas:

La biosíntesis de los ribosomas es uno de los procesos más activos dentro de la célula. La síntesis de los ARNr por transcripción y la de las proteínas ribosomales por traducción se hallan acopladas, lo que permite el autoensamblaje de las subunidades ribosomales en forma coordinada y eficiente.

1) Transcripción de los ARNr.

Los genes de los ARNr se hallan repetidos en todos los organismos: en procariotes se hallan aproximadamente 7 genes para los ARNr grande y chico y 7 para el ARNr 5S, que constituyen el 1% del genoma, mientras que en eucariotes se hallan de 140 a 450 genes para los ARNr grande y chico y de 140 a 24.000 genes para el ARNr 5S, que llegan a constituir hasta el 17% del genoma. En los procariotes los genes de los ARNr se hallan dispersos, mientras que en los eucariotes se hallan generalmente contenidos en grupos dentro del genoma, llamados ADN ribosomal.

En general, los genes de los ARNr grande y chico son transcritos como un solo precursor en procariotes y eucariotes. Este precursor contiene las secuencias de ambos ARNr y secuencias adicionales en el extremo 5' y en medio de los dos ARNr, llamadas secuencia guía y espa-

ciador transcrito, respectivamente. Estas secuencias son cortadas y los ARNr son liberados en un proceso llamado maduración de los ARNr.

Los ARNr grande y chico en eucariontes son sintetizados (transcritos) en una región del núcleo llamada nucleolo, gracias a una enzima llamada polimerasa de ARN I (distinta de la polimerasa de ARN II, que transcribe los ARNm). El nucleolo tiene una zona central fibrilar, en la que ocurre la transcripción de los genes, y una zona granular externa, en la que se hallan las partículas de ribonucleoproteína que constituyen los ribosomas en proceso de ensamblaje. Los nucleolos (puede haber varios en un núcleo) se localizan alrededor de zonas del ADN llamadas organizadores nucleolares, las cuales contienen gran cantidad de genes de ARNr repetidos. La transcripción en estas zonas es muy intensa.

Los ARNr 5S no son sintetizados en el nucleolo, pero son transportados allí al igual que las proteínas ribosomales para ser incorporados en los ribosomas en formación. La enzima que los sintetiza, la polimerasa de ARN III, es distinta de la que se usa para los otros ARNr y los ARNm: transcribe específicamente a los genes de ARNr 5S y de ARNt.

2) Biosíntesis de las proteínas ribosomales.

En general, las proteínas ribosomales son sintetizadas por un proceso de traducción idéntico al de todas las otras proteínas celulares.

La transcripción de los genes de las proteínas ribosomales, sin embargo, se halla comúnmente sujeta a una regulación específica que permite que la síntesis de las proteínas y de los ARNr se dé en forma concertada.

El mecanismo general consiste en que las proteínas ribosomales pueden unirse con su propio ARNm, impidiendo su traducción. Cuando los ARNr y las demás proteínas ribosomales se hallan en cantidades suficientes, se unen formando las partículas ribonucleoprotéicas precursoras de los ribosomas. Cuando los ARNr no se hallan presentes, en cambio, las proteínas ribosomales quedan libres en el citoplasma y se unen a sus propios ARNm, lo que detiene su traducción.



Figura 3: Flujo de la información genética en la célula.

3) Autoensamblaje del ribosoma.

El ribosoma tiene la propiedad del autoensamblaje, que consiste en que puede sus componentes pueden juntarse espontáneamente en las condiciones adecuadas de concentración de sales, pH, temperatura, etc. sin la ayuda de otras moléculas. La reconstitución *in vitro* de las dos subunidades ribosomales de *Escherichia coli* se logró en los años 70, pero aún no se ha logrado la reconstitución de ribosomas eucarióticos. Además, la reconstitución de la subunidad chica de *E. coli in vitro* requiere 90 minutos a 50°C, mientras que *in vivo* tarda aproximadamente 30 minutos a 37°C. La síntesis y ensamblaje completos de una subunidad ribosomal grande *in vivo* tardan aproximadamente 1 hora.

Una vez ensambladas las subunidades ribosomales son exportadas al citoplasma a través de la membrana nuclear.

D) Función del ribosoma.

El ribosoma permite la traducción de la información genética del ARNm a las proteínas.

La función del ribosoma es la síntesis de proteínas. Este proceso tiene una importancia tan central para la supervivencia de la célula como el proceso de replicación de la información genética, pues es el que permite la expresión final de ésta última.

La información del ADN es transmitida a las proteínas por un mecanismo de dos pasos, conocidos como transcripción y traducción (véase la figura 4). El primero de ellos consiste en la síntesis de una cadena de ácido ribonucleico (llamado ácido ribonucleico mensajero o ARNm) complementaria al ADN del gen. Dicha cadena es sintetizada por enzimas llamadas polimerasas de ARN dependientes de ADN, o

transcriptasas, las cuales unen los ribonucleótidos necesarios en la secuencia complementaria a la del gen, utilizando al ADN como molde.

El ARNm, como su nombre lo indica, transmite la información del ADN a los ribosomas, en donde las proteínas son sintetizadas de acuerdo a la secuencia dictada por el ARNm. Este es el proceso de traducción, el cual se divide en tres fases principales, la iniciación, la prolongación y la terminación, que constituyen la síntesis de proteínas, mas una fase previa a ésta: la activación de los aminoácidos. Estas fases son descritas en las siguientes secciones.

1) Activación de los aminoácidos.

La primera fase de la traducción, que no forma parte de la síntesis de proteínas como tal pero que es directamente necesaria para ella, es la activación de los aminoácidos. Consiste en la unión de los aminoácidos individuales a las moléculas que los acarrear. Específicamente: una clase especial de ácido ribonucleico conocido como ácido ribonucleico de transferencia (ARNT).

Cada uno de los 20 aminoácidos puede unirse a por lo menos un ARNT específico para ese aminoácido. En algunos casos, hay varios ARNT que corresponden a un mismo aminoácido; debido a esto se dice que el código genético es degenerado. La unión de cada aminoácido con el ARNT correcto se logra gracias a una clase de enzimas que reconocen tanto al aminoácido como al ARNT, y que catalizan la unión. Estas enzimas son las sintetazas de aminoacil-ARNT.

La reacción de unión es una esterificación, y consta de dos pasos:

- El aminoácido y una molécula de ATP son unidos para formar un adenilato de aminoácido (o ácido aminoaciladenilico), con liberación de pirofosfato (que es luego hidrolizado a dos fosfatos).
- El aminoácido proveniente del adenilato de aminoácido es transferido al ARNt, formándose un enlace entre el grupo carboxilo del aminoácido y un hidroxilo de la adenina de la secuencia CCA, que se halla en el extremo 3' del ARNt. Simultáneamente, se libera una molécula de AMP.

Existe una sintetasa de aminoacil-ARNt específica para catalizar la reacción de unión de cada aminoácido con cada ARNt.

Debido a que son estas sintetasas las que reconocen a los aminoácidos y los unen a los ARNt, se puede considerar que una parte muy importante del proceso de traducción es llevada a cabo por ellas.

Una vez que cada aminoácido está unido a su ARNt correcto, los aminoácidos son alineados y unidos entre sí en el ribosoma, siguiendo la secuencia dictada por el ADN a través del ARNm. Pero si por alguna razón se une un aminoácido con un ARNt incorrecto, el ribosoma reconocerá únicamente al anticodón del ARNt, no al aminoácido. Así, puede considerarse que el ribosoma sólo "lee" lo que ya ha sido traducido por las sintetasas de aminoacil-ARNt.

2) Iniciación de la síntesis de proteínas.

La segunda fase de la traducción, la iniciación, es el paso más lento de la síntesis de proteínas. Durante la iniciación se une el ARNm con la subunidad ribosomal chica. Posteriormente se une el aminoacil-ARNt iniciador, y finalmente la subunidad ribosomal grande.

con lo que se forma el complejo de iniciación. En cada paso intervienen proteínas especializadas llamadas factores de iniciación. El proceso es ligeramente diferente en procariontes y eucariontes.

Varios ribosomas pueden unirse simultáneamente a un mismo ARNm, formando lo que se conoce como polirribosoma o polisoma.

al La iniciación en los procariontes.

En los procariontes, pueden distinguirse tres pasos:

- Primeramente ocurre la unión de la subunidad chica (30S) con el factor de iniciación 3 (IF-3), una proteína que al unirse a la subunidad impide que ésta se una a las subunidades grandes (50S) que se hallan libres en el citoplasma (normalmente hay un equilibrio entre ribosomas 70S y subunidades 30s y 50S libres).

El ARNm, que no puede unirse a los ribosomas 70S libres, se une al complejo 30S-IF-3. El codón de iniciación AUG del ARNm queda en la posición correcta para la iniciación (en la porción del sitio P que está en la subunidad 30S) gracias a un apareamiento entre una secuencia del ARNm muy cercana al extremo 5' y el ARNr 16S, conocida como interacción Shine-Dalgarno (*véase el capítulo III*).

Aunque AUG, que codifica para el aminoácido metionina, es el codón de iniciación más común en bacterias (y en eucariontes), hay ocasiones en las que se utilizan los codones GUG e incluso UUG. Aunque normalmente GUG codifica para valina, cuando se usa como codón de iniciación codifica para metionina.

Cuando un ribosoma se halla unido a un ARNm, "cubre" aproximadamente a 25 nucleótidos (8-10 codones) de éste, lo cual se sabe porque estos nucleótidos se hallan protegidos de la degradación por ribonucleasas. El ARNm queda unido a un surco en la interfase entre las dos subunidades ribosomales, aunque hay indicios de que existe un orificio o "canal" a través del que pasa el ARNm.

- El aminoacil-ARNT iniciador se une al factor de iniciación 2 (IF-2), y este complejo, junto con una molécula de GTP, se une al complejo 30S·IF-3, con lo que se forma el complejo de preiniciación.

El aminoacil-ARNT iniciador es un ARNT específico (ARNT_i) que acarrea una forma especial del aminoácido metionina, en la que un grupo formilo se halla unido al grupo amino de la metionina (N-formilmetionina). El formilmetionil-ARNT_i (fmet-ARNT_i) se aparea (por medio de su anticodón) al codón de iniciación AUG del ARNm, en el sitio P incompleto de la subunidad 30S.

La formulación del grupo amino del aminoácido inicial parece asegurar que el primer enlace peptídico se forme entre el carboxilo de dicho aminoácido y el amino del siguiente, con lo que la síntesis de la proteína es en la dirección N ----> C

- En el tercer paso, la subunidad ribosomal 50S se une al complejo de preiniciación, y simultáneamente se hidroliza el GTP (con participación del IF-2), liberándose GDP, fosfato, y los factores de iniciación IF-2 e IF-3. El complejo de iniciación así formado está listo para comenzar la síntesis de proteínas.

Existe un tercer factor de iniciación en procariontes, llamado IF-1, cuya función no se conoce.

b) La iniciación en los eucariontes.

Los pasos de la iniciación en los eucariontes difieren de los de los procariontes en ciertos detalles, pero el proceso en general es muy similar en ambos grupos de organismos.

Las diferencias más notables con los procariontes son las siguientes:

- Existe sólo un codón de iniciación: AUG, que codifica para metionina.
- La metionina iniciadora no se halla formilada; el aminoacil-ARNt iniciador se llama metionil-ARNt_i.
- El ARNm tiene dos características ausentes en los ARNm procarióticos: una estructura conocida como "capucha" (*cap*) en el extremo 5' la cual consiste en una base modificada (7-metilguanosina), unida postranscripcionalmente al ARNm inmaduro por medio de un enlace 5'-5'. Adicionalmente, el ARNm eucariótico maduro tiene una "cola de poli-A", consistente en un número variable de nucleótidos de adenina añadidos postranscripcionalmente.

- El ARNm se une inicialmente a la subunidad chica por apareamiento de bases; la subunidad chica se une a la capucha del ARNm y posteriormente se desliza en la dirección 5' \longrightarrow 3' hasta llegar al codón de iniciación AUG.
- Existen por lo menos nueve factores de iniciación, aunque sólo se conocen las funciones de unos cuantos, como el factor eucariótico de iniciación 2 (ó eIF-2) y el eIF-3, que son proteínas con varias cadenas; la proteína de unión a la capucha (CBP), el eIF-6, etc.

El panorama general de la iniciación eucariótica es el siguiente:

- El eIF-6 se une posiblemente a las subunidades grandes libres, impidiendo su unión con la subunidades chicas.

El eIF-2 se une a una molécula de GTP, y este complejo a su vez se une al aminoacil-ARNt iniciador (metionil-ARNt_i).

El complejo eIF-2·GTP·metionil-ARNt_i se une entonces a la subunidad chica.

- El complejo eIF-2·GTP·metionil-ARNt_i·40S se une al ARNm con la hidrólisis simultánea de una molécula de ATP. Luego, el complejo migra a lo largo del ARNm hasta llegar al sitio de iniciación.
- El eIF-5 ocasiona la liberación de el eIF-3 y el complejo eIF-2·GTP. lo que a su vez permite la unión de la subunidad grande, posiblemente mediada por el eIF-4C. Como el metionil-ARNt_i quedó en el sitio P, el ribosoma 80S queda listo para comenzar la síntesis de proteínas.

El GTP unido al eIF-2 es hidrolizado luego de ser liberado del ribosoma, y el factor es reciclado.

3) Prolongación de la cadena polipeptídica.

La segunda etapa de la síntesis de proteínas (y tercera de la traducción) es la de prolongación de la proteína que se está sintetizando. En realidad, se trata de un ciclo que se repite con la adición de cada nuevo aminoácido, por lo que es más correcto llamarlo "ciclo de prolongación".

Los pasos individuales del ciclo de prolongación son los eventos más rápidos de la síntesis de proteínas. En sistemas eucarióticos (reticulocitos de conejo) se ha medido una velocidad de 1 a 2 aminoácidos por segundo, mientras que en procariontes (*Escherichia coli*) la velocidad es de 15 a 20 aminoácidos por segundo en condiciones óptimas.

a) Factores de prolongación.

En el ciclo de prolongación intervienen las proteínas llamadas factores de prolongación, que pertenecen a la clase de las proteínas G, ya que sólo son activos cuando están unidos a GTP. En los procariontes existen dos factores de prolongación principales: el EF-T y el eEF-G.

El EF-T (cuyo nombre proviene del hecho de que *transfiere* al ARNT al ribosoma) tiene dos subunidades: el EF-Tu (de *unstable*, porque es inestable al calor) y el EF-Ts (de *stable*: estable al calor). La forma activa del factor es el EF-Tu unido a GTP. Una vez que el GTP es hidrolizado en el ciclo de prolongación (*véase abajo*), el complejo EF-Tu·GDP resultante se une al EF-Ts, liberándose el GDP. La posterior unión de otra molécula de GTP permite la separación del EF-Ts, con lo que el complejo EF-Tu·GTP es regenerado.

La función del EF-Tu es acarrear el aminoacil-ARNt al ribosoma. El EF-G (de "que requiere GTP") participa en la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al P (*véase abajo*).

En los eucariontes, los dos factores de prolongación más importantes son el eEF-Tu y el eEF-G (anteriormente llamados EF-1 α y EF-2, respectivamente). Los detalles de la función de estos dos factores es diferente de la de sus homónimos procarióticos, pero su papel general es equivalente.

b) Unión del aminoacil-ARNt entrante.

El ciclo de prolongación puede dividirse en tres etapas, de las cuales la primera es la de la unión del aminoacil-ARNt entrante (los hechos reportados corresponden principalmente a sistemas procarióticos).

El aminoacil-ARNt entrante se une con el complejo EF-Tu·GTP para formar un complejo ternario EF-Tu·GTP·aminoacil-ARNt. Este complejo se une al ribosoma en el sitio A, y el anticodón del ARNt se aparea con el codón del ARNm. Simultáneamente, se hidroliza el GTP, liberándose fosfato y el complejo EF-Tu·GDP, el cual es regenerado con ayuda del EF-Ts (*véase la sección anterior*).

Cualquier aminoacil-ARNt puede entrar al sitio A en esta etapa y ser utilizado en las dos siguientes, excepto el aminoacil-ARNt iniciador, el cual sólo tiene afinidad por el sitio P incompleto de la subunidad chica.

El aminoacil-ARNt unido al sitio A es reconocido por la interacción del anticodón del ARNt con el codón del ARNm, y por otras interacciones del ARNt con el ARNr (*véase el capítulo IV*) La primera de estas interacciones es específica para un aminoácido dado. La segunda

únicamente reconoce un ARNt que no sea el iniciador. La etapa siguiente del proceso sólo se lleva a cabo en caso de que las dos interacciones sean correctas.

Los ARNt pueden unirse al sitio A en la forma anterior, llamada "enzimática", o en forma "no-enzimática", en la que no se requiere de EF-Tu ni GTP, pero en este caso la afinidad de la unión es menor.

c) Formación del enlace peptídico.

Este es el paso enzimático central del proceso de traducción. Consiste en la formación del enlace peptídico entre el extremo amino del peptidilo (o aminoácido, si es el primer ciclo de prolongación) que se encuentra en el sitio P del ribosoma, y el grupo carboxilo del aminoácido del sitio A.

La reacción es un ataque nucleofílico del grupo amino del aminoácido entrante sobre el carboxilo del peptidilo esterificado con el ARNt. Es importante señalar que esta reacción no requiere de gasto de ATP ni GTP. Una vez que se ha formado el nuevo enlace peptídico, el peptidilo ha crecido en un residuo de aminoácido, y se halla ahora unido al ARNt que está en el sitio A. En el siguiente paso, la translocación, el peptidil-ARNt es transportado del sitio A al P.

La reacción de formación del enlace peptídico es catalizada por una actividad enzimática presente en el ribosoma conocida como transferasa de peptidilo o peptidil transferasa. Aunque en algunos libros se llega a señalar (incorrectamente) que "*...la peptidil transferasa (es una) proteína ribosomal específica presente en la subunidad 50S*" (referencia III, pág. 867), en realidad hasta ahora no ha sido posible localizar un componente aislado del ribosoma que sea responsable de la actividad. La transferasa de peptidilo no parece ser

una enzima como tal, sino una función enzimática del ribosoma como un todo, en la que participan varios de sus componentes.

Mediante pruebas indirectas se ha logrado localizar la transferencia de peptidilo en la subunidad grande (los antibióticos que bloquean esta actividad se unen a la subunidad grande), y con el estudio de mutantes resistentes a antibióticos y experimentos de reconstitución se han relacionado muchas proteínas ribosomales con esta actividad. Lo mismo sucede con los ARNr. En este trabajo se revisan las evidencias que implican a los ARNr en esta y muchas otras funciones del ribosoma.

d) Translocación.

La última etapa de la fase de prolongación es la translocación, también conocida como transposición. En ella, el nuevo peptidil-ARNt del sitio A es translocado (movido) al sitio P, conjuntamente con la expulsión del ARNt descargado del sitio P y el avance del ARNm. El proceso se puede dividir en tres pasos:

- 1) El EF-G se une a una molécula de GTP.
- 2) El complejo EF-G-GTP se une al ribosoma pretranslocado, lo cual permite la liberación del ARNt descargado del sitio P, el movimiento del peptidil-ARNt del sitio A al P y el avance del ARNm un codón más adelante.
- 3) Se hidroliza el GTP, lo que permite la liberación del EF-G, el GDP y fosfato, con lo que el ribosoma queda listo para iniciar otro ciclo de prolongación.

Como puede observarse, la hidrólisis del GTP no es necesaria para la translocación en sí, sino para la posterior liberación del EF-G. El movimiento del peptidil-ARNt está impulsado probablemente por cambios en la conformación del ribosoma, y por el hecho de que la afinidad de

la unión codón-anticodón en el sitio P es 15 veces mayor que en el sitio A, y la afinidad del ribosoma por el ARNt es 20 veces mayor. La translocación puede así verse como el paso del peptidil-ARNt de un sitio de baja afinidad a uno de alta.

4) Terminación de la traducción.

La terminación es el último paso de la traducción, y el que se ha estudiado menos, por lo que su mecanismo es menos entendido que el de las otras fases de la traducción.

La terminación ocurre cuando uno de los tres posibles codones de terminación (UAG, UAA o UGA) aparece en el ARNm. El último peptidil-ARNt se halla en el sitio P, y el codón de terminación en el sitio A es reconocido por proteínas específicas llamadas factores de liberación o terminación.

En procariontes (*Escherichia coli*) existen tres factores de liberación: el factor de liberación 1 (RF-1) reconoce a los codones de terminación UAA y UAG, y el RF-2 a UGA y UAA. En eucariontes sólo se ha hallado un factor de liberación, eRF, el cual requiere de GTP para unirse al ribosoma, a diferencia de sus homólogos procariontícos.

La unión de los factores de liberación permite que el enlace de éster entre el peptidilo y el ARNt en el sitio P sea hidrolizado (posiblemente porque los factores de liberación alteran la actividad de la transferasa de peptidilo). En consecuencia, se libera la proteína terminada, el ARNt y el ARNm, y las dos subunidades ribosomales se disocian, con lo que el proceso completo de la síntesis de proteínas puede comenzar de nuevo.

Las proteínas pueden sufrir cambios después de que se han terminado de sintetizar en los ribosomas. Estos cambios, llamados modificaciones postraduccionales, pueden ser de naturaleza muy variada.

Algunos de los más comunes son:

- Desformilación de la N-formilmetionina con que se inicia la síntesis de proteínas procariótica.
- Eliminación de la metionina inicial.
- Acetilación del grupo amino terminal.
- Formación de puentes de disulfuro entre residuos de cisteína.
- Adición de grupos funcionales específicos en distintos sitios de la proteína, e.g. fosforilación, metilación, hidroxilación, glucosilación, etc.
- Unión de coenzimas y grupos prostéticos.

5) Requerimientos energéticos de la síntesis de proteínas.

La energía gastada en la síntesis de proteínas puede medirse cuantificando la cantidad de "enlaces de alta energía" (de moléculas de ATP o GTP) hidrolizados. En cada paso del proceso (adición de un aminoácido) se gastan cuatro de estos enlaces:

- 2 en la activación del aminoácido (se hidrolizan los dos enlaces de éster de fosfato del ATP).
- 1 en la unión del aminoacil-ARNt al sitio A.
- 1 en la translocación.

Como cada uno de estos enlaces tiene una energía de 7.3 KCal/mol (30 kiloJoules/mol), la cantidad aproximada es de 29.2 KCal/mol (122 kiloJoules/mol) por aminoácido (sin contar la energía gastada en la iniciación, y en la terminación eucariótica).

Por supuesto, parte de esta energía pasa a formar parte de la energía del enlace peptídico formado. La energía máxima de un enlace peptídico es de aproximadamente 5 KCal/mol (20 kilojoules/mol), así que las 24.2 KCal/mol (101 kilojoules/mol) restantes deben ocuparse en otras funciones (por ejemplo, en hacer posible la alta fidelidad de la traducción), o bien disiparse como calor.

De cualquier modo, la síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares que gastan mayor cantidad de energía. En *Escherichia coli* en crecimiento activo, la síntesis de proteínas puede ocupar hasta el 90% de la energía biosintética.

2. Papel del ARN en la evolución temprana de la vida y en el origen de la maquinaria de síntesis de proteínas:

Las teorías más recientes de evolución molecular postulan al ARN como una de las primeras moléculas autorreplicantes. Aunque el papel del ARN en la evolución molecular ya había sido propuesto desde 1968 por Crick y Orgel ⁽³⁾, los recientes descubrimientos de que el ARNr es capaz de tener actividad enzimática han impulsado fuertemente estos estudios ⁽⁴⁾.

En general es aceptado que la Tierra se formó hace aproximadamente 460 millones de años a partir de una nube interestelar de gas y polvo. La aparición de la vida sobre el planeta fue relativamente rápida: la evidencia de vida más antigua data de hace tres o cuatrocientos millones de años.

Se ha demostrado ampliamente que la formación de los bloques básicos de las biomoléculas (carbohidratos, aminoácidos, bases púricas y pirimidicas, etc.) se lleva a cabo espontáneamente en condiciones que muy probablemente semejan a las de la Tierra primitiva. Estas moléculas básicas pueden haber reaccionado entre sí, polimerizándose para formar

las primeras biomoléculas, aunque no se ha comprobado que halla sido así. Específicamente, no se conoce el mecanismo por el que se pudieron formar los primeros ácidos nucleicos.⁽¹⁾

A pesar de ésta y otras lagunas, sin embargo, se ha propuesto que la primera molécula capaz de autorreplicarse y de evolucionar fue el ARN. Anteriormente, había gran incertidumbre acerca de cuál podía haber sido la primera molécula "viva", ya que aunque las proteínas poseen la capacidad de catalizar reacciones químicas, no poseen la información necesaria para su propia síntesis. Hasta antes del descubrimiento de la actividad catalítica del ARN, se pensaba que aunque los ácidos nucleicos poseen la información que permite su replicación, no podían catalizar reacciones químicas.

La solución probable a este dilema apareció en 1981, cuando se descubrió la catálisis mediada por ARN. Desde entonces han aparecido varios ejemplos que permiten afirmar que, aunque en forma mucho más limitada que las proteínas, los ARN son capaces de catalizar varias reacciones químicas.

Partiendo de éstos hechos sumados a la evidencia de que el ARN se halla presente en todos los procesos más básicos de la célula (como cebador (*primer*) en la replicación del ADN; como mensajero acarreando la información genética a los ribosomas; formando parte de éstos y como acarreador de los aminoácidos en la traducción; en el procesamiento de los mensajeros en el empalmosoma (*spliceosome*); formando parte de una enzima, la ribonucleasa P, que procesa los ARNt, y de otra que dirige la síntesis de los telómeros en eucariontes, un gran número de coenzimas esenciales tienen ribonucleótidos como componentes; las moléculas principales de almacenamiento de energía son trifosfatos de ribonucleótidos), se ha propuesto la teoría de que los primeros seres

vivos estaban constituidos con base en una química de ARN. Esta etapa de la evolución de los seres vivos ha sido llamada "el mundo del ARN".

Existen varias razones válidas que pueden explicar el porqué el ARN, y no el ADN, fue la primera molécula "viva":

- Debido a la falta del hidroxilo en la posición 2', es probable que el ADN posea una menor capacidad para adoptar conformaciones tridimensionales complejas.
- La falta de dicho hidroxilo también puede limitar la capacidad catalítica del ADN: se ha comprobado que participa en algunas reacciones catalizadas por ARN.
- Todos los precursores de la síntesis de ADN (desoxirribonucleótidos) son sintetizados a partir de ribonucleótidos, precursores del ARN.
- La ribosa es sintetizada mucho más fácilmente que la desoxirribosa bajo las condiciones de la Tierra primitiva.

En el mundo del ARN, los ARN se hallaban (se postula) encargados de la transmisión de la información genética (se ha comprobado que el ARN es capaz de catalizar la polimerización de nucleótidos), de otras reacciones metabólicas, del almacenamiento de energía, etc.

Siguiendo con el desarrollo de las estas teorías de evolución molecular, el siguiente paso fue el "mundo de las ribonucleoproteínas".

En dicha etapa, las proteínas probablemente comenzaron a tomar parte en la catálisis de reacciones metabólicas. Esto se vería naturalmente favorecido por la mucho mayor flexibilidad y eficiencia mostrada por las proteínas, en virtud de la gran variedad de grupos funcionales que poseen.

No se sabe cómo se logró el acoplamiento de la química basada en ARN con el de las proteínas, pero se ha propuesto que quizá una primitiva replicasa hecha de ARN comenzó a unir aminoácidos con otras moléculas de ARN (los precursores de los ARNt). De este modo la puerta quedaría abierta para la síntesis de proteínas siguiendo la secuencia dictada por un genoma de ácidos nucleicos. Una coevolución de éstos últimos y las proteínas conduciría al código genético.

Dentro del mundo de las ribonucleoproteínas, el ribosoma emerge como uno de los logros más complejos. Su función es de una importancia vital: la síntesis de proteínas de acuerdo con la información genética. El ribosoma moderno es la maquinaria ribonucleoprotéica más complicada y perfeccionada que se halla en el mundo viviente. Si todas las funciones del ribosoma no han sido delegadas a las proteínas, éste tiene que obedecer a que el papel de los ARN ribosomales es vital y no puede ser realizado fácilmente por aquellas.



En este trabajo se revisa la evidencia de las funciones que continúan realizando los ARN dentro del ribosoma. Se halla que, aunque la evidencia no es concluyente, es muy probable que los ARNr participen en prácticamente todas las funciones del ribosoma. Las implicaciones de este hecho para las teorías de evolución molecular temprana, así como para la comprensión más profunda del funcionamiento del ribosoma moderno son profundas. Por un lado, el "mundo de las ribonucleoproteínas" parece cada vez más probable. Por otro, parece que habrá que dar mayor importancia a la participación del ARN en procesos centrales en el metabolismo de las células modernas.

APENDICE:

DEFINICION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

La técnica más usada en la separación y caracterización de partículas subcelulares es la centrifugación diferencial, la cual separa partículas en un medio de alta densidad por medio de la aplicación de un campo de fuerza centrifuga. En especial, los ribosomas y sus componentes se han estudiado inicialmente por esta técnica, por lo que la manera clásica de nombrarlos es refiriéndose a su coeficiente de sedimentación, medido en unidades Svedberg. Siendo así, consideré conveniente incluir una breve definición de ambos conceptos.

El coeficiente de sedimentación (s) de una molécula (o partícula) es una función de la velocidad con la que sedimenta al ser centrifugada, y es independiente del radio de la centrifuga y de la velocidad angular.

Está dado por la fórmula

$$s = \frac{dx/dt}{w^2 x},$$

donde x = distancia desde el centro de rotación, en cm.

t = tiempo de centrifugación, en segundos.

w = velocidad angular, en radianes/segundo.

Una unidad Svedberg es igual a un coeficiente de sedimentación de 1×10^{-13} seg.

En el coeficiente de sedimentación influyen los siguientes factores:

- El medio en el que se sedimenta la partícula (agua, aceite, soluciones de sacarosa, etc.)
- La forma de la partícula (entre más compacta sea, sedimentará más rápido)
- El tamaño de la partícula
- La temperatura

Por lo general, los experimentos se hacen a una temperatura constante de 20°C, en agua. El coeficiente de sedimentación obtenido en estas condiciones se denota como $S_{20,w}$.

CAPITULO II

EL PAPEL DE LOS ARNr EN LA ESTRUCTURA Y EL ENSAMBLAJE DE LOS RIBOSOMAS.

En este capítulo se considerarán primero la estructura de los ribosomales (ARNr) y los modelos actuales de su estructura secundaria, y posteriormente las interacciones cuaternarias entre algunos de ellos, los sitios a los que se unen las proteínas ribosomales en los ARNr, y algunos casos en los que cambios en la conformación de los ARNr parecen intervenir en la función del ribosoma.

1. Nomenclatura:

Tomando en cuenta la similitud estructural y funcional y la relación evolutiva entre los ARNr de la subunidad chica (16S en procariontes y 18S en eucariontes), en este trabajo utilizaré el nombre genérico "ARNr chico" para designar a estos ARNr. La situación es la misma con los ARNr más grandes de la subunidad grande, 23S de procariontes y 28S de eucariontes, por lo que me referiré a ellos en general como "ARNr grandes". Esta nomenclatura puede llegar a causar confusión si no se es cuidadoso, pero a cambio de ello permite hacer afirmaciones generales con mayor facilidad. Cuando sea necesario referirme a los ARNr de menor tamaño de la subunidad grande, utilizaré sus nombres específicos: ARNr 5S de procariontes o eucariontes y ARNr 5.8S de eucariontes.

2. Estructura de los ARN:

Los ácidos nucleicos tienen varios niveles estructurales. La estructura primaria de los ácidos ribonucleicos (ARN) consiste simplemente en la unión de nucleótidos entre sí en forma lineal, en un orden (secuencia) específico. El ARN, a diferencia del ADN, no forma normalmente una estructura de doble cadena. Sin embargo, en ocasiones en que hay tramos de secuencias complementarias entre dos moléculas (o entre dos regiones de la misma molécula), se forman estructuras de doble cadena similares a las del ADN. Cuando este apareamiento es intramolecular, la estructura pertenece a un nivel superior, por lo que se habla de **estructura secundaria**.

Los tramos de doble hélice en los ARN tienen usualmente la estructura A. La presencia *in vivo* de la estructura Z ha sido comprobada mediante el uso de anticuerpos específicos. No se ha comprobado la existencia de la estructura B del ARN *in vivo*⁽⁶⁾.

La **estructura secundaria** de las moléculas de ARN, al involucrar tanto tramos no-apareados como otros de doble cadena, puede mostrar varios motivos estructurales definidos, por ejemplo⁽⁶⁾:

- **Horquillas**, que son tramos en los que dos secuencias complementarias que se aparean entre sí flanquean a otra no-apareada, lo que origina una estructura con un "tallo" de doble hélice que tiene en su extremo un "bucle".
- **Bucles internos**, que son regiones no-apareadas que aparecen en una de las dos cadenas que forman un tramo de doble hélice, lo que les da la apariencia de "burbujas" que interrumpen un lado de la hélice.

- **Abultamientos.** causados por una o dos bases no-apareadas en una de las dos cadenas de una hélice. En realidad se trata de bucles internos de una o dos bases. Las bases no-apareadas en los abultamientos pueden intercalarse en la doble hélice o bien estar salidos.

Aunque en principio es fácil analizar la secuencia de una molécula de ARNr y hallar fragmentos que sean complementarios y puedan aparearse, en la práctica es sumamente difícil definir cuáles de los cientos y hasta miles de posibilidades distintas de apareamiento son las que se hallan en la estructura *in vivo* de la molécula⁽⁷⁾.

Principalmente tres técnicas han sido utilizadas para definir la estructura secundaria de los ARNr⁽⁸⁾:

- a) La utilización de reactivos químicos o de enzimas, e.g. RNasas, que actúan sólo sobre ARN de cadena sencilla para detectar aquellas partes de un ARNr que forman dobles hélices (y son por tanto portegidos de la modificación química o la degradación por las RNasas), y aquellas que no están apareadas;
- b) El aislamiento directo de fragmentos de doble cadena por tratamiento con RNasas específicas para cadena sencilla y posterior secuenciación, y

c) La comparación filogénica, en la que se tratan de hallar rasgos de la estructura secundaria que coincidan con las estructuras secundarias de otras moléculas de ARNr que hayan sido deducidas con anterioridad con base en las técnicas anteriores. En esta técnica, el hallazgo de fragmentos dentro de una hélice propuesta en los que los cambios de una base son compensados por el cambio por la base complementaria en la cadena opuesta es considerado como prueba de la existencia de esa hélice.

Las moléculas de ARN también pueden presentar interacciones entre dos o más de sus partes de un nivel estructural superior al apareamiento de bases. Estas interacciones constituyen la llamada **estructura terciaria**, e involucran generalmente estructuras como las siguientes⁽⁶⁾:

- **Tríos de bases**, formados por dos bases apareadas en la forma normal (apareamiento Watson-Crick) y una tercera base unida por otros enlaces de hidrógeno (indicados por dos puntos) a una de ellas, *e.g.* AA:U; AG:C, etc. Estos enlaces estabilizan la estructura terciaria.
- **Pseudonudos**, formados por una horquilla más una hebra de cadena sencilla que forma pares de bases con las bases no-apareadas del bucle de la horquilla (en un nudo auténtico se requeriría que la hebra no-apareada pasara a través del bucle).

Además de estos tres niveles estructurales, los ARN pueden presentar interacciones con otras moléculas de ARN, las cuales se considera que constituyen la estructura cuaternaria. Algunos autores

incluyen a las uniones entre ARN y proteínas entre las interacciones cuaternarias.

Las interacciones terciarias y cuaternarias de los ARNr no han sido estudiadas en forma tan detallada como su estructura secundaria. Actualmente se tienen algunos datos que permiten relacionar los modelos de la estructura secundaria de las ARNr con la localización tridimensional de éstos en las subunidades ribosomales.

En general, los ARNr no presentan nucleótidos modificados post-transcripcionalmente como metilaciones en la base o en la ribosa, pseudouridinas, ribotimidinas, etc. (menos del 1% (9)).

A) Estructura del ARNr 5S.

El ARNr 5S se halla en la subunidad grande de los ribosomas eucarióticos y procarióticos, y tiene un tamaño de aproximadamente 120 bases.

La estructura secundaria del ARNr 5S fue la primera que se estudió, debido a su pequeño tamaño. El modelo más aceptado actualmente es el presentado por Noller (9) (véase la figura 4). Este modelo muestra todas las características estructurales de los ARNr mayores, como son hélices, bucles y abultamientos de una y de dos bases. Ha sido obtenido principalmente por análisis comparativo de secuencias. El modelo para el ARNr 5S humano es equivalente al de *Escherichia coli* (9).

Existen algunas propuestas para la estructura terciaria de este ARNr en procariontes (10), que puede ser similar a la de eucariontes, y es consistente con la evidencia de algunos sitios del ARNr 5S que están expuestos en la superficie del ribosoma y pueden así interactuar con

ARNt, y con los ARNr 16S y 23S. El ARNr 5S parece estar localizado en la interfase de las subunidades ribosomales⁽⁹⁾.

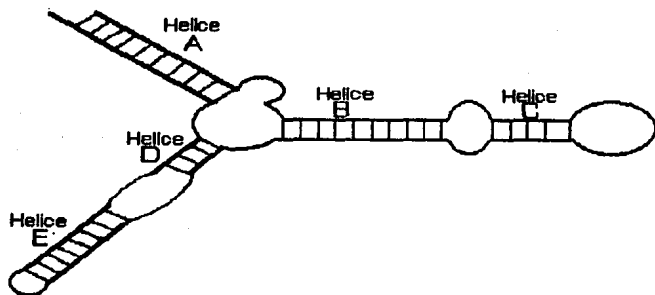


Figura 4: Estructura secundaria del ARNr 5S.

B) Estructura del ARNr 5.8S.

El ARNr 5.8S se halla sólo en los ribosomas eucarióticos, en la subunidad grande. Tiene un tamaño de aproximadamente 160 bases, y se une con el ARNr 28S por enlaces de hidrógeno .

Aunque su estructura secundaria no ha sido muy estudiada, Nazar⁽¹¹⁾ ha hallado que las secuencias de varios ARNr 5.8S es muy similar a la de la porción terminal 5' del ARNr 23S de *Escherichia coli*. La homología entre estos ARNr es del 50% (con algunas inserciones y pérdidas). Nazar propone que esta región del ARNr 23S cumple en *Escherichia coli* la misma función que el ARNr 5.8S en eucariotes.

Otros autores (citados en Brimacombe ref 2) han hallado que la secuencia del ARNr 4.5S de cloroplastos es equivalente al extremo 3' del ARNr 23S bacteriano.

Un modelo propuesto para la estructura del ARNr 5.8S de rata se muestra en la figura 5(13).

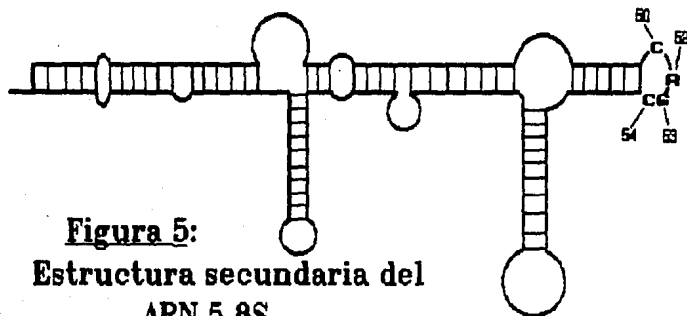


Figura 5:
Estructura secundaria del
ARNr 5.8S.

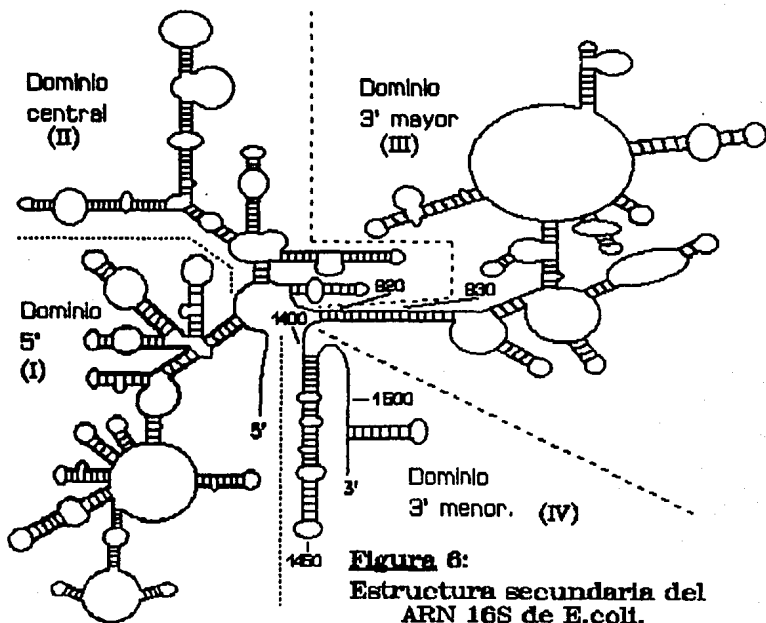
C) Estructura del ARNr chico.

El ARNr chico se halla en la subunidad chica del ribosoma, y como se verá a lo largo de este trabajo, es de gran importancia en la traducción. En procariontes (ARNr 16S), tiene un tamaño de aproximadamente 1500 bases. En eucariontes su tamaño es más variado entre especies, pero se halla alrededor de las 1900 bases en mamíferos (ARNr 18S). En mitocondrias y protozoarios como *Trypanosoma* su tamaño varía entre 600 y 1,000 bases(14).

La estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli* ha sido ampliamente estudiada, por lo que actualmente se cuenta con un modelo que es generalmente aceptado. La información para construir este modelo se ha obtenido principalmente por aislamiento de fragmentos apareados (hélices) por digestión con RNasas específicas para cadena sencilla.

experimentos de protección contra la modificación química,, el uso de reactivos específicos para hebras sencillas o dobles, de ARN, y el análisis comparativo entre las secuencias de ARNr 16S de varios organismos conjuntado con los estudios de minimización de energía para descartar estructuras secundarias demasiado inestables (6).

El modelo actual (figura 6) se basa en el derivado originalmente por Noller y Woese(7) para *Escherichia coli*, y consta de cuatro regiones definidas, o dominios, los cuales han sido llamados Dominio 5' (ó I), Dominio Central (ó II), Dominio 3' Mayor (ó III) y Dominio 3' Menor (ó IV). Existen regiones muy conservadas evolutivamente en el ARNr 16S, particularmente alrededor de los nucleótidos 530, 1400 y 1500. Aunque existen otros modelos propuestos para la estructura del ARNr 16S, las diferencias que presentan no son demasiado importantes. El modelo básico de Noller y Woese es aceptado por la mayoría de los investigadores de este campo.



Una vez que el modelo para el ARNr 16S de *Escherichia coli* fue obtenido, se comenzaron a hallar pruebas de que la estructura secundaria básica se ha conservado a través de la evolución en grupos muy diversos de organismos. Stiegler *et al.*⁽¹⁴⁾ compararon las estructuras secundarias de los ARNr chicos 16S de cloroplasto de maíz, 18S de citoplasma de levadura, 12S de mitocondria de placenta humana y 15S de mitocondria de levadura. Hallaron una gran conservación de estas

estructuras, lo que les permitió establecer un modelo general de la estructura secundaria de ARNr chicos que es fundamentalmente similar al de *Escherichia coli*, conservando la estructura con cuatro dominios y gran cantidad de hélices, bucles, abultamientos, regiones no-apareadas, etc. Las regiones conservadas parecen hallarse interrumpidas por tramos cortos no-conservados, lo que puede señalar las regiones de mayor importancia funcional y que por tanto se hallan sometidas a una mayor presión evolutiva de conservación.

Douthwaite *et al.*⁽¹⁵⁾ estudiaron la estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli* y *Bacillus stearothermophilus* y el 18S de *Saccaromyces cerevisiae* por medio de su sensibilidad a la modificación con agentes químicos y al corte por nucleasas. El modelo que obtuvieron es esencialmente igual al de Noller y Woese, incluyendo la estructura en dominios.

Chan *et al.*⁽¹⁶⁾ secuenciaron el ARNr 18S de hígado de rata y propusieron una estructura secundaria que, de nuevo, es totalmente equivalente a la de *Escherichia coli*, aunque hay diferencias en lugares bien definidos.

De la Cruz *et al.*⁽¹⁷⁾ estudiaron la estructura secundaria de uno de los ARNr más chicos que se conocen, en el protozoario *Leishmania tarentolae*. Este organismo posee una única mitocondria, llamada cinetoplasto, cuyos ARNr grande y chico tienen un coeficiente de sedimentación de 12S y 9S, respectivamente. Los autores secuenciaron el gen del ARNr 9S y, además de hallar un 84% de homología con el ARNr 9S de *Trypanosoma brucei*, propusieron un modelo de estructura secundaria que presenta los cuatro dominios característicos, aunque muchas regiones presentes en *Escherichia coli* y otros organismos se han perdido. Esto llevó a los autores a sugerir que el ARNr 9S constituye

un ejemplo de un ARNr "mínimo", en el que sólo se han conservado los sitios cuya función es esencial en el ribosoma. Los sitios que se han conservado - gran parte del dominio 5', aproximadamente la mitad del central y partes pequeñas de los 3' mayor y menor- incluyen la región 1400 (véanse los capítulos III y IV) y algunas regiones que se unen a proteínas ribosomales. La región Shine-Dalgarno (véase el capítulo de iniciación) no se ha conservado en el ARNr 9S.

D) Estructura del ARNr grande.

El ARNr grande se halla en la subunidad grande del ribosoma. En *Escherichia coli* y otros procariontes tiene un coeficiente de sedimentación de 23S, y tiene aproximadamente 2904 bases. En eucariontes su tamaño es más variado (de 12S a 28S); el ARNr 28S de rata tiene 4718 bases.

Debido a su gran tamaño, ha sido más difícil llegar a un modelo general. Noller *et al.*'^{1,2} propusieron un modelo general basado en la comparación de las secuencias de los ARNr 23S de *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* y del ARNr 28S de mitocondria de ratón (y la secuencia parcial del ARNr grande de cloroplasto de maíz). También compararon la sensibilidad de los dos primeros a reactivos específicos para cadena sencilla. El modelo que propusieron (véase la figura 7) consta de seis regiones o dominios, numerados del I al VI, situados alrededor de un bucle central. De los seis dominios, los conservados son el II, el IV y el V, lo que señala su posible importancia funcional.

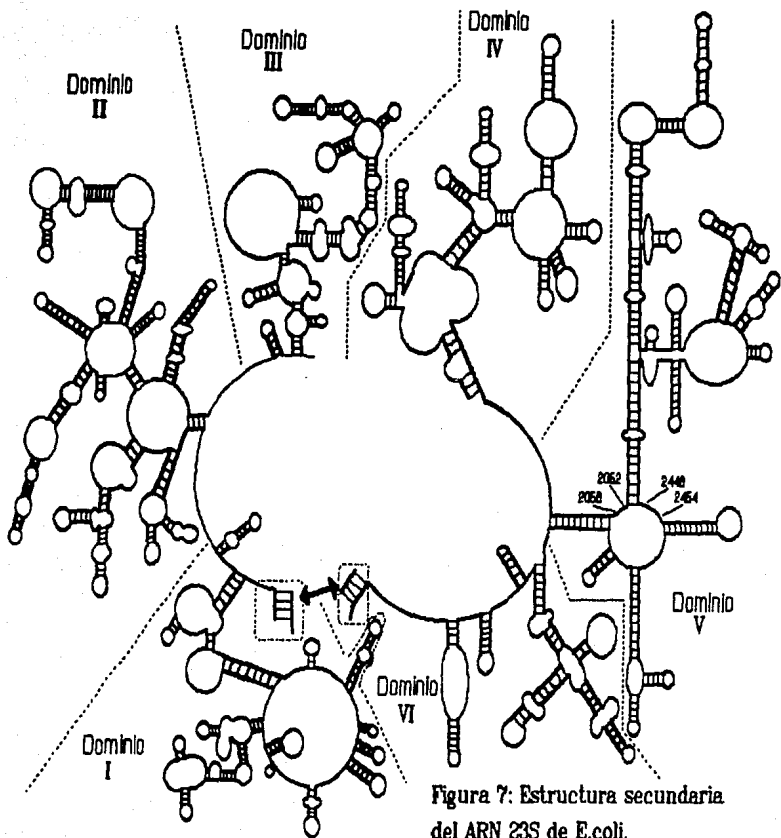


Figura 7: Estructura secundaria del ARN 23S de *E. coli*.

Es interesante hacer notar, como señalan Noller y colaboradores, que se ha hallado que algunos ARNr raros parecen ser fragmentos del ARNr grande original que se han separado en el curso de la evolución. Ejemplos de esto son el ARNr 2S de ribosomas 80S de insectos y el ARNr 4.5S de los cloroplastos de plantas superiores, los cuales equivalen a los nucleótidos 140 a 165 y al extremo 3' del ARNr 23S de *Escherichia coli*, respectivamente. En la subunidad grande, estos ARNr "fragmentados" probablemente toman la misma conformación tridimensional que los ARNr grandes de los cuales derivan.

La estructura secundaria de una de las regiones más fuertemente conservadas del ARNr grande, el bucle central del dominio V, ha sido comprobada en detalle por Marconi y Hill para el ARNr 23S de *Escherichia coli*⁽¹⁹⁾. Utilizando hibridación con sondas de ADN específicas, hallaron que las bases 2448-2454 se hallan en forma no apareada. Lo mismo sucede con las bases 2058-2062, en un bucle cercano. (véase la figura 7) Esta región del ARNr grande ha sido implicada en el sitio de unión de los ARNt en los sitios A y P, cerca del anticodón (véase el capítulo IV).

Clark et al.⁽²⁰⁾ propusieron un modelo para la estructura secundaria del ARNr 28S de *Xenopus laevis*, basado en el del ARNr 23S de *Escherichia coli* y un modelo del ARNr 26S de levadura. Comparando esos y otros modelos parciales de ARNr grandes, propusieron que el ARNr puede crecer en el transcurso de la evolución por inserción de secuencias en sus genes. Para apoyar su hipótesis, señalan que hay varios ejemplos de genes de ARNr en los que hay secuencias espaciadoras (intrones) que son transcritos y luego removidos por empalme (splicing). En otros casos, los fragmentos separados no son ligados.

como los ARNr 28S y 5.8S, o el ARNr 28S de insectos y eucariontes inferiores, el cual es separado en dos mitades α y β . En general, la propuesta es que en regiones conservadas del ARNr, los intrones que existan en los genes son retirados y las secuencias son empalmadas. En regiones no-conservadas, los fragmentos separados pueden no empalmarse. En casos en los que el espaciador transcrito no es quitado, se tiene una expansión del ARNr, como se observa al comparar el ARNr 28S de *Xenopus laevis* con el ARNr 23S de *Escherichia coli*.

3. Papel de los ARNr en el ensamblaje de los ribosomas.

Desde hace bastante tiempo se sabe que los ARNr juegan un papel importante en la estructura del ribosoma. Constituyen por sí solos el 60% de su masa. Se hallan en las dos subunidades, y durante años se pensó que su única función era la de servir como soporte para la unión de las proteínas ribosomales, las cuales podían así juntarse en las posiciones correctas para ejercer sus actividades en la función del ribosoma.

Durante los años 60. Nomura y su grupo obtuvieron un "mapa de ensamblaje" de los componentes del ribosoma, en el que se ve la necesidad de que algunos componentes se unan al ribosoma en formación antes de que otros puedan hacerlo⁽²¹⁾. Esto supone una colaboración entre los componentes ribosomales que permite el autoensamblaje del organelo. Los ARNr participan en la unión de proteínas ribosomales, pero contactos entre distintos ARNr también intervienen en la unión del ARNr 5.8S a la subunidad grande en eucariontes, y el ARNr 5S parece ser capaz de adquirir su conformación nativa sin necesidad de proteínas.

Todo esto subraya la importancia de los ARNr en forma activa en el ensamblaje de los ribosomas, y no solo como un soporte estructural.

A) Conformación de los ARNr:

Algunos ARNr adquieren por sí solos su conformación.

El ARNr 5S es un componente indispensable de los ribosomas procarióticos y eucarióticos. Raué *et al.*⁽²²⁾ hicieron experimentos de reconstitución de ribosomas procarióticos con ARNr 5S con alteraciones en la hélice formada por el apareamiento de los extremos 3' y 5'. Aunque no detectaron un efecto funcional en los ribosomas, sí detectaron una disminución en la velocidad de reconstitución. Este efecto se atribuye principalmente a una disminución de la capacidad del ARNr 5S para unir proteínas ribosomales.

Fox y Wong⁽²³⁾ comprobaron, utilizando métodos hidrodinámicos y espectroscópicos, que el ARNr 5S de *Escherichia coli* desnaturalizado con urea es capaz de volver a adquirir su conformación original si se elimina la urea y se utiliza una temperatura elevada (60°C) y una concentración de Mg²⁺ de 0.02M. Este hecho indica que la información necesaria para que el ARNr adquiera su conformación nativa se halla contenida en él mismo (y en el sistema acuoso en el que se halla), y no en las proteínas que se le unen.

Otros autores (citados en la referencia 23) han hallado que el ARNr 16S también puede adquirir su conformación nativa en ausencia de proteínas. Algunos resultados de Klein *et al.*⁽²⁴⁾ no concuerdan con estas indicaciones. Estos autores han hallado por microscopía electrónica que la conformación del precursor del ARNr 16S de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* es diferente de la del ARNr 16S maduro

nativo. Si se trata con calor al ARNr 16S maduro, su conformación cambia para volverse similar a la del precursor. Lo mismo sucede con el ARNr 23S⁽²⁵⁾. Los autores proponen que la conformación no-nativa del precursor es cambiada por la unión de proteínas ribosomales durante el ensamblaje del ribosoma, para dar la conformación del ARNr nativo.

Sin embargo, King *et al.*⁽²⁶⁾ han comprobado, utilizando células de *Escherichia coli* deficientes en RNasa III, que el precursor del ARNr 23S (que tiene hasta varios cientos de nucleótidos más que el ARNr maduro) es capaz de ser incorporado a los ribosomas y de funcionar en la síntesis de proteínas (en estas células, el ARNr 16S sí es procesado). Esto indica que, si en realidad es necesaria una conformación especial en el ARNr 23S, ésta puede ser adquirida por el precursor sin necesidad de ser procesado primero.

Varios nucleótidos particulares han sido implicados en la maduración de los precursores de los ARNr 16S y 23S de *Escherichia coli* por Stark *et al.*⁽²⁷⁾ Para su estudio, utilizaron un sistema de genes en plásmidos con alto número de copias y maxicélulas cuyos cromosomas fueron degradados con luz ultravioleta, lo que les permitió evitar la expresión de los varios genes de los ARNr propios de las células. Sus resultados indican que las bases 704 y 1504 del ARNr 16S son indispensables para la maduración de su precursor y el ensamblaje de la subunidad 30S. Las bases 615 y 1384/1385 son necesarias para el ensamblaje de la subunidad 30S, y la base 365 del ARNr 23S es indispensable para el ensamblaje de la subunidad 50S, aunque no para el procesamiento del precursor.

Lo mismo parece ser cierto del ARNr 5S eucariótico, como demuestran experimentos de McDougall y Nazar⁽²⁸⁾, quienes probaron la accesibilidad a la modificación por etilnitrosourea del ARNr 5S de

levadura en su forma libre o bien unido a proteínas. Los sitios sensibles a este reactivo son los mismos en ambos casos, lo que sugiere que la conformación del ARNr es básicamente la misma.

Es posible que las proteínas únicamente ayuden al ARNr 5S a adquirir su conformación correcta, o que la estabilicen. Lo mismo puede ocurrir con los otros ARNr, lo que subraya aún más la importancia de los ARNr en la estructura del ribosoma, independientemente de las proteínas ribosomales.

B) Unión del ARNr 5.8S al ARNr 28S:

El ARNr 5.8S se une al ARNr 28S por apareamiento de bases.

Existe abundante evidencia de que la unión del ARNr 5.8S a la subunidad grande se logra mediante la interacción con el ARNr 28S.

Sitz *et al.*⁽²⁹⁾ utilizaron técnicas de reconstitución para comprobar que el cambio del nucleótido 2 del ARNr 5.8S (G en mamíferos por A en tortuga y pollo) ocasiona que el complejo con el ARNr 28S sea más estable. Este nucleótido está en la zona propuesta de unión con el extremo 5' del ARNr 28S, que comprende los primeros 20 nucleótidos del extremo 3' del primero.

El grupo de Norman Pace⁽³⁰⁾, por protección contra nucleasas y pirocarbonato de dietilo, hallaron que además de los primeros 20 nucleótidos, los 20-30 nucleótidos del extremo 5' del ARNr 5.8S de ratón parecen interactuar también con el ARNr 28S, en secuencias aproximadamente a 300-400 nucleótidos del extremo 5'. Esto es apoyado por las secuencias de los ARNr 28S de otros eucariontes, que presentan también secuencias complementarias al ARNr 5.8S. El mismo grupo ha

comprobado esta unión de dos sitios independientes en el ARNr 5.8S de ratón al ARNr 28S, utilizando ARNr 5.8S partido en dos mitades⁽³¹⁾. Ambas se unen al ARNr 28S con la mitad de la fuerza de unión del ARNr 5.8S completo.

En los casos anteriores, se requiere que el apareamiento entre los extremos 3' y 5' del ARNr 5.8S sea roto. Así, ambos extremos quedarían libres para aparearse con las dos zonas del ARNr 28S.

Pace y colaboradores han caracterizado el sitio de unión en el ARNr 28S con más detalle⁽³²⁾. Utilizando fragmentos de ADN complementarios al extremo 5' del ARNr 28S de ratón y viendo si su unión impedía el apareamiento con el los extremos 5' o 3' del ARNr 5.8S, hallaron que las primeras 1400 bases del extremo 5' del ARNr 28S son las únicas requeridas. Experimentos utilizando el fragmento cercano al extremo 3' del ARNr 28S indican que hay una posible unión débil (no por apareamiento) entre esta región y el ARNr 5.8S.

Choi⁽³³⁾ halló también datos que apoyan la unión del ARNr 5.8S a la zona terminal 3' del ARNr 28S de células de hepatoma de Novikoff. Utilizando el fragmento de α -sarcina, halló que el ARNr 5.8S puede unirse a los dominios VI y VII del ARNr 28S, mientras que el ARNr 5S puede unirse al dominio VII. Es importante señalar que en bacterias el extremo 3' del ARNr grande (23S) puede aparearse con el extremo 5', el cual es homólogo al ARNr 5.8S de eucariontes. Es decir, el apareamiento entre estas dos secuencias parece haberse conservado de procariontes a eucariontes.

C) Unión de proteínas ribosomales a los ARNr y ensamblaje del ribosoma.

Los ARNr sirven como soporte para la unión de proteínas en el ribosoma.

Las proteínas ribosomales constituyen el 34% de la masa del ribosoma de *Escherichia coli*, y el 40% en mamíferos. Tanto en procariontes como en eucariontes, el número de proteínas ribosomales excede con mucho al de moléculas individuales de ARNr (21 proteínas en la subunidad chica y 31 en la grande en *Escherichia coli*, y 33 y 49 respectivamente en mamíferos). La mayoría de estas proteínas tienen sitios de unión a los ARNr, los cuales han sido localizados en muchos casos.

Los métodos que se usaron en los primeros estudios para averiguar qué proteínas ribosomales se unen a los ARNr (en *Escherichia coli*) son principalmente la inmunomicroscopía electrónica, el entrecruzamiento con reactivos bifuncionales, los estudios de difracción de neutrones utilizando proteínas deuteradas, y la transferencia de energía de fluorescencia. Los estudios de digestión con nucleasas permitieron localizar los sitios de unión más específicamente dentro de las moléculas de ARNr⁽²⁴⁾.

La unión de proteínas a los ARNr, a pesar de no ser una función propiamente dicha de éstos, es un aspecto importante desde el punto de vista del presente trabajo. En gran medida, la estructura del ribosoma es estabilizada gracias a las interacciones de las proteínas ribosomales con los ARNr. Es posible que las funciones primordiales de estas proteínas sean el ensamblaje del ribosoma y en la estabilización de su estructura⁽²¹⁾. Noller⁽²⁾ afirma que "gran parte de la estructura de los ARNr ha evolucionado para permitir interacciones con

proteínas ribosomales y, muy probablemente, con factores de traducción". En esta sección se considerarán los sitios de unión de proteínas ribosomales a los distintos ARNr.

1) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr 5S.

Los estudios de los años 70 con *Escherichia coli* indican que las proteínas L5, L18 y L25 pueden unirse al ARNr 5S⁽³⁴⁾. Algunos estudios permitieron definir sitios precisos de unión para las proteínas L18 y L25 en la región de las bases 69 a 120⁽³⁵⁾.

Las hélices B y C y el bucle que va de 40 a 50 se han implicado específicamente en la unión de L18, y las hélices D y E (véase la figura 4) en la unión de L25⁽³⁶⁾. La unión de L18 causa cambios en la conformación del ARNr 5S, pero no se han hallado correlaciones funcionales para este fenómeno. Más específicamente, los nucleótidos 41, 66 y 103 han sido implicados en la unión de las proteínas L18 y L25⁽³⁷⁾.

También se ha hallado unión de la proteína L15 al ARNr 5S, y en condiciones de baja concentración de Mg^{2+} se ha detectado que se puede formar un complejo ribonucleoprotéico entre el ARNr 5S, ARNt, y las proteínas L2, L3, L5, L16, L17, L18, L21, L25, L33, y L34^(38,39).

En estudios realizados con ribosomas de *rata* se ha hallado que las proteínas L6, L7, L18 y L19 se unen al ARNr 5S⁽⁴⁰⁾. Aunque algunas proteínas ribosomales de *rata* se pueden unir al ARNr 5S de *Escherichia coli*, lo contrario no sucede⁽⁴¹⁾.

La proteína L5 también ha sido hallada unida al ARNr 5S por diversos estudios^(42,43,44). El sitio de unión se ha localizado en la

región terminal 3' del ARNr 5S⁽⁴³⁾. Otras proteínas que se unen al ARNr 5S de rata son L3-4, L7, L19, L22, L21-23, L26-27, L29 y L32-27⁽⁴⁴⁾.

2) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr 5.8S.

Las proteínas ribosomales L6, L8, L19, S9 y S13 se unen al ARNr 5S en ribosoma de rata^(41, 47). L6 es capaz de unirse también al ARNr 5S y al ARNr, aunque mediante tres sitios de unión distintos⁽⁴¹⁾.

Estudios posteriores indican que el ARNr 5S también puede unirse las proteínas L3, L4, L7, L13 y L15⁽⁴⁸⁾.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas L13, L14, L17, L19, L21, L24, L25, L27, L29, L30, L33, y L39 se unen al ARNr 5.8S⁽⁴⁹⁾. Como las proteínas L19, L31 y L33 se hallan en los sitios ribosomales A y P, es posible que el ARNr 5.8S juegue algún papel en la unión del ARNr⁽⁵⁰⁾ (véase el capítulo IV).

3) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr chico.

En estudios de la década de los 70, se hallaron sitios de unión en el ARNr 16S de *Escherichia coli* para las proteínas S4, S7, S8, S13, S15, S17 y S20⁽⁵⁴⁾. Posteriormente se ha hallado que también las proteínas S5, S6, S9(S11), S16 y S18 se unen al ARNr 16S. Otras proteínas se unen con menos afinidad⁽⁵⁵⁾.

Los sitios específicos de unión en el ARNr 16S han comenzado a ser caracterizados: S7 se une alrededor del nucleótido U₁₂₃₉; S1 se une a las bases 861-889 y quizá también al extremo 3'⁽⁵²⁾; S9 se une a siete sitios en los dominios 3' mayor y menor, S7 a las bases 1240, 1265 y 1378, S5 al dominio 3' menor⁽⁵³⁾, S4 al extremo 5' del ARNr 16S⁽⁷⁾.

El estudio de los sitios de unión a proteínas ribosomales es cada vez más detallado, como lo demuestra un trabajo de Gregory y Zimmermann⁽⁵⁴⁾, en el que se usan métodos de ADN recombinante para mutagenizar el sitio de unión de S8, los nucleótidos 583 a 653 en la llamada hélice S8 del dominio central del ARNr 16S (véase la figura 8). Para superar los problemas que implica mutagenizar el gen del ARNr 16S en *Escherichia coli*, debido a que hay múltiples genes para los ARNr, los autores utilizaron plásmidos con alto número de copias (con lo que el 60% de los ribosomas contenían el ARNr mutado) o sistemas de maxicélulas que han perdido su ADN (que duran poco pero tienen un 100% de ribosomas mutados). Gracias a esto, pudieron definir que el bucle entre los segmentos 596-597 y 641-643 es especialmente necesario para la unión de S1. Esta región del ARNr 16S se halla muy conservada evolutivamente.

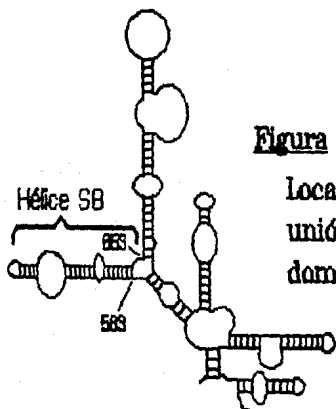


Figura 8:

Localización de la hélice de unión a la proteína S8 en el dominio central del ARNr 16S.

Analizando la composición y propiedades generales de los ribosomas reconstituidos con el ARNr 16S incompleto, Zagorska et al.⁽⁵⁵⁾ concluyeron que los 160 nucleótidos del extremo 3' no son necesarios para la unión de proteínas ribosomales.

La unión de proteínas ribosomales al ARNr chico no ha sido muy estudiada en eucariotes. Se ha hallado que el ARNr 18S de rata se une a las proteínas S2 y S15⁽⁵⁶⁾.

4) Proteínas ribosomales que se unen al ARNr grande.

En *Escherichia coli* se sabe desde hace varios años que el ARNr 23S puede unirse a las proteínas L2, L4, L6, L11, L13, L17/L12, L18, L20, L22, L24 y L25^(34, 57).

Los sitios de unión han sido caracterizados con mayor detalle posteriormente. Algunos sitios probables de unión en el ARNr 23S de *Escherichia coli* son los de las siguientes proteínas^(57, 20):

- L1 (2084-2224),
- L4 (bases 613-617),
- L6 (2473-2481),
- L11 (1052-1112),
- L20 (800-850),
- L21 (540-548),
- L23 (1342-1416 y 1588-1619),
- L24 (10-530),
- L27 (137-141) y
- L29 (2332-2337).

También se ha caracterizado el sitio de unión de la proteína L1 de *Escherichia coli* a su propio ARNr 23S y al de *Proteus vulgaris*.

hallándose que en ambos casos consta de los nucleótidos 2084 a 2200⁽⁵⁵⁾.

En el ARNr grande (26S) del eucariote *Dictiostelium discoideum* se ha comprobado que existe una región homóloga a la región de unión de la proteína L1 de *Escherichia coli*⁽⁵⁶⁾ (bases 2090-2200), con gran conservación de la secuencia y de la estructura secundaria. Esta región es capaz de unirse a la L1 de *Escherichia coli*, lo que indica una conservación de las regiones de unión de proteínas en los ARNr, aunque no se ha comprobado si la L1 o su equivalente en *Dictiostelium* se une al mismo sitio.

En ribosomas de hígado de rata se han hallado sitios de unión para las proteínas L5, L6, y L8⁽⁵⁷⁾ en el ARNr 18S. Se han entrecruzado varias proteínas con el complejo de este ARNr y el ARNr 5.8S, conservándose la funcionalidad de los ribosomas. Las proteínas entrecruzadas, que probablemente están unidas a los ARNr *in vivo*, son L5, L8, L10-L13, L17-13, L19, L21-23, L32-27, L34-35 y L37 (las proteínas subrayadas se unen también con el ARNr 5S, véase arriba)⁽⁴⁶⁾.

También se han hecho estudios en mitocondrias de levadura, en los que se ha detectado que el cambio de la T₁₀₉₆ por A en el gen del ARNr 21S ocasiona que no haya mitocondrias en la célula⁽⁵⁸⁾. En mutantes en las que se da el cambio inverso, el fenotipo se revierte. La T₁₀₉₆ se halla en una zona altamente conservada, y su equivalente en *Escherichia coli* ha sido entrecruzado con la proteína L2. Basándose en esto, se propone que este nucleótido se une a una proteína ribosomal muy importante en las mitocondrias de levadura.

4. Cambios conformacionales de los ARN ribosomales en la traducción.

Algunos cambios en la conformación de los ARNr pueden tener importancia funcional en la traducción.

Existen evidencias diversas de cambios conformacionales de los ARNr que tienen alguna importancia funcional en la traducción. Los tres casos que se analizan en esta sección se relacionan, respectivamente, con cambios en el ARNr 16S que inactivan al ribosoma, cambios en el ARNr 23S que intervienen en la translocación, y cambios en los ARNr 5S y 5.8S que aún no se relacionan con ninguna función específica.

A) Cambios en la conformación del ARNr chico:

Un cambio en la conformación del ARNr chico inactiva a los ribosomas.

Los ribosomas son estables si se almacenan y manipulan en concentraciones del ión Mg^{2+} relativamente altas (aproximadamente 30mM). En concentraciones bajas (menores de 10mM), los ribosomas sufren una inactivación que es reversible si se aumenta la concentración de Mg^{2+} y se trata brevemente con temperatura alta (40-50°C). Cox *et al.* estudiaron en 1976⁽⁶¹⁾ esta inactivación en ribosomas de reticulocitos de conejo, midiendo la actividad de transferasa de peptidilo por reacción con puromicina y la síntesis de poli-fenilalanina dirigida por poli-U. Al estudiar los cambios en el ribosoma que causan la pérdida de actividad, hallaron que la inactivación va acompañada de un cambio en el coeficiente de sedimentación de la subunidad grande de 60S a 52S lo cual indica que hay un cambio en la conformación de la subunidad, y un aumento en la absorbencia a 260nm, el cual se debe probablemente a la pérdida de apareamiento de aproximadamente 100 bases en los ARNr.

Chiaruttini *et al.*⁽⁶²⁾ entrecruzaron proteínas de la subunidad 30S de *Escherichia coli* con el ARNr 16S utilizando un reactivo bifuncional. Hallaron que, aparte de las proteínas S5, S7, S9, S11, S12 y S13, las cuales se entrecruzan tanto en subunidades activas como inactivas, existe un aumento en el entrecruzamiento de las proteínas S10, S15, S16, S17, S18 y S21 en las subunidades inactivas, y se logra entrecruzar la proteína S8, a diferencia de las activas.

Adicionalmente, comprobaron que las preparaciones de subunidades inactivadas contienen una mayor proporción de subunidades incapaces de asociarse y formar ribosomas 70S.

Estos datos, conjuntamente con los resultados de otros autores que confirman que hay cambios en el ARNr 16S de *Escherichia coli* al inactivar los ribosomas, (citados en la referencia 62) indican que dicho cambio afecta no sólo la estructura del ribosoma, sino su funcionalidad.

El cambio conformacional en el ARNr 16S de los ribosomas inactivados por bajas concentraciones de Mg^{2+} ha sido estudiado con mayor detalle por Moazed *et al.*⁽⁶³⁾, quienes utilizaron un reactivo específico para ARN de cadena sencilla para observar las diferencias en la conformación del ARNr 16S en subunidades 30S activas e inactivas. La modificación se detectó por extensión de cebadores por la transcriptasa inversa. Los cambios de reactividad que se detectaron se concentran en el dominio 3' menor (nucleótidos 1400-1500) y en los nucleótidos 920-930 del 3' mayor (véase la figura 6). El cambio no consiste únicamente en un "abrimiento" de la estructura secundaria, puesto que hay sitios en los que la reactividad aumenta y otros en los que disminuye.

Dentro de los varios cambios en esta región, Ericson y Wollenzien⁽⁶⁴⁾ caracterizaron un cambio en el apareamiento del segmento

921-925 en la base del dominio 3' mayor del ARNr 16S de *Escherichia coli*, el cual parece aparearse con la región 1532-1534 en los ribosomas inactivos, y con la región 1391-1393, en los ribosomas activos (ambas regiones se hallan en el dominio 3' menor). En particular, los autores entrecruzaron el nucleótido C₉₂₄ con la U₁₃₉₃ en ribosomas activos y con la U₁₅₃₂ en ribosomas inactivados por baja concentración de Mg²⁺. La complementariedad entre estas regiones en el ARNr chico se ha conservado evolutivamente en eucariontes, muchas eubacterias, cloroplastos y algunas arqueobacterias, aunque no en mitocondrias.

El mecanismo por el cual estos cambios en la conformación inactivan a los ribosomas es desconocido, y debe ser complejo, ya que hay cambios no sólo en varias regiones del ARNr chico, sino también en el grande (véase adelante). Sin embargo, una propuesta plausible es la de que el apareamiento del extremo 5' del ARNr 16S con la región 921-925 en los ribosomas inactivados impida que la secuencia Shine-Dalgarno interactúe con el ARNm. Backendorf *et al.* propusieron que la secuencia Shine-Dalgarno podría aparearse intramolecularmente después de la fase de iniciación. Este apareamiento podría ser igual al detectado en las subunidades 30S inactivadas por baja concentración de Mg²⁺.

Por otro lado, otros autores (citados por Moazed *et al.* en la referencia 35) han hallado que en los ribosomas inactivados, la unión de ARNt "no enzimática" (sin factores de traducción) se halla impedida, pero no la mediada por estos factores. Moazed *et al.* sugieren que los factores son capaces de favorecer el cambio del ARNr 16S de la conformación inactiva a la activa sin necesidad de calor.

B) Cambios en la conformación del ARNr 23S:

Un cambio en la conformación del ARNr 23S parece intervenir en la translocación y debilita la unión entre las subunidades ribosomales.

Al aislar ribosomas de *Escherichia coli* se pueden distinguir dos tipos, llamados "bien-acoplados" (*tight-coupled*) y "mal-acoplados" (*loose-coupled*). Los primeros permanecen asociados aún con concentraciones de Mg^{2+} menores de 10mM, mientras que en las mismas condiciones los ribosomas mal-acoplados se separan en subunidades 30S y 50S, y tienen una menor actividad.

Burma *et al.* (66) hicieron estudios para hallar diferencias estructurales entre los ribosomas bien y mal-acoplados. Hallaron lo siguiente:

- El ARNr 23S aislado puede unirse al ARNr 16S aislado, y que con concentraciones menores de 15mM, los ARNr de ribosomas bien-acoplados tienen una mayor capacidad de asociación.
- Al tratar ribosomas bien-acoplados con *cetoxal*, reactivo que modifica guaninas en los ácidos nucleicos, se pierde la capacidad de asociación y las subunidades se separan, mientras que en los mal-acoplados no se afecta la capacidad de asociación (en concentraciones altas de Mg^{2+}).
- La unión de ARNr 23S y ARNr 16S aislados de ribosomas bien-acoplados es afectada por el *cetoxal* de la misma forma que la unión de subunidades, mientras que los aislados de ribosomas mal-acoplados no se altera.

- Los ribosomas bien-acoplados en bajas concentraciones de Mg^{2+} tienen una mayor sensibilidad a la RNasa I que los mal-acoplados.
- El ARNr 23S de ribosomas mal-acoplados puede unir más bromuro de etidio (un agente intercalante), presenta una mayor hipercromicidad al desnaturalizarse y su espectro de dicroísmo circular tiene más elipticidad que el de ribosomas bien-acoplados, lo que indica que tiene una estructura más ordenada.

Todos estos datos indican que la conformación del ARNr 23S es distinta en los ribosomas bien-acoplados y los mal-acoplados. Esta diferencia puede ser responsable de las diferencias en la actividad que presentan los dos tipos de ribosomas.

En un trabajo posterior, el mismo grupo⁽⁶⁷⁾ halló que las subunidades 50S de ribosomas mal-acoplados pueden cambiar a la conformación bien-acoplada por tratamiento con EF-G, GTP y ácido fusídico, un antibiótico que evita que el complejo EF-G-GDP sea liberado de la subunidad 50S luego de la translocación, por lo que estabiliza al ribosoma en el estado post-translocado (véase el capítulo I). Comprobaron esto midiendo la capacidad de asociación con la subunidad 30S, la susceptibilidad de dicha asociación al tratamiento con cetoxal, la protección contra la RNasa I, la velocidad de síntesis de proteínas, la capacidad de asociación de sus ARNr 23S y 16S aislados y las gráficas de fusión del ARNr 23S. En todos los casos, las subunidades mal-acopladas y tratadas actuaron como bien-acopladas. El ARNr 23S de ribosomas mal-acoplados también puede pasar a la conformación bien-acoplada por tratamiento por calor (90°C).

También hallaron que aproximadamente el 50% de las subunidades 50S bien-acopladas pueden convertirse en mal-acopladas tratándolas con EF-G y análogos no-hidrolizables del GTP, en presencia de poli-U. Así, el cambio de mal-acoplada a bien-acoplada parece estar asociado a la presencia de GDP unido la subunidad 50S, y el cambio inverso a la presencia de GTP.

De los resultados obtenidos, los autores deducen que debe haber dos sitios en los que el ARNr 23S se une a la subunidad 30S: uno de ellos es insensible al cetoxal, y es que se halla en las subunidades mal-acopladas. En las subunidades bien-acopladas un segundo sitio, sensible al cetoxal, interviene en la unión conjuntamente con el sitio insensible. Esto explica el hecho de que el cetoxal sólo afecte la unión en subunidades 50S bien-acopladas, incluso cuando la modificación se hace usando subunidades mal-acopladas que son luego transformadas en bien-acopladas.

Finalmente, proponen un modelo en el que el complejo EF-G-GTP induce el cambio de la conformación del ARNr 23S de bien-acoplada a mal-acoplada, conjuntamente con la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al P. La hidrólisis del GTP a GDP causa que la conformación vuelva a cambiar a la bien-acoplada. El cambio conformacional parece darse en la región "tallo", donde se unen las proteínas ribosomales L10 y L7/L12, pues es ahí en donde se detecta el cambio en la sensibilidad a la RNasa I en las subunidades 50S.

Stiege *et al.* (66) utilizaron evidencia propia y de otros autores y postularon un modelo de la translocación en el que hay un cambio conformacional de la cabeza de la subunidad 30S al unirse el ARNt en presencia de ARNm, lo que protege algunos sitios de ARNr 16S de modificación química. La cabeza se balancea hacia adelante y hacia

atrás sucesivamente, lo que permite que pase (sea translocada) una molécula de ARNt a la vez. Los antibióticos neomicina y espectinomycin, que bloquean la translocación, se unen a la cabeza de la subunidad chica, lo que presta apoyo adicional a esta propuesta.

Las diferencias en los contactos entre ARNr y proteínas ribosomales de subunidades ribosomales opuestas han sido estudiadas por Abdurashidova et al. (69) utilizando ribosomas bien y mal-acoplados de *Escherichia coli*. Para ello, se entrecruzaron las proteínas y los ARNr y se identificaron las proteínas unidas (véase el capítulo III). Se supone que todas las proteínas que se identificaron, las cuales se localizan en la plataforma de la subunidad 30S o en la protuberancia pequeña de la 50S, participan en la unión de las subunidades al unirse al ARNr de la subunidad opuesta. Dentro de las de este grupo, únicamente las proteínas S12 y L5 son entrecruzadas en ribosomas mal-acoplados y no en bien-acoplados.

-----♦-----

Respecto a las dos secciones anteriores, es importante aclarar que el tratamiento de los ribosomas con concentraciones de Mg^{2+} menores de 10mM ocasiona dos fenómenos simultáneos pero distintos: a) un cambio en la conformación del ARNr 16S que inactiva al ribosoma, y b) la disociación de los ribosomas mal-acoplados, que difieren de los bien-acoplados en la conformación del ARNr 23S.

C) Cambios conformacionales en los ARNr 5S y 5.8S:

Es posible que los ARNr 5S y 5.8S cambien su conformación durante la traducción.

Hay cierta evidencia de cambios en la conformación de los ARNr 5S y 5.8S durante la traducción, aunque su posible papel aún es desconocido.

Van den Eynde y De Wachter⁽⁷⁰⁾ analizaron las secuencias de 160 ARNr 5S publicadas, y basándose en la complementariedad de bases propusieron que todas ellas caen dentro de una de cuatro clases, según el apareamiento de la hélice B. Los ARNr 5S representativos de cada clase son: a) el de *Escherichia coli*; b) el de la bacteria *Paracoccus denitrificans*; c) el de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*, y d) el del cloroplasto del alga *Chlorella ellipsoidea*. Las cuatro conformaciones distintas son interconvertibles, lo que sugiere la posibilidad de que haya cambios de la conformación del ARNr, pasando de una forma a otra.

Lo et al.⁽¹³⁾ hallaron dos conformaciones alternativas en el ARNr 5.8S de rata al hacer electroforesis en geles desnaturalizantes. Utilizando un reactivo específico para adeninas y guaninas, encontraron que los nucleótidos A₅₂ y G₅₃ son reactivos en la forma que migra más rápidamente, y no en la que migra lentamente. Otro reactivo proporcionó los mismos resultados con las citosinas C₅₂ y C₅₃, en el mismo bucle de la estructura secundaria (véase la figura 5). Como el marcado de los nucleótidos se hizo en condiciones no-desnaturalizantes, estas diferencias indican que el bucle que va de las posiciones 49 a 54 en el ARNr 5.8S puede tener dos conformaciones distintas. Es posible que durante la traducción el ARNr alterne entre las dos conformaciones.

CAPITULO III

FUNCIONES DE LOS ARNr EN LA FASE DE INICIACION DE LA TRADUCCION.

Los ARNr participan en la unión de moléculas que son indispensables para la iniciación de la síntesis de proteínas, como son al ARNm y el factor de iniciación 3 (IF-3). Hay indicios de que también pueden intervenir indirectamente en la unión del aminoacil-ARNT iniciador, al formar parte del sitio de unión de su proteína acarreadora, el factor de iniciación 2 (IF-2).

1. Unión de factores de iniciación.

Los ARNr intervienen en la unión de los factores de iniciación al ribosoma.

Los factores de iniciación son proteínas accesorias del ribosoma que intervienen en funciones diversas en la fase de iniciación (véase el capítulo I). De interés en este capítulo son los factores de iniciación 3 y 2.

En procariontes, el factor de iniciación 3 (IF-3) se une a la subunidad pequeña del ribosoma y la estabiliza en su forma libre. Al complejo de la subunidad pequeña con el factor de iniciación se le une el ARNm, con lo que queda formado el complejo ternario de iniciación. La función del factor de iniciación 3 eucariótico, eIF-3, es permitir la unión del ARNm con el complejo ternario de iniciación eucariótico.

El factor de iniciación 2 es otra proteína cuya función es unirse al aminoacil-ARNT iniciador (fMet-ARNT_i en procariontes y Met-ARNT_i en eucariontes). El complejo formado se une al complejo de iniciación de

la subunidad pequeña, lo que permite la unión de la subunidad grande y el comienzo de la síntesis de proteínas.

Al factor de iniciación 3:

El factor de iniciación 3 (IF-3) se une al ARNr chico .

Hay pruebas de que tanto el IF-3 procariótico como su contraparte eucariótica se unen en forma específica con el ARNr chico. A pesar de que su función no es la misma en eucariotes y procariontes, ambos factores intervienen en la formación del complejo de iniciación.

1) En procariontes:

El IF-3 se une al ARNr 16S e interviene en la regulación de la traducción.

Todos los estudios de unión de IF-3 en procariontes han sido hechos en *Escherichia coli*. A pesar de esto, es válido suponer que los mecanismos que funcionan en esta bacteria serán similares en su forma general a los de otros procariontes.

Desde 1973, Pon y Gualerzi hallaron que el IF-3 se une al ARNr 16S, pues ni los anticuerpos dirigidos contra proteínas ribosomales ni las proteasas parecen afectar la unión del factor a la subunidad 30S. En 1976 los mismos autores⁽⁷⁾ comprobaron que sólo el ARNr 16S es indispensable para la unión del IF-3. Para ello usaron una variedad de reactivos que se unen o modifican ya sea a las proteínas o a los ácidos nucleicos. Al tratar ribosomas con estos reactivos, hallaron que sólo los que son específicos para ácidos nucleicos afectan la unión de IF-3. Además comprobaron que varias proteínas que habían sido relacionadas con el sitio de unión por experimentos de entrecruzamiento químico no

los que son específicos para ácidos nucleicos afectan la unión de IF-3. Además comprobaron que varias proteínas que habían sido relacionadas con el sitio de unión por experimentos de entrecruzamiento químico no eran indispensables, pues la unión no era alterada en ribosomas reconstituidos sin estas proteínas.

Posteriormente ha sido posible estudiar la unión del IF-3 con el ARNr 16S con más detalle. Pon *et al.*⁽⁷²⁾, utilizando luz ultravioleta, hallaron que el factor se entrecruza principalmente con el extremo 5' de este ARNr, aunque hallaron entre 10 y 20% de entrecruzamiento con el extremo 3'. Otros investigadores han hallado entrecruzamiento con el extremo 3' en forma más consistente. Ha habido reportes de que el IF-3 desestabiliza dobles hélices de ARN y de que se une a una secuencia filogénicamente conservada en el extremo 3' del ARNr 16S lo cual ha sido comprobado por Wickstrom *et al.*⁽⁷³⁾, utilizando técnicas de diacrisis circular y resonancia magnética de protones.

Estos datos sugieren que el IF-3 puede favorecer la unión del ARNr 16S con el ARNm al desestabilizar la estructura secundaria del primero en la zona de unión al ARNm (secuencia Shine-Dalgarno, véase la 74).

Tal idea es apoyada y complementada con los experimentos de Ehresmann *et al.*⁽⁷⁴⁾, en los que entrecruzaron el IF-3 al ARNr 16S en dos sitios distintos, uno situado en los nucleótidos 1510-1520, cerca del extremo 3' del ARNr (en forma consistente con los resultados de Wickstrom), y otro en la zona 819-859, en el dominio central de la estructura secundaria del ARNr 16S (véase la figura 6). Al analizar la secuencia de esa zona, hallaron la presencia del segmento

...GGAGGU...

complementario a la secuencia Shine-Dalgarno, que está en el extremo 3' del mismo ARNr 16S. Basándose en estos hallazgos, Ehresmann y sus colaboradores proponen el siguiente modelo de la función de IF-3: El extremo 3' del ARNr 16S no se halla libre normalmente, sino apareado por medio de la secuencia Shine-Dalgarno con la secuencia complementaria del dominio central. El IF-3, al desestabilizar dicho apareamiento y unirse a la secuencia del dominio central, permite que el extremo 3' del ARNr quede libre para interactuar con el ARNm por el mecanismo Shine-Dalgarno. De esta forma el IF-3 participa en la regulación de la iniciación de la síntesis de proteínas.

Tanto la secuencia Shine-Dalgarno como la secuencia complementaria en el dominio central se hallan conservadas en arqueobacterias, eubacterias y cloroplastos, por lo que este modelo puede ser aplicable también a estos grupos de organismos. Sería interesante investigar si existe algún mecanismo equivalente en eucariotes, en los que, aunque no hay secuencia Shine-Dalgarno, parece haber una secuencia con una función equivalente en el extremo 3' del ARNr de la subunidad pequeña.

2) En eucariotes:

Una subunidad del eIF-3 se une al ARNr 18S y facilita la unión del ARNm.

El factor de iniciación 3 eucariótico (eIF-3) es una proteína oligomérica con 8 subunidades, y se une a la subunidad 40S del ribosoma.

Nygard y Westermann⁽⁷⁸⁾, utilizando dos reactivos distintos, entrecruzaron el ARNr 18S de hígado de rata con la subunidad de 66.000 Daltons del eIF-3, pero aún no se identifica con precisión el sitio de unión en el ARNr. Los autores proponen que tanto el eIF-3 como el eIF-2

tratar ribosomas de reticulocitos de conejo con detergentes, se libera un complejo del ARNr 18S con el ARNm y la subunidad de 66.000 Daltons del eIF-3. Este hallazgo permite suponer que esta subunidad del eIF-3 puede ayudar a estabilizar la unión por apareamiento de bases entre el ARNm y el ARNr 18S.

B) Factor de iniciación 2:

El factor de iniciación 2 eucariótico (eIF-2) interactúa con el ARNr 18S.

El eIF-2 forma un complejo ternario con el ARNt iniciador Met-ARNt_i y GTP, el cual se une con la subunidad ribosomal pequeña para formar el complejo cuaternario eIF-2·Met-ARNt_i·GTP·40S, al que después se une el ARNm (véase el capítulo I).

Aunque en esta unión parecen intervenir varias proteínas de la subunidad pequeña, Westermann *et al.* (??) han detectado por entrecruzamiento con tres reactivos distintos que las subunidades α y τ del eIF-2 interactúan con el ARNr 18S, a distancias de aproximadamente 4 Å. Estos datos permiten suponer que el ARNr 18S participa en la unión del eIF-2, aunque quizá no en forma tan importante como en la unión del eIF-3.

2. Unión del ARN mensajero a la subunidad pequeña del ribosoma.

Los ARNr intervienen en la unión del ARNm al ribosoma.

En los primeros pasos de la iniciación, el ARNm se une a la subunidad ribosomal pequeña. La posterior unión de la subunidad grande permite que comience la síntesis de la nueva proteína, siguiendo la secuencia dictada por el ARNm.

El ARNr chico interviene en forma muy importante en la unión del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma. Este papel ha sido perfectamente comprobado para los procariontes (con *Escherichia coli* como modelo), y se han hallado mecanismos análogos en eucariontes.

A) La interacción Shine-Dalgarno en procariontes:

El ARNm se une al ribosoma por apareamiento de bases con el ARNr chico.

En 1974, J.Shine y L. Dalgarno⁽⁷⁶⁾ hallaron que el extremo 3' del ARNr 16S de *Escherichia coli* contiene la secuencia

5'...ACCUCC...3'

la cual es complementaria a la secuencia

5'...GGAGGU...3',

que se halla completa o en parte en el extremo 5' de muchos ARNm antes del codón de iniciación, es decir, en el sitio inicial de unión de los ARNm al ribosoma.

Shine y Dalgarno propusieron que la complementariedad de bases entre el ARNm y el ARNr 16S permite que el primero se una al ribosoma en forma específica y en la posición correcta para comenzar a ser leído.

A partir de la formulación de esta hipótesis, se han hecho muchas investigaciones que han permitido llegar a entender la importancia de

este mecanismo en la iniciación de la síntesis de proteínas en procariontes y eucariontes.

(1) Pruebas de la existencia de la interacción Shine-Dalgarno:

La existencia y función in vivo de la interacción Shine-Dalgarno se ha comprobado plenamente.

En su artículo original, Shine y Dalgarno mencionaron varios hechos experimentales que apoyan su hipótesis. El principal (y el que les sugirió el mecanismo en primer lugar) es la complementariedad entre las secuencias del ARNr 16S y la de varios ARNm de bacteriófagos de *Escherichia coli* cuyas secuencias se conocían. Otros apoyos son los siguientes:

- La kasugamicina, un antibiótico que impide la iniciación, se une al extremo 3' del ARNr 16S.
- La colicina E3, una toxina bacteriana, impide la síntesis de proteínas al cortar los últimos 50 nucleótidos del extremo 3' del ARNr 16S, lo que inactiva al ribosoma.
- En algunos modelos de la estructura secundaria del ARNr 16S, los últimos 13 nucleótidos del extremo 3' están libres para aparearse. En un modelo posterior, esta porción del ARNr 16S tiene dos estados alternativos: uno apareada intramolecularmente con un segmento complementario en el dominio central, y otro libre, en el que es capaz de aparearse con la secuencia Shine-Dalgarno del ARNm. En éste modelo se propone que el IF-3 modula la conformación del extremo 3' del ARNr 16S⁽⁷⁴⁾.

- * Se han observado cambios en la conformación del ARNr 16S durante la fase de iniciación, los cuales pueden corresponder a los que serían necesarios si el mecanismo Shine-Dalgarno fuera cierto.

Durante los años posteriores se ha confirmado la existencia del mecanismo propuesto por Shine y Dalgarno, y se han estudiado sus características.

La primera prueba directa de la existencia de la interacción Shine-Dalgarno en ribosomas *in vitro* fué publicada por Steitz y Jakes^(7*). Estas investigadoras lograron aislar el fragmento que es cortado por la colicina E1 del extremo 3' del ARNr 16S unido por apareamiento de bases a un fragmento del extremo 5' del ARNm del fago R17 (el cual tiene la secuencia Shine-Dalgarno totalmente complementaria a la del ARNr 16S). Los fragmentos apareados fueron aislados de complejos de iniciación con un tratamiento suave con SDS, que separaba las proteínas pero no afectaba el apareamiento de bases. También comprobaron que los fragmentos apareados sólo se encuentran en complejos de iniciación.

En otros estudios usando los oligonucleótidos 5'-GAGGAGGU₃^(8*), 5'-GAGGU₃^(9*) ó 5'-AAGGAGGT₃^(10*), que son complementarios a la secuencia Shine-Dalgarno en el ARNr 16S, se ha visto que existe una competencia entre el ARNm con secuencia Shine-Dalgarno y éstos oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se unen fuertemente y en forma estequiométrica (un oligonucleótido por complejo de iniciación). No se unen a subunidades 60S, e inhiben la síntesis de proteínas. Otros oligonucleótidos no-complementarios, usados como control, no exhiben ninguna de estas propiedades.

Una prueba sorprendentemente clara de la importancia de la interacción Shine-Dalgarno *in vivo* la proporcionan los experimentos de Hui y de Boer⁽³³⁾ quienes, utilizando técnicas de ADN recombinante en *Escherichia coli*, cambiaron las secuencias Shine-Dalgarno en el ARNr 16S y un ARNm, y obtuvieron una subpoblación de ribosomas especializados en la traducción del mensajero mutado. Hicieron dos series de experimentos en los que cambiaron las secuencias Shine-Dalgarno en el ARNr 16S y en el ARNm de la hormona del crecimiento humana (clonada) por otras dos parejas de secuencias complementarias. Con estos experimentos comprobaron en forma inequívoca que:

- a) la interacción Shine-Dalgarno participa decisivamente en la unión y el reconocimiento del ARNm por el ARNr 16S en la formación del complejo de iniciación, pues una población de ribosomas especializados traduce preferentemente el ARNm con la secuencia Shine-Dalgarno complementaria correspondiente; y que
- b) cualquier secuencia en el ARNr 16S será capaz de reconocer ARNm con la secuencia complementaria en forma análoga a la secuencia Shine-Dalgarno original.

2) Importancia de la interacción ARNr-ARNm:

La unión ARNm-ARNr 16S no requiere de otras moléculas.

En la unión del ARNm al ARNr 16S no participan proteínas ribosomales, según lo indican los estudios de Van Duin *et al.*⁽³⁴⁾ Utilizando técnicas de diálisis al equilibrio y dicroísmo circular, determinaron la constante de asociación de un oligonucleótido complementario a la secuencia Shine-Dalgarno del ARNr 16S con a) el ARNr 16S en la sub-

unidad 30S intacta, y b) el fragmento del extremo 3' aislado. Hallaron que las constantes son iguales, lo que indica que la unión no es estabilizada por proteínas ribosomales. Según estos autores, el papel de una proteína ribosomal que ha sido implicada en la unión del ARNm puede ser el facilitar que el extremo de ARNr se halle libre para interactuar con el ARNm. Este papel también le ha sido asignado al IF-3.

Sin embargo, datos de Beckendorf *et al.*⁽²²⁾ indican que la unión del ARNm con la subunidad 30S parece ser distinta en algunos aspectos de la unión de un oligonucleótido complementario al extremo 3' del ARNr, que es únicamente por apareamiento de bases. Estas diferencias se manifiestan en la distinta inhibición de la unión de oligonucleótidos por la edeina, el ácido aurintricarboxílico y anticuerpos contra la proteína S1, implicada en el sitio de unión al ARNm. Además, un oligonucleótido unido a la subunidad 30S puede ser intercambiado por otro, lo que indica que hay un equilibrio de unión-disociación. Esto no ocurre con el ARNm.

La importancia del reconocimiento de las secuencias Shine-Dalgarno es destacada por el hecho de que puede dirigir la unión del ARNm a la subunidad 30S en ausencia de reconocimiento codón-anticodón, es decir, sin necesidad del ARNt. Esto ha sido comprobado por Van Duin *et al.*⁽²³⁾ al formar complejos ARNm-30S en ausencia de fMet-ARNt₂ (ARNt iniciador de *Escherichia coli*). Estos complejos se forman eficientemente y son capaces de iniciar la síntesis de proteínas al añadir el fMet-ARNt₂ sin que haya en ningún momento una disociación del ARNm y la subunidad ribosomal.

3) Regulación de la iniciación por unión del ARNm:

La interacción Shine-Dalgarno interviene en la regulación de la iniciación de la traducción.

El papel de la interacción Shine-Dalgarno parece ser principalmente regulatorio. El reconocimiento de la secuencia guía (*leader*) 5' del ARNm asegura por un lado que la lectura no se inicie en un codón AUG posterior al primero, es decir, que la iniciación sea en el lugar correcto. Aún cuando haya codones de iniciación en el interior de un gen, éstos no serán normalmente interpretados como tales, pues carecen de la secuencia Shine-Dalgarno en su región 5' (62).

Por otro lado, la mayor o menor complementaridad entre las secuencias Shine-Dalgarno del ARNm y el ARNr determina que un ARNm sea traducido con mayor o menor eficiencia, como comprobaron Jacob *et al.* (63) Utilizaron el gen clonado del ARNr 16S, al cual le cambiaron la base 1538, en la secuencia Shine-Dalgarno, de C a U utilizando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. El ARNr mutado, al incorporarse a ribosomas en las células, alteró la expresión de un gran número de proteínas. Los resultados fueron especialmente claros, pues se halló que en casos en que la mutación proporciona la posibilidad de aparear una base más con el ARNm, la expresión de la proteína aumenta; si se puede aparear una base menos, la expresión disminuye; y si el número de bases que pueden aparearse no cambia, la expresión no es alterada.

Es probable que la mayor eficiencia de traducción se deba a una mayor facilidad de formar el complejo de iniciación, aunque también puede intervenir algún otro mecanismo, como una menor frecuencia de terminación prematura.

La secuencia Shine-Dalgarno parece tener dos conformaciones alternativas, y el cambio de una a la otra podría intervenir en la regu-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

lación de la traducción. Backendorf *et al.*⁽²⁷⁾ han estudiado la unión del oligonucleótido

d(AAGGAGET),

complementario a la secuencia Shine-Dalgarno, al ARNr 16S aislado y a subunidades 30S de *Escherichia coli*. Hallaron que el ARNr aislado no era capaz de aparearse con el oligonucleótido, a menos que de se desnaturalizara parcialmente por calor. Esto indica que la secuencia Shine-Dalgarno puede aparearse intramolecularmente, lo que impide su unión con el ARNm. En subunidades 30S, el oligonucleótido no puede aparearse con el ARNr 16S a menos de que esté presente la proteína S21. Los autores plantean la posibilidad de que la secuencia Shine-Dalgarno cambie su conformación, apareándose intramolecularmente, luego de que ha terminado la fase de iniciación. Esto evitaría que siguiera apareada con el ARNm, lo que podría interferir con su avance. La proteína S21, que tiene propiedades de desestabilización de hélices, puede servir para modular ese cambio conformacional. El apareamiento intramolecular de la secuencia Shine-Dalgarno no parece ser con secuencias del ARNr 16S cercanas al extremo 3'.

4) Otros factores que intervienen:

La interacción Shine-Dalgarno no es la única responsable de la unión del ARNm en el complejo de iniciación.

A pesar de la importancia de la interacción Shine-Dalgarno para la iniciación de la traducción, se ha comprobado que aún ARNm que no tienen ninguna complementaridad con el ARNr 16S pueden formar complejos de iniciación y ser traducidos. Taniguchi y Weissmann⁽²⁸⁾ sugieren que probablemente estos ARNm pueden unirse solamente con la ayuda de la in-

teracción codón-anticodón. Por otro lado, Ekhardt y Lührmann⁽⁶¹⁾ hallaron que los oligonucleótidos complementarios a la secuencia Shine-Dalgarno no inhiben la unión de los ARNm no-complementarios.

Zagorska *et al.*⁽⁶²⁾ hicieron algunos experimentos que muestran que los 160 nucleótidos del extremo 3' del ARNr 16S no son indispensables para la formación de complejos de iniciación ni para la síntesis de proteínas dirigida por el mensajero sintético poli-AUE, el cual no tiene secuencia Shine-Dalgarno.

Por tanto, parece ser que la unión del ARNm puede ser mediada por cualquiera de los dos mecanismos (Shine-Dalgarno y apareamiento codón-anticodón), y que cuando alguno de ellos es débil o está ausente, el otro basta para permitir la iniciación.

5) Otros modelos:

Existen otras alternativas posibles para el mecanismo de la iniciación.

Otros hechos que no se ajustan bien al mecanismo de Shine-Dalgarno, como el que mensajeros con poca homología Shine-Dalgarno sean traducidos con mayor eficiencia que otros con mayor homología, han permitido la formulación de hipótesis alternativas.

Un ejemplo es la de Bahramian⁽⁶³⁾, quien halló que en muchos ARNm puede formarse una estructura de horquilla entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de iniciación. Hay secuencias capaces de aparearse con el extremo 3' del ARNr 16S en la base de la horquilla (parte de la secuencia Shine-Dalgarno) y también en la parte no-apareada del bucle de la horquilla. *Coin* base en esto, Bahramian propone que es dicha horquilla la que interactúa con el ARNr 16S en la iniciación de la traducción. Algunos ARNm con una horquilla de gran tamaño y poca conser-

vación de la secuencia Shine-Dalgarno se traducen con mayor eficiencia que otros con mayor número de bases Shine-Dalgarno y una horquilla muy pequeña, lo que apoya su propuesta. También cita evidencia de que la formación de dicha horquilla puede controlar el sitio de iniciación. Los codones AUG previos al de iniciación quedarían englobados en el tallo de la horquilla, lo que explica algunos casos en los que la iniciación no se lleva a cabo en el primer codón AUG.

Otros autores proponen interacciones entre el ARNm y el ARNr 16S totalmente independientes de la Shine-Dalgarno.

B) La interacción Shine-Dalgarno en eucariontes:

En eucariontes existe una interacción equivalente a la Shine-Dalgarno procariontica, aunque las secuencias son distintas.

Debido a la importancia de la interacción Shine-Dalgarno en los procariontes, la búsqueda de un mecanismo similar en los eucariontes ha sido de gran interés.

Actualmente se tiene evidencia que indica que efectivamente existe una interacción entre el ARNr chico y el ARNm en los procariontes, que denominaré "Shine-Dalgarno" por analogía con la procariontica.

Primeramente se buscaron las mismas secuencias Shine-Dalgarno de los procariontes en los ARNm eucarióticos, pero no se hallaron con suficiente frecuencia como para suponer que la misma secuencia sea utilizada por los eucariontes⁽⁹⁹⁾.

La primera indicación clara de la presencia en eucariontes de una interacción equivalente a la Shine-Dalgarno de los procariontes fue dada por Nakashima et al.⁽¹⁰⁰⁾, quienes entrecruzaron el extremo 3' del ARNr 18S de germen de trigo y de reticulocitos de conejo con los ARNm

de varios virus eucarióticos, por medio de *psoralenos* (moléculas bifuncionales que se intercalan e los ácidos nucleicos y entrecruzan bases pirimidicas al ser expuestas a luz ultravioleta).

Yokoe *et al.* (92), con el mismo sistema, hallaron que la interacción del ARNm con el ARNr 18S no parece requerir de una complementariedad total, pues tanto los ARNm naturales como los polímeros artificiales poli-U y poli-(A,U) con capucha pueden unirse a subunidades 40S para formar complejos de iniciación o a ribosomas 80S y ser entrecruzados con el ARNr 18S.

En levadura, Cigan y Donahue (93) hallaron que los ARNm del 40% de 131 genes examinados tienen secuencias capaces de aparearse con el extremo 3' del ARNr 18S, aunque las secuencias complementarias son distintas de la secuencia Shine-Dalgarno procariótica.

Una manera indirecta de buscar apoyo para la hipótesis de la presencia en eucariotes de una interacción equivalente a la Shine-Dalgarno de procariontes es comparar las secuencias de ARNm eucarióticos con la del extremo 3' del ARNr 18S y tratar de hallar homologías (de hecho, así surgió originalmente la idea de Shine y Dalgarno). Maroun *et al.* (94) examinaron aproximadamente 200 secuencias y hallaron que por lo menos el 25% de ellas tiene complementariedad con dos secuencias en el ARNr 18S. La fuerza de la unión de estos ARNm con el ARNr es comparable a la de la interacción Shine-Dalgarno procariótica.

En estudios preliminares no se ha hallado evidencia de una interacción entre el ARNm y el ARNr 13S de mitocondria de hamster, secuenciado por Baer y Dubin (95). Este ARNr mitocondrial no tiene la secuencia Shine-Dalgarno de procariontes, aunque la estructura secundaria sí está conservada. Sin embargo, no puede afirmarse que no exista una interacción mientras no haya pruebas directas, por ejemplo de entrecruza-

miento. Es posible que existan secuencias distintas de la Shine-Dalgarno de procariontes que sean complementarias entre ambos ARN, como ocurre en el citoplasma eucariótico.

1) Intervención de otros factores en la unión del ARNm:

Una proteína interviene en la interacción Shine-Dalgarno de los eucariontes.

Erni y Staehelin⁽²⁶⁾ aislaron complejos no-entrecruzados de ARNr 18S y ARNm de globina en reticulocitos de conejo, que parecen estar unidos por apareamiento de bases. Comprobaron que ésta unión sólo se efectúa en las condiciones necesarias para la iniciación de la traducción y desaparece al unirse la subunidad 60S. Es probable que, como mencionan, las proteínas requeridas para la formación del complejo de iniciación establezcan la unión ARNm-ARNr 18S.

En apoyo a esta idea, Thomas y Arnstein⁽²⁷⁾ reportaron que en la iniciación de la síntesis de la globina en reticulocitos de conejo, el ARNm forma un complejo con el ARNr 18S y una proteína con peso molecular de 66,000. Esta proteína es liberada al unirse la subunidad 60S, lo que explica la observación de Erni y Staehelin.

2) Función regulatoria:

La interacción Shine-Dalgarno eucariótica parece intervenir en la regulación de la traducción.

La existencia de una interacción similar a la que hay en los procariontes sugiere que la función de tal interacción debe ser también similar, i.e. regulatoria. Existen indicios de tal función.

Motojima y Oka⁽²⁷⁾ hallaron que un ARNm que se traduce con altísima eficiencia en el ratón (el de la proteína Ácida del suero de la

leche, con una eficiencia de traducción 50 veces mayor que el ARNm de la caseína) tiene una región de gran complementaridad con el ARNr 18S. Es probable que el mecanismo sea similar al de los procariontes, en los que los mensajeros con mayor complementaridad con el ARNr 16S son traducidos con mayor eficiencia.

3) Otros mecanismos en la unión del ARNm.

Los mecanismos de escudriñamiento y de Shine-Dalgarno colaboran en la iniciación eucariótica.

Como se puede ver, la evidencia de una interacción similar a la Shine-Dalgarno de los procariontes es mucho menos concluyente en los eucariontes. Existen modelos alternativos para la unión del ARNm a la subunidad 40S.

Como una de las características que distinguen a los ARNm eucarióticos de los procariontes es la presencia en su extremo 5' de la "capucha" (*cap*) de m⁷G^{ppp}N^(m). Shatkin⁽²²⁾ postuló el modelo de escudriñamiento (*scanning*) para la iniciación. Este modelo propone que la estructura de la capucha es la que permite que el ARNm sea reconocido por la subunidad 40S, y que una vez que se ha formado el complejo eIF-2-Met-ARnt₁-GTP-40S-ARNm, la subunidad se desplaza en la dirección 3' sobre el ARNm hasta llegar al codón de iniciación. En este punto se une la subunidad 60S y se inicia la traducción.

El modelo de escudriñamiento ha recibido apoyo experimental, pero debido a que también hay evidencia que apoya un mecanismo del tipo Shine-Dalgarno (véase más adelante), no es posible aceptarlo incondicionalmente.

Es incluso posible proponer otros modelos que expliquen mejor algunas observaciones: Sargan et al.⁽²³⁾ proponen que la interacción en-

tre el ARNm y el ARNr 18S se lleva a cabo mediante una estructura de horquilla en el ARN mensajero. Esta estructura es común en mensajeros eucarióticos, y las dos secuencias que en la estructura secundaria quedan contiguas en su base presentan complementaridad con el ARNr 18S. De este modo, el apareamiento de bases entre estas secuencias en el ARNm y el ARNr estabilizaría la horquilla, la cual a su vez favorece la unión del ARNm con la subunidad 40S para la formación del complejo de iniciación. Algunos ARNm que tienen horquillas pequeñas son traducidos menos eficientemente que otros con horquillas grandes. Es interesante comparar ésta propuesta con la hecha por Bahramian⁽⁹⁹⁾ para procariontes.

Tanto los datos de Yokoe⁽⁹²⁾ (ARNm sintéticos sin complementaridad pueden formar complejos de iniciación) como el hecho de que quizá hasta un 75% de los mensajeros no tenga secuencias complementarias al ARNr 18S⁽⁹⁴⁾ sugieren que la interacción entre el ARNm y el ARNr 18S, aunque existe, no es indispensable ni la única necesaria para colocar al ARNm en la posición correcta en la subunidad pequeña para la iniciación de la traducción. En levadura, aunque un porcentaje importante de ARNm puede aparearse con el extremo 3' del ARNr 18S (véase arriba), también se halla que el 95% de los ARNm comienzan a ser traducidos en el primer codón AUG⁽⁹²⁾, como lo requiere el modelo de escudriñamiento para el posicionamiento de la subunidad pequeña en el sitio de iniciación (aunque este hecho también puede ser explicado con el modelo de Shine-Dalgarno).

Estos hechos, aunados a otras evidencias que apoyan al modelo de escudriñamiento, permiten suponer que ambas posibilidades son aspectos parciales del mecanismo real: quizá tanto el apareamiento de secuencias como el reconocimiento de la capucha ayudan a la unión del ARNm.

Erni y Staehelin⁽²²⁾ proponen una hipótesis que reconcilia satisfactoriamente los diversos modelos: el ARNm se une a la subunidad 40S por reconocimiento de la capucha, y luego la subunidad se desplaza hasta llegar a una posición 5' al codón de iniciación. En este punto, el apareamiento entre las secuencias complementarias del mensajero y el ARN ribosomal, equivalente al mecanismo Shine-Dalgarno de los procariontes, (o el reconocimiento de la horquilla en el mecanismo de Sargan et al.⁽²³⁾) hace que la subunidad se detenga. La unión posterior de la subunidad 60S desestabiliza la unión ARNr-ARNm y permita que el ribosoma se desplace al avanzar la síntesis de proteínas.

4) Antigüedad evolutiva de la intervención del ARNr en la unión del ARNm:

El posible mecanismo de reconocimiento del ARNm en el ribosoma primitivo.

Al comparar este mecanismo con el de los procariontes, se observa que en ambos grupos existen dos interacciones que permiten que la subunidad pequeña quede en la posición correcta sobre el ARNm en el complejo de iniciación: el apareamiento de bases entre el ARNm y el ARNr chico (en los dos grupos); y la unión codón-anticodón en los procariontes o el reconocimiento de la capucha y el posterior desplazamiento de la subunidad 40S hasta la posición anterior al codón de iniciación en los eucariontes. Es probable que durante su evolución cada grupo haya desarrollado variaciones de un mecanismo primitivo.

Como en los dos grupos la parte del mecanismo que se ha conservado es aquella en que participa el ARNr, podemos suponer que es esta parte la que refleja el mecanismo primitivo de la iniciación de la síntesis de proteínas.

En mitocondrias, como mencioné en la página 83, la secuencia Shine-Dalgarno procariótica no se ha conservado, pero la estructura secundaria sí⁽⁹⁹⁾. La hipótesis presentada aquí de la evolución de un único mecanismo primitivo de unión del ARNm por apareamiento con el ARNr se vería apoyada si se comprueba que también se ha conservado este mecanismo de unión del ARNm en los cloroplastos y mitocondrias (en concordancia con la teoría del origen endosimbiótico de estos organelos). Oakes et al.⁽¹⁰⁰⁾, basándose en datos filogénicos, han sugerido que el ribosoma primitivo debe haber tenido la interacción Shine-Dalgarno, además de usar los dos factores de prolongación, tener la transferasa de peptidilo en la protuberancia central de la subunidad grande y una arquitectura similar del ARNr.

C) Otras interacciones del ARNm con los ARNr.

Otras interacciones por apareamiento de bases entre el ARNm y los ARNr pueden tener importancia en la iniciación.

Aparte de la interacción Shine-Dalgarno, es posible que existan otras secuencias del ARNr 16S que tengan contacto con el ARNm durante la iniciación de la traducción, como lo indican los hallazgos de Petersen et al.⁽¹⁰⁰⁾. Al analizar 251 genes de *Escherichia coli*, hallaron que el 98% de ellos tienen al menos tres nucleótidos consecutivos complementarios a las bases 1 a 18 en el extremo 5' del ARNr 16S, en las posiciones +4 a +21 después del codón de iniciación. 67% de los ARNm tienen al menos 4 bases complementarias. Los autores proponen que la región posterior (5') al codón de iniciación del ARNm interactúa con el extremo 5' del ARNr 16S, lo que ayuda a colocar el ARNm en la posición correcta en el ribosoma. Algunos datos que apoyan esta propuesta son:

- 12 de los 18 nucleótidos del extremo 5' del ARNr 16S se hallan conservados en las bacterias
- Los extremos 5' y 3' del ARNr 16S se hallan en posiciones relativamente cercanas en la estructura secundaria, lo cual es consistente con la necesidad de que ambos extremos interactúen con la región inicial del ARNm.

También ha habido sugerencias de que algunos ARNm específicos pueden tener secuencias complementarias a otros ARNr. Jain et al.⁽²⁾ hallaron evidencia de una complementariedad entre el extremo 3' del ARNr 28S humano y el 5' del ARNm de la subunidad H de la ferritina, que puede tener implicaciones para la regulación de la expresión de esta proteína. El ARNm puede ser hibridado al ARNr 28S humano, pero no con el de rata ni el de conejo. La región complementaria consiste en repeticiones de secuencias cortas ricas en G y C. La gran eficiencia de la traducción y la estabilidad de este ARNm pueden ser explicadas por tal complementariedad, como especulan los autores, pues al aparearse con el ARNr 28S el ARNm tendría una mayor constante de asociación al ribosoma. Si es éste el caso, es posible que las dos secuencias estén evolucionando paralelamente debido a la ventaja que conceden al organismo.

Es también posible que el ARNm interactúe con el ARNr 5S procarionótico, según lo sugieren algunos resultados de Meier et al.⁽³⁷⁾ Estos autores utilizaron mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y por disulfito para introducir cambios específicos en la secuencia del ARNr 5S de *Escherichia coli*. Utilizando ribosomas reconstituidos con el ARNr 5S mutado, hallaron que la capacidad de unión de los ribosomas con un ARNm artificial (poli-U) se veía disminuida en un 50%. Este efecto se observó al ser mutadas (cambio de G a A) las bases G₄₁ y G₆₆.

3. Unión de las subunidades ribosomales.

El ARNr 16S también interviene en la unión de las subunidades ribosomales grande y pequeña para formar el ribosoma funcional.

Existen abundantes indicaciones de que los ARNr intervienen en la unión de las subunidades grande y pequeña del ribosoma durante la fase de iniciación de la traducción. La evidencia se ha obtenido en *Escherichia coli* por medios muy variados.

Santer y Shane⁽¹⁰²⁾ hallaron que la sensibilidad del ARNr 16S a la ribonucleasa (RNasa) T1 era distinta en subunidades 30S aisladas y en ribosomas 70S. Específicamente dos áreas son protegidas por la unión de las subunidades; una en el dominio central del ARNr 16S y otra cerca de su extremo 3'. Además un sitio de 13 a 15 bases de largo que no está expuesto en la subunidad aislada se vuelve sensible al corte por la RNasa al formarse el ribosoma 70S.

El grupo de Noller ha utilizado experimentos de protección de los ARNr contra la modificación química por cetoxal para estudiar varias de sus funciones. Este grupo ya había hallado sitios protegidos en el ARNr 16S por la unión de las subunidades, en el dominio central y en el extremo 3' (en concordancia con los datos de Santer y Shane citados arriba). En 1979 hallaron que en el ARNr 23S se protegen fuertemente dos secuencias por la unión de las subunidades, aunque no reportan su localización⁽¹⁰³⁾. Una de ellas,

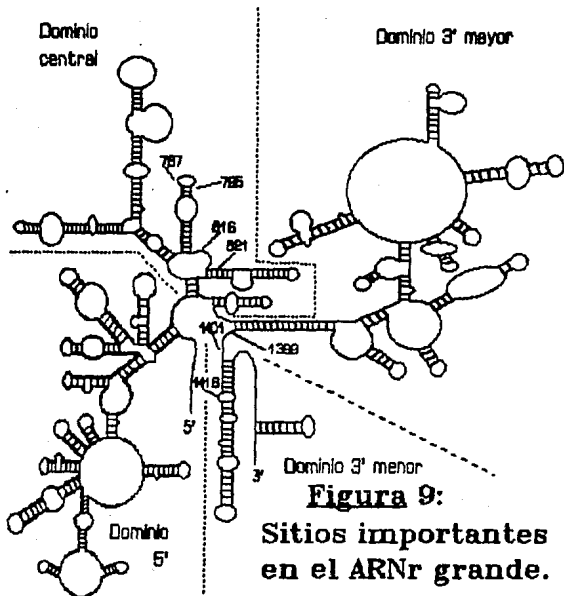
...GACAUCAC...

es complementaria a las bases 816 a 821 del ARNr 16S (véase la figura 9), las cuales también son protegidas. Otras secuencias son protegidas

en menor medida; entre ellas

... GAAAGCAUCUAAG...

la cual es complementaria a las bases 787 a 792 del ARNr 16S. Estos datos sugieren que podría haber apareamiento intermolecular entre estas secuencias al unirse las subunidades ribosomales.



En un estudio posterior, Brow y Noller⁽¹⁹⁴⁾ localizaron en el ARNr 16S los sitios protegidos del cetoxal por la unión de las subunidades. Estos se hallan principalmente en 3 dominios de la estructura

secundaria: cinco sitios no-contiguos en el dominio central; dos en el dominio 3' mayor, y dos sitios en el dominio 3' menor que se hallan relativamente cerca en la estructura secundaria.

A pesar de las secuencias complementarias halladas, los autores señalan que no es probable que la complementariedad de secuencias baste para la unión de las subunidades; proponen más bien que éstas sufren cambios conformacionales durante la unión. Esto se manifiesta en la protección parcial o total o la desprotección de varios sitios en los ARNr que no son complementarios con los de la subunidad opuesta.

Burma y colaboradores (97) hallaron que la conformación del ARNr 23S es diferente en los ribosomas bien acoplados y los mal acoplados en *Escherichia coli*. Como la diferencia entre ambos tipos de ribosomas es la distinta estabilidad de la unión de sus subunidades, esto implica al ARNr 23S en dicha unión.

En un trabajo previo, Burma et al. (105) comprobaron que los ARNr 16S y 23S de *Escherichia coli* aislados son capaces de formar un complejo bimolecular (con estequiometría 1 a 1) en condiciones de alta concentración de sales como las que se usan para la reconstitución de subunidades ribosomales. Su hallazgo original fué que la sensibilidad de los ARNr disminuía al mezclarlos en dichas condiciones, y posteriormente lo comprobaron mediante experimentos de centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y estudios de dispersión de luz.

Las condiciones en las que se logró esta asociación son 400mM de sales y 20mM de Mg^{2+} (como comparación, la asociación de subunidades ribosomales intactas se logra en 300mM de sales y 6mM de Mg^{2+}). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se usa una concentración baja de sales (60 mM) con la presencia adicional de etanol 1M. Otros autores (citados por ellos) han reportado que en tales condiciones, los ARNr

aislados adquieren conformaciones tridimensionales compactas, similares a las de las subunidades ribosomales completas. Esta evidencia indica fuertemente que la unión entre los ARNr puede jugar un papel de gran importancia en la unión de las subunidades *in vivo*.

El papel que juega un segmento definido del ARNr 16S, que comprende las bases 787 a 795, en la unión de las subunidades fué investigado por Tapprich y Hill⁽¹⁰⁶⁾ utilizando el oligonucleótido 6TATCTAAT (complementario a las bases 787-795). Dentro de éste segmento se halla la G₇₉₁, hallada por el grupo de Noller entre las bases protegidas contra la modificación por cetoxal. Tapprich y Hill hallaron que el oligonucleótido se une específicamente a la subunidad 30S; por digestión con RNasa H y secuenciación comprobaron que el sitio de unión es el segmento 787-795. Además, observaron que, en subunidades 30S con el oligonucleótido unido, la unión a la subunidad 50S se ve dificultada. Todos estos hechos indican que tal secuencia (quó se halla en el dominio central del ARNr 16S, formando una horquilla --véase la figura 9) participa de manera importante en la formación del ribosoma 70S. Parece hallarse expuesta en la plataforma de la subunidad chica.

Meier *et al.*⁽³⁷⁾, utilizando ARNr 16S modificado con bisulfito o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para reconstituir ribosomas, hallaron que la unión de las subunidades es afectada cuando se modifica la base G₁₄₁₆ (cambiándola por U). Esta base se halla en el dominio 3' menor, cerca de las dos bases implicadas por el estudio de Brow y Noller.

Abdurashidova *et al.*⁽⁶⁹⁾ entrecruzaron proteínas de una subunidad ribosomal con el ARNr de la subunidad opuesta en ribosomas utilizando luz ultravioleta. Hallaron que las proteínas S6, S9/S11 y S15 se entrecruzan con el ARNr de la subunidad grande tanto en ribosomas pre- como

post-translocados. Las proteínas L1 y L19 se entrecruzan con el ARNr de la subunidad chica. De este modo se ve que los ARNr intervienen en la unión de las subunidades en forma indirecta, uniéndose a proteínas de la subunidad opuesta.

Rottmann *et al.* (197) han logrado identificar 3 bases en el ARNr 16S que al ser modificadas por mutagénesis dirigida evitan la unión de las subunidades ribosomales. Estas bases son C₁₃₉₉, G₁₄₀₁ y G₁₄₁₆. Los ribosomas en los que C₁₃₉₉ y G₁₄₀₁ son modificadas no son funcionales, por lo que las mutaciones resultan letales (lo cual concuerda con la importancia de la C₁₄₀₀ en otras funciones ribosomales durante la prolongación; véase el capítulo IV), pero se logró observar su efecto en la asociación utilizando la expresión condicional de la mutación. La mutación de la G₁₄₁₆ no inactiva a los ribosomas, pero disminuye la capacidad de asociación de las subunidades. Todas estas bases se hallan en el dominio 3' menor del ARNr 16S, cerca de las otras bases implicadas en la unión de las subunidades por Brow y Noller y por Meier *et al.* (véase arriba y figura)

Selivanova *et al.* (198) han estudiado la función del complejo del ARNr 5S-proteínas en la unión de las subunidades, pero aparentemente no intervienen en este proceso.

CAPITULO IV

FUNCIONES DE LOS ARNr EN LA FASE DE PROLONGACION DE LA CADENA POLIPEPTIDICA.

Los ARNr participan en varias etapas de la fase de prolongación: en la unión de los factores de prolongación, la unión de los ARNt en los sitios A y P. y en la formación del enlace peptídico y en la translocación del peptidil-ARNt recién formado del sitio A al P. Esto sucede tanto en ribosomas procarionóticos como eucarióticos. En general los ARNr no parecen ser los responsables únicos de estas funciones, ya que en todas ellas también intervienen las proteínas ribosomales, pero su papel parece ser de gran importancia, especialmente en la actividad de transferasa de peptidilo (peptidil transferasa).

Estos hechos se han comprobado principalmente por experimentos de marcaje por afinidad y de reconstitución, y por comparación de secuencias conservadas evolutivamente en los ARNr.

1. Unión de factores de prolongación:

El ARNr grande de procarionotes y eucarionotes participa en el sitio de unión de los factores de prolongación.

Tanto en eucarionotes como en procarionotes existen dos factores de prolongación. En procarionotes se conocen como EF-Tu y EF-G, y en eucarionotes como eEF-Tu (o EF-1) y eEF-G (o EF-2).

Los ARNr parecen formar parte de los sitios de unión de los factores de prolongación al ribosoma en eucarionotes y procarionotes.

En procariontes, Girshovich et al.⁽¹⁰⁹⁾ encontraron que el EF-G puede ser entrecruzado por luz ultravioleta con el ARNr 23S en preparaciones de ARNr total. Esto indica que existe una afinidad del factor por el ARNr 23S en forma específica, independientemente de las proteínas ribosomales (aunque algunas de éstas, como la L7/L12 estimulan la unión).

Bochkareva y Girshovich⁽¹¹⁰⁾ localizaron después el sitio del entrecruzamiento con experimentos en los que utilizaron al EF-G para proteger al ARNr 23S de la acción de la nucleasa S1 de *Salmonella typhimurium*. Comprobaron que el EF-G queda unido con el ARNr 23S aproximadamente a 1000 bases del extremo 3' (el ARNr 23S mide 2904 bases). Como el sitio de unión del EF-G se halla en la base del "tallo" de la subunidad grande formado por dos moléculas de la proteína L7 L12 (tallo L7/L12), quizá la función de ésta es exponer al ARNr 23S para que pueda unirse al factor de prolongación.

Utilizando un agente entrecruzante, Sköld⁽¹¹¹⁾ localizó con mayor precisión un sitio en el ARNr 23S que es unido al EF-G en subunidades 60S. Después de aislar y secuenciar los fragmentos entrecruzados, determinó que el sitio de unión se halla entre la G₁₀₅₅ y la G₁₀₇₁.

Moazed et al.⁽¹¹²⁾ hallaron que tanto el EF-G como el EF-Tu protegen al ARNr 23S de la modificación con cetoxal y sulfato de dimetilo (dos agentes que modifican al ARN). Los sitios que son protegidos por el EF-G son las bases G₂₅₅₅, A₂₅₆₀ y G₂₆₆₁ en el dominio VI de la estructura secundaria del ARNr 23S (véase la figura 7).. y a las A₁₀₆₇ y A₁₀₆₈ en el dominio II (estas últimas concuerdan con los estudios de Sköld). El EF-Tu protege las bases G₂₅₅₅ y G₂₆₆₁ en el dominio VI.

Los estudios de resistencia a antibióticos también proporcionan pruebas de la unión del EF-G al ARNr 23S. El tetrastreptón es un an-

tibiótico que se une fuertemente a la subunidad 50s e impide la translocación al impedir la unión del complejo EF-G-GTP. No impide directamente la formación del enlace peptídico⁽¹¹³⁾.

Thompson *et al.*⁽¹¹⁴⁾ estudiaron el mecanismo de resistencia al ticoestreptón en el organismo que lo produce, *Streptomyces azureus*. La resistencia se debe a la acción de una metilasa, que metila una ribosa de adenosina, produciendo 2'-O-metiladenosina. Los autores localizaron el sitio de metilación por dicha enzima en el ARNr 23S de *Escherichia coli*. La ribosa metilada es la de la A₁₀₆₇, en el dominio II. Este es el sitio de unión de la proteína L11. La proteína se une a ARNr 23S metilado o no-metilado, pero el antibiótico sólo se une al ARNr 23S no-metilado.

En eucariotes, Slobin⁽¹¹⁵⁾ probó, usando unión a filtros de nitrocelulosa, que el factor Tu (eEF-Tu) se une a ARN, y que forma complejos estables junto con el ARNr 28S, GTP y aminoacil-ARNt. Nygard y Nilsson⁽¹¹⁶⁾, utilizando un agente entrecruzante, probaron que el sitio de unión del eEF-G a ribosomas de hígado de rata incluye a parte del ARNr 5S y de la proteína L5, aunque también participan varias otras proteínas tanto de la subunidad grande como de la chica⁽¹¹⁷⁾.

La idea de que los ARNr formen parte de la estructura de los sitios de unión de los factores de prolongación es congruente con los hechos siguientes:

- a) la inactivación de ribosomas eucarióticos por la acción de las toxinas α -sarcina y ricina (véase más adelante), las cuales cortan el ARNr grande en un bucle que incluye a la base 2660 y se halla conservado en procariontes y eucariotes⁽¹¹⁸⁾.

- b) la acción del antibiótico tiostreptón, el cual impide la unión del EF-G al ribosoma al unirse al bucle que incluye a la base 1067 en el dominio II: existen mutaciones de la A₁₀₆₇ que confieren resistencia al tiostreptón⁽¹¹⁴⁾ (véase arriba).

El hecho de que el ARNr grande forme parte de los sitios de unión a los dos factores de prolongación sugiere que ambos sitios pueden estar superpuestos, como menciona Nygard⁽¹¹⁷⁾, lo cual es apoyado por los datos de Moazed⁽¹¹²⁾ de que los dos factores se unen a las mismas bases del dominio VI del ARNr 23S. Esta superposición impediría que se uniera un factor al ribosoma si el otro ya se ha unido, lo que aseguraría el correcto funcionamiento del ciclo de prolongación.

Por otro lado, Siobin⁽¹¹⁸⁾ halló que el eEF-Tu tiene una actividad de GTPasa intrínseca, y que ésta aumenta por unión a ARNr 28S. Propone que esto es un mecanismo regulatorio que evita que el GTP unido al factor Tu sea hidrolizado hasta que éste se halla unido al ribosoma.

2. Unión de ARN de transferencia:

Los ARNr 23S, 16S y 5S participan en la unión de los ARNt.

Hay evidencias muy diversas de que los ARNr forman parte de los sitios de unión de los ARNt en ribosomas procarióticos y eucarióticos.

A) Unión del ARNt al ARNr chico:

Varios sitios del ARNr chico participan en la unión del ARNt en procariontes y eucariontes, aunque no en forma indispensable.

Los estudios más completos que se han hecho al respecto son los del grupo de James Ofengand. A lo largo de varios años, han demostrado que el ARNt puede ser entrecruzado con sitios específicos del ARNr 16S cuando se halla unido al sitio P⁽¹²⁰⁾ o al sitio A⁽¹²⁰⁾ de *Escherichia coli*.

Gracias a sus estudios, se sabe que ARNt unidos al sitio P pueden ser entrecruzados con el ARNr 16S por irradiación con luz ultravioleta, lo que implica que el ARNr 16S forma parte de este sitio. Prince et al.⁽¹²¹⁾ confirmaron estos resultados utilizando otros ARNt. El entrecruzamiento ocurre entre la base 5' del anticodón del ARNt (la base "bamboleante") y una base de la secuencia

...1323UACACACCG₁₄₀₁...

en el ARNr 16S⁽¹²²⁾. Estos datos fueron comprobados por entrecruzamiento, digestión parcial con ribonucleasas y secuenciación de los fragmentos entrecruzados⁽¹²³⁾. Esta secuencia se halla aproximadamente a 50 bases del extremo 3'⁽¹²⁴⁾ del ARNr. Se comprobó que se forma un dímero de ciclobutano entre pirimidinas, como los dímeros de timina que se forman al exponer ADN a luz ultravioleta⁽¹²⁴⁾.

La secuencia a la que se entrecruza el ARNt en el sitio P se halla conservada en el ARNr 16S de procariontes, en el ARNr 18S (o su equivalente) de eucariontes como levaduras, insectos y anfibios y en cloroplastos y mitocondrias y no es sitio de unión de proteínas ribosomales⁽¹²¹⁾, lo cual subraya la importancia funcional de la interacción ARNr 16S-ARNt. Experimentos de entrecruzamiento utilizando ARNt de

Escherichia coli unido al sitio P de ribosomas de levadura⁽¹²⁵⁾ resultaron en la unión del ARNt con el mismo nucleótido, formando un dímero de ciclobutano entre pirimidinas.

Ofengand interpreta la formación del dímero de pirimidina como evidencia de que hay un "apilamiento" (*stacking*) entre los anillos aromáticos de la base 5' del anticodón del ARNt y de una base del ARNr 16S, lo que probablemente contribuye -junto con la interacción codón-anticodón con el ARNm- a estabilizar al ARNt en el sitio P.

Posteriormente, Ofengand y otros colaboradores entrecruzaron ARNt modificados con un grupo entrecruzante en la base 5' del anticodón con el ARNr 16S en el sitio A del ribosoma⁽¹²⁶⁾. Digiriendo con ribonucleasas y aislando y secuenciando el fragmento de ARNr entrecruzado, hallaron que la unión era con una base de la secuencia

...1302GUACACACCG1401...

es decir, la misma a la que se entrecruza con el ARNt en el sitio p⁽¹²⁷⁾.

Estos hallazgos implican que los anticodones de los dos ARNt en los sitios P y A deben hallarse aproximadamente a 23A uno del otro, ya que ambos pueden entrecruzarse con el mismo fragmento del ARNr 16S (la longitud del grupo entrecruzante del ARNt unido al sitio A es de 23A). Por otro lado, el hecho de que un mismo fragmento del ARNr 16S participe en ambos sitios de unión de ARNt y además se halle conservado evolutivamente parece comprobar que es funcionalmente importante.

La importancia de la C₁₄₀₀ ARNr 16S en la unión del ARNt es destacada aún más por la comprobación de que la unión del ARNt al sitio P y el entrecruzamiento con esta base no requieren de la participación de la subunidad ribosomal 50S⁽¹²⁷⁾. Este hecho es de interés al compararlo con la evidencia de interacciones del ARNt con el ARNr 23S, que

evidentemente no son indispensables. Vale la pena mencionar que en estos últimos experimentos, Ofengand y su grupo han utilizado la metodología de "huellas digitales" moleculares (*molecular fingerprints*), utilizando la síntesis de ADN complementario al ARNr entrecruzado por medio de la enzima transcriptasa inversa. La síntesis es detenida con gran frecuencia en los nucleótidos modificados, lo que permite identificar las posiciones de éstos.

Thomas *et al.* (129) han hallado pruebas adicionales de la importancia de la C₁₄₀₀ y de las bases que la rodean utilizando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos o inducida por bisulfito, en *Escherichia coli*. Los cambios de la C₁₄₀₀ por U o de las C₁₄₀₀ y C₁₄₀₁ por dos A no afectan el crecimiento de las mutantes. La pérdida de la C₁₄₀₀, en cambio, es letal, al igual que los cambios de C por U en las posiciones 1395 ó 1407. Esto indica que varias bases en la región conservada evolutivamente de las bases 1390 a 1410 son indispensables para la función del ribosoma. Sorprendentemente, el cambio de la G₁₅₀₅ por cualquiera de los nucleótidos A, C o U suprime la letalidad de las mutantes con U₁₃₉₅, U₁₄₀₇ o con pérdida de la C₁₄₀₀. El significado de este hecho no es conocido, pues no hay evidencia de interacciones entre la región 1400 y la posición 1505.

Brow y Noller (13) han identificado guaninas en sitios específicos en los ARNr 16S y 23S de *Escherichia coli* que son protegidas contra la modificación por cetoxal en polisomas, muy probablemente por la unión de ARNt. Anteriormente, el mismo grupo había comprobado que la modificación con cetoxal del ARNr en subunidades 30S evita la unión de ARNt (129). En el ARNr 16S el principal nucleótido protegido es la G₂₅₀, que esté cerca del extremo 5' y que se halla conservada en procariontes, levaduras, *Xenopus*, cloroplastos de maíz y mitocondrias de

levadura y mamíferos. Aunque este nucleótido no se halla cerca de la zona 1400, con la que los estudios de Ofengand relacionan la unión de ARNt, en la estructura primaria ni secundaria es posible que ambas zonas se hallen cercanas en la estructura terciaria del ARNr 16S, o bien que interactúen con distintas porciones del ARNt.

En experimentos posteriores Moazed y Noller⁽¹³⁰⁾, utilizaron la misma técnica, también conocida como "extensión de cebadores" (*primer extension*), para identificar sitios en el ARNr 16S que son protegidos por el ARNt contra la modificación química por diversos reactivos. La unión de varios ARNt (de *Escherichia coli* o fragmentos de éste, y de levadura) en el sitio P se efectuó en presencia o ausencia de ARNm. Se halló protección en las áreas alrededor de los nucleótidos 530, 796 y 1400. Los patrones de protección son básicamente iguales con o sin ARNm y con los varios ARNt, incluyendo un caso en el que se usó únicamente el brazo del anticodón.

Los mismos autores⁽¹³⁰⁾ hallaron que la unión de la *edcina*, un antibiótico que impide la unión de ARNt al sitio P⁽¹³¹⁾, protege a las bases G₅₂₃, A₇₂₄, C₇₂₅ y G₂₂₆ de la modificación por cetoxal o sulfato de dimetilo. Estas posiciones parecen estar próximas entre sí en el ribosoma, y son protegidas parcialmente contra la modificación por la unión del ARNt.

La tetraciclina, que impide la unión del ARNt al sitio A, protege la base A₂₂₂. Como la base que normalmente se ha hallado asociada a este sitio es la C₁₄₀₀, es posible que ésta y la A₂₂₂ se hallen cercanas entre sí en el ribosoma.

Una prueba adicional, aunque indirecta, de la posible participación de este ARNr en la unión de ARNt la proporciona el hallazgo de Boehm⁽¹³²⁾ de que la ARNasa P tiene una estructura secundaria similar a

la del ARNr 16S. La ribonucleasa P es una enzima de *Escherichia coli* que participa en el procesamiento de los ARNt inmaduros. Su componente catalítico es una molécula de ARN de 377b llamada ARN M1. lo que la hace miembro del grupo de las llamadas ribozimas o enzimas de ARN. Boehm halló que el ARN M1 tiene una homología de entre 60 y 70% con el partes del ARNr 16S de *Escherichia coli*.

Basándose en dicha homología, construyó un modelo de la estructura secundaria del ARN M1 muy similar al del ARNr 16S. Este modelo concuerda mejor con datos de digestión con nucleasas y tiene mayor número de bases apareadas que otros anteriores. El que estas dos moléculas de ARN distintas tengan estructuras primaria y secundaria muy similares hace pensar que el ARNr 16S pueda compartir con el ARN M1 la propiedad de unirse a ARNt.

El papel del ARNr 16S en la unión del ARNt no es, sin embargo, indispensable, como lo comprobaron Krzyzosiak *et al.* (1973), colaborando con Ofengand. Estos investigadores sintetizaron varios ARNr 16S con mutaciones en los extremos 3' y 5' o en la C₁₄₀₀, y encontraron que eran incorporados en subunidades 30S morfológicamente normales y capaces de unir ARNt en la posición correcta para su entrecruzamiento con luz ultravioleta. En forma inesperada el cambio de la C₁₄₀₀ por A no afecta la reconstitución del ribosoma, pero el cambio por G sí. Estos hallazgos parecen indicar que la C₁₄₀₀ es más importante para el ensamblaje del ribosoma que para la unión de ARNt.

B) Unión de aminoacil-ARNt al ARNr grande:

Hay indicios de que el ARNr 23S y sus homólogos en eucariotes participan en la unión del ARNt.

En el estudio de Brow y Noller⁽¹⁹⁴⁾ de protección contra la modificación del ARN por cetoxal, las guaninas protegidas por la unión del ARNt en el ARNr 23S son G₂₇₇, G₁₄₇₈ (ó G₂₁₁₂), G₂₁₁₆ y G₂₇₈₁. Estas bases pueden participar entonces en la unión del ARNt.

En otro estudio, Endo y Wool⁽¹⁹⁴⁾ hallaron que el ARNr 28S de hígado de rata probablemente participa en la la unión de ARNt a ribosomas. Sus afirmaciones se basan en la observación de que en ribosomas a los que se halla unido, el ARNr 28S se halla protegido de la acción de la toxina α -sarcina. Esta inactiva ribosomas eucarióticos al cortar el ARNr grande (28S de hígado de rata y 25S de levadura) en el lado 5' de la secuencia

...AGGAAC....

que se halla cerca del extremo 3' del ARNr (posteriormente se ha hallado que el sitio de corte de la α -sarcina se halla entre las bases G₄₃₂₈ y A₄₃₂₈⁽²⁰⁾). El corte impide la unión del complejo eEF-Tu-GTP-aminoacil-ARNt a los ribosomas. La α -sarcina también corta el ARNr 23S de *Escherichia coli*, probablemente en la secuencia

...AGGAGC....

pero esto no inactiva al ribosoma. De cualquier modo, la conservación evolutiva de la secuencia de corte de la α -sarcina desde procariontes hasta mamíferos, pasando por levaduras (el cambio es de sólo una base, subrayada arriba), indica que debe ser funcionalmente importante. Existe además una complementariedad entre la secuencia

...GAAC...

en el ARNr grande y la secuencia

...GT(pseudouridina)C...

en el bucle IV de los ARNt procarióticos (excepto del ARNt iniciador), lo que apoya la idea de una interacción directa entre el ARNt y el ARNr grande.

El grupo de Endo ha estudiado la acción de otras toxinas que inactivan ribosomas eucarióticos por otros mecanismos. Han hallado que algunas como la toxina Vero 2 (producidas por cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli*) y la toxina Shiga (producida por *Shigella dysenteriae*) inactivan los ribosomas al cortar el enlace N-glicosídico entre la ribosa y la base en sitios específicos (la A₄₃₂₄) del ARNr 28S de rata, generando un sitio abásico⁽¹³⁵⁾. Esto ocasiona algún cambio en el ARNr que inactiva al ribosoma al impedir la unión del aminoacil-ARNt dependiente del eEF-Tu. El sitio de corte es el mismo en el que la ricina corta el enlace de fosfodiéster, y es contiguo al sitio de corte de la α -sarcina. Otras toxinas vegetales que inactivan ribosomas también tienen actividad de N-glicosidasas, como la cadena α de la ricina, la abrina y la moadecina.

Varias toxinas de plantas inactivan catalíticamente a los ribosomas eucarióticos por el mismo mecanismo (generación de un sitio abásico en la posición A₄₃₂₄ del ARNr 28S de rata) han sido estudiadas por Endo y colaboradores⁽¹³⁶⁾ son la gelonina, la saporina, la momordina, y las proteínas antivirales de *Phytolacca americana* (*Pokeweed Antiviral Proteins*) PAP-S, PAP y PAP-II.

Como una extensión de este trabajo, Stirpe et al.⁽¹³⁷⁾ estudiaron el mecanismo de inactivación de ribosomas eucarióticos por las toxinas de plantas, hallando que todas ellas tienen actividad de N-glicosidasas, probablemente con la misma especificidad que la ricina. Las pro-

teínas estudiadas son la tritina, la somordina, la saporina, el inhibidor de cebada, la dianthina, la bryodina, la dodecandrina, la gelonina, la PAP, la saporina 6, la tricokirina, la viscumina, la volkensina y la cadena α de la ricina.

La inactivación de los ribosomas por cortes o alteraciones cerca del extremo 3' por todas estas toxinas indica que esta región del ARNr grande juega un papel importante en la unión del aminoacil-ARNt dependiente del eEF-Tu.

Una fuente de apoyo para la existencia de una interacción entre el aminoacil-ARNt la proporcionan los estudios de mutantes resistentes a antibióticos.

Kearsey y Craig⁽¹³⁰⁾ secuenciaron los extremos 3' de los ARNr ribosomales grandes (16S) mitocondriales de líneas celulares de humano y de ratón resistentes al cloranfenicol, y hallaron cambios de una sola base (A \rightarrow T) en la posición 30 en ratón y en la posición 96 (T \rightarrow C) en humano.

Blanc *et al.* han hallado también cambios de una base en la región 3' del ARNr 16S de mitocondria de dos líneas celulares de humano (cambios de T₂₉₉₁ a C y C₂₉₉₂ a A)⁽¹³¹⁾ y de mitocondria de ratón (cambio de U a C)⁽¹³²⁾.

Estas mutaciones se hallan casi contiguas a mutaciones en regiones homólogas del gen del ARNr 21S mitocondrial de levadura (*locus rib 1*), que proporcionan la misma resistencia. En *Escherichia coli* hay regiones homólogas en el ARNr 23S, las cuales parecen estar expuestas en la superficie del ribosoma y participar en la unión de las subunidades para formar el ribosoma 70S (véase el capítulo III). También hay regiones homólogas evolutivamente conservadas en ARNr de mitocondria de *Paramecium* y de cloroplastos de maíz.

Las mutaciones de resistencia al cloranfenicol se agrupan en dos secuencias totalmente conservadas, o "cajas", una de 10 bases y otra de 13, cerca del extremo 3'. Tienen una estructura secundaria común en los organismos en los que se hallan conservadas, en la que puede formarse una horquilla.

El cloranfenicol impide la unión del extremo 3' del aminoacil-ARNt (bases CCA)⁽¹³¹⁾ al ribosoma, lo que sugiere que el extremo 3' del ARNr grande (16S eucariótico, ARNr 23S de bacterias y ARNr 21S de mitocondria de levadura) interviene en la unión del aminoacil-ARNt. El cloranfenicol también parece inhibir la actividad de transferasa de peptidilo en sí misma, independientemente de que impida la unión del ARNt.

Cuadro 1: tipos de resistencia al cloranfenicol en el ARNr grande de varios organismos.

Organismo	Mutación	Caja	ARNr
Ratón	U -->C	10b	16S
"	A -->U	13b	"
Humano	U -->C	10b	16S
"	C -->A	13b	"
"	U -->C	10b	"
Levadura	A -->C	10b	21S
"	G -->A	13b	"
E. coli	---	--	23S

C) Papel de los ARNr 5S y 5.8S en la unión del ARNt:

Es posible que los ARNr 5S y 5.8S también participen en la unión del aminoacil-ARNt, aunque su papel es confuso.

Los ARNr 5S y 5.8S de hígado de rata participan en el sitio de unión de aminoacil-ARNt, junto con algunas proteínas ribosomales, especialmente L6. Esto fue comprobado por Chan et al⁽¹¹⁰⁾, usando columnas de cromatografía de afinidad, en las que se observó la unión de aminoacil-ARNt iniciadores y prolongadores a complejos de ARNr 5S o ARNr 5.8S y proteínas ribosomales unidos a sefarosa (*sepharose*).

El papel de estos ARNr es confuso, pues aunque por sí mismos no son capaces de unir aminoacil-ARNt, son necesarios en la formación del sitio de unión.

Por un lado, su participación parece ser indirecta, pues requieren en forma indispensable de proteínas ribosomales para poder unirse a ARNt⁽¹⁴⁰⁾.

Por otro lado hay razones para pensar que los ARNr 5S procarióticos intervienen en forma directa en la unión de aminoacil-ARNt prolongadores, pues todos ellos tienen la secuencia

...₄₂CGAAC₄₆...

cerca de la posición 45, que es complementaria a

...GT(pseudouridina)CG...

en el bucle IV (brazo común), de todos los ARNt procarióticos^(141, 142). Lo mismo sucede con los ARNr 5.8S eucarióticos. Una prueba más directa de que esta interacción es importante es el hecho de que el oligonucleótido

...T(pseudouridina)CG...

puede inhibir la unión de ARNt, aunque se requieren altas concentraciones para observar el efecto⁽¹⁴³⁾.

Meier *et al.*⁽³⁷⁾, hallaron que al introducir mutaciones en el ARNr 5S de *Escherichia coli*, en las posiciones 41, 66 y 103, disminuye la unión de ARNt a ribosomas programados con poli-U. Esto, claro puede deberse a un efecto indirecto de la mutación en la estructura del ribosoma, y no a una alteración de una interacción directa entre el ARNt y el ARNr 5S.

En experimentos realizados por el grupo de Nierhaus⁽¹⁴⁴⁾, se halló que el ARNr 5S estaba muy relacionado con la actividad de transferasa de peptidilo, ya que aunque no era indispensable, sí estimulaba fuertemente la reconstitución de esta actividad en ribosomas de *Escherichia coli*.

Sin embargo el grupo de Pace comprobó, usando ARNr 5S de *Escherichia coli* en los que la secuencia

...CGAA...

estaba ausente, que ésta no es indispensable para la síntesis de proteínas usando ARNm artificial⁽¹⁴²⁾ o natural⁽³⁵⁾. El único efecto de la falta de la secuencia es una disminución de la velocidad de la síntesis. Debe también recordarse que también se ha propuesto que la misma secuencia en el ARNt interactúa con el ARNr grande de procariontes y eucariontes (véase la sección anterior).

Más recientemente, el grupo de Erdmann⁽¹⁴⁵⁾ estudió la unión del oligonucleótido d(GTTCGG) al ARNr 5S, a complejos del ARNr 5S con proteínas, a las subunidades 30S y 50S y a ribosomas 70S no-programados (*i.e.* sin ARNm) de *Escherichia coli* y de *Bacillus stearothermophilus*.

Hallaron que el oligonucleótido, que es considerado como un análogo de la secuencia

...GT(pseudouridina)CG....

se une solamente con el ARNr 5S aislado. Los autores concluyen que la interacción propuesta entre el ARNr y el ARNr 5S no ocurre en los ribosomas procarióticos.

Lee y Traut⁽²⁰⁾ reportaron que el ARNr 5.8S de levadura se une a las proteínas L19, L31 y L33, las cuales han sido implicadas en los sitios A y P, y proponen que esto puede ser indicativo de una participación del ARNr 5.8S en la unión de los ARNr.

Así, no es posible aún afirmar que una interacción directa entre el ARNr 5S procariótico o el ARNr 5.8S eucariótico y los ARNr tenga una función real en la síntesis de proteínas.

Los ARNr 5S eucarióticos tienen la secuencia

...GAUC...

que es complementaria a

...GAUC...

que se halla en el bucle IV de los ARNr iniciadores eucarióticos⁽¹³⁴⁾, lo que hace pensar que pueden intervenir en la iniciación.

3. Transferasa de peptidilo:

Todos los ARNr intervienen, directa o indirectamente, en la función esencial del ribosoma.

La transferasa de peptidilo (peptidil transferasa) es la actividad enzimática del ribosoma responsable de la transferencia del grupo peptidilo del peptidil-ARNr en el sitio P al aminoacil-ARNr en el sitio A, es decir, la formación del nuevo enlace peptídico. Los estudios que se

han hecho para tratar de identificar a uno de los componentes del ribosoma con esta actividad, es decir, la búsqueda de la transferasa de peptidilo, han sido infructuosos. Es posible afirmar que la transferasa de peptidilo no es resultado de uno solo de los componentes del ribosoma, sino que se requiere de la conjunción del varios de ellos para tener esa función.

No obstante, se ha logrado identificar a varios componentes del ribosoma (entre los que destaca el ARNr 23S de *Escherichia coli*) que están relacionados con esta actividad.

La posibilidad de que el ARNr catalice la formación del enlace peptídico ha sido destacada por Garret y Wooley⁽¹⁴⁶⁾, quienes proponen un mecanismo de reacción. En éste, los grupos fosfato del extremo 5' de los ácidos nucleicos catalizan la reacción de ataque nucleofílico del grupo amino del aminoácido entrante sobre la unión entre el grupo carboxilo del peptidilo y el ARNt. El extremo 5' del ARNr 5S se halla en la protuberancia central de la subunidad grande, sitio en el que se ha localizado la actividad de transferasa de peptidilo. En esta posición se halla en posibilidad de participar en el mecanismo propuesto por Garret y Wooley.

Para identificar directamente qué partes de los ARNr intervienen en esta actividad, se han usado estrategias que pueden agruparse en tres categorías: A) los métodos de marcaje por afinidad, B) la identificación de mutantes resistentes a antibióticos, y C) los métodos de reconstitución.

A) Participación del ARNr grande:

El ARNr 23S es un componente indispensable para la actividad de transferasa de peptidilo (peptidil transferasa).

1) Evidencias de la participación del ARNr grande: **marcaje por afinidad.**

La puromicina es un análogo del aminoacil-ARNt, que se une al sitio A del ribosoma. Inhibe la síntesis de proteínas debido a que participa en la reacción de transferencia del peptidilo, pasa al sitio P en forma de peptidil-puromicina, y se desprende del ribosoma, evitando así que continúe la prolongación de la proteína.

El marcaje por afinidad, utilizando derivados de la puromicina con grupos entrecruzantes, ha permitido establecer que el ARNr 23S participa en el sitio en que el extremo 3' del ARNt se une al ribosoma, es decir, en el sitio de la transferasa de peptidilo.

Al usar un derivado de la puromicina unido a los sitios A o P, Greenwell et al. (147) hallaron entrecruzamiento específico con el ARNr 23S de *Escherichia coli*. El cloranfenicol, antibiótico que inhibe la transferasa de peptidilo al unirse al sitio A, impide el entrecruzamiento.

Otro derivado de la puromicina fué usado por Hall et al. (148) en experimentos en los que los sitios de entrecruzamiento fueron localizados por extensión de cebadores. Las bases entrecruzadas son la G₂₅₀₂ y la U₂₅₁₄, que se hallan en el bucle central del dominio V del modelo de la estructura secundaria del ARNr 23S. Este grupo también halló entrecruzamiento con varias proteínas ribosomales.

Otros investigadores como Barta y Kuechler (149) han utilizado derivados de aminoacil-ARNt con grupos entrecruzantes en el aminoácido para identificar sitios del ARNr 23S involucrados en la transferasa de

peptidilo. Comprobaron que las bases U₂₅₅₄ y U₂₅₅₅ del ARNr 23S de *Escherichia coli* son entrecruzadas al ARNt modificado. En otro trabajo^(149, 150), el mismo grupo halló que los sitios de entrecruzamiento son distintos si el ARNt modificado se halla unido al sitio A (nucleótidos U₂₅₅₄ y U₂₅₅₅) o al sitio P (nucleótidos A₂₄₄₅ y C₂₄₅₂), aparte de dos sitios en el fragmento

...2503AUGU₂₅₀₄...

que son entrecruzados en forma débil desde cualquiera de los dos sitios. Estos sitios en el ARNr 23S se hallan en el bucle central del dominio V de la estructura secundaria.

Hall et al.⁽¹⁵¹⁾ hicieron experimentos similares y hallaron entrecruzamiento del ARNt en los sitios A y P con la región del ARNr 23S entre las bases 2445 y 2668.

Todos estos sitios de entrecruzamiento se hallan en el dominio V del modelo de la estructura secundaria del ARNr 23S, "especialmente en el bucle central de este dominio. Esta región se halla muy conservada en eubacterias, mitocondrias, cloroplastos y eucariontes. Además, varias mutaciones de resistencia a antibióticos que inhiben la actividad de transferasa de peptidilo, como la eritromicina y el cloranfenicol, se han mapeado en esa zona del ARNr 23S.

Todo esto indica que: a) la función de la región central del dominio V del ARNr 23S es importante en el ribosoma, y b) esta región forma parte del llamado "centro de transferasa de peptidilo".

2) Evidencias de la participación del ARNr grande; resistencia a antibióticos.

Existe una gran cantidad de antibióticos que interfieren con las funciones del ribosoma. En varios casos, se ha logrado definir en qué

fase de la síntesis de proteínas se da esta interferencia y se han identificado nucleótidos específicos en los ARNr que al ser mutados proporcionan resistencia a los antibióticos. Estos hallazgos han sido interpretados como evidencia de la participación (directa o indirecta) de los ARNr en las funciones ribosomales con las que interfiere el antibiótico.

a) Mutantes resistentes a la eritromicina:

La eritromicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos que, además de tener efectos inhibitorios de la unión de las subunidades ribosomales en la iniciación, afecta fuertemente la actividad de transferasa de peptidilo en ribosomas procarióticos⁽³²⁾. Como en el caso del cloranfenicol, esta inhibición se debe tanto a un efecto intrínseco sobre la actividad catalítica de formación del enlace peptídico como a una inhibición de la unión del aminoacil-ARNt. Este doble mecanismo se explica porque el antibiótico se une al sitio en la subunidad 60S en el que se localiza la actividad de transferasa de peptidilo, y estorba la unión del ARNt a la vez que afecta la conformación del sitio catalítico.

En 1982, Sor y Fukuhara⁽¹⁸²⁾ localizaron y secuenciaron dos mutaciones de resistencia a la eritromicina que habían sido previamente mapeadas en el gen del ARNr 21S mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*, en el locus llamado *rib 3*. Para la localización precisa utilizaron mapeo de la mutación usando mutantes deficientes en respiración (ρ^- , también llamadas *petite*) en las que fragmentos del ADN mitocondrial se encuentran repetido varias veces, mientras que el resto se ha perdido. En ambos casos hallaron el mismo cambio, A₁₂₅₁→G. Hallaron que la

secuencia de nucleótidos en la región de la mutación se encuentra muy conservada evolutivamente, lo cual sugiere que es funcionalmente importante.

Otro locus en el que se han localizado mutaciones de resistencia a eritromicina y espiramicina (otro antibiótico de grupo de los macrólidos, junto con la eritromicina) en el gen del ARNr 21S mitocondrial de levadura, llamado *rib 2*, también ha sido caracterizado por Sor y Fukuhara⁽¹³³⁾. Utilizando mapeo con mutantes *petite*, localizaron y secuenciaron dos mutaciones en ese locus. Una de ellas, que resulta del cambio de la C₃₃₃₃ por G, proporciona resistencia a la eritromicina y a la espiramicina. La otra sólo da resistencia a la espiramicina, y resulta del cambio de la misma base C₃₃₃₃ por T. La secuencia correspondiente al locus *rib 2* también se halla conservada evolutivamente.

Comparando las secuencias de regiones homólogas de varios organismos, hallaron que en aquellos en los que se halla una adenina (A) en el sitio equivalente al 1951 (*locus rib 3*) y una C en el sitio equivalente al 3993 del ARNr 21S (*locus rib 2*), los ribosomas son sensibles a la eritromicina, mientras que en aquellos que tienen una G en *rib 3* y una T en *rib 2* son resistentes:

Tabla 2: Comparación de la sensibilidad a la eritromicina y la espiramicina en varios ARNr

Organismo	Secuencia		Resistencia	
	rib 3	rib 2	eritro.	espira.
• <i>Escherichia coli</i> POSICION:	GACGG A AAGAC ... ^2053	GGTC C CTATCTGC 2619^	S	S
• Mitochondria de <i>Paramecium</i>	GACGG A AAGAC ... ^1553	GGTC C CTATCTGT 2589^	S	S
• Mitochondria de <i>Clamydomonas</i>	----- ...	GGTC C ATATCCGN ?^	S	S
• Cloroplasto de maíz	GACGG A AAGAC ... ^2147	GGTC C ATATCTGG 2714^	?	?
• Cloroplasto de tabaco	GACAG A AAGAC ... ^2062	GGTC C ATATCCGG 2631^	?	?
• Mitochondria de levadura (silvestre)	GACGG A AAGAC ... ^1946	GGTT C CTATCTGC 4001^	S	S
• Mitochondria de levadura (mutante)	GACGG G AAGAC ... ^1946	-----	R	?
• Mitochondria de <i>Aspergillus</i>	AACGA G AAGAC ... ^1907	GGTT T CTATCTTC 4299^	(R)	?
• Mitochondria humana	GACGA G AAGAC ... ^1046	GGTT T CTATCTAC 1436^	(R)	?
• Mitochondria de raton/rata	GACGA G AAGAG ... ^1060	GGTT T CTATCTAT 1457^	R	?
• Citoplasma de levadura	GCAAA G AAGAC ... ^2393	AGTT I TACCCTAC 2985^	R	R

Tanto los *loci rib 2* y *rib 3* como el *rib 1* (en el que se localizan mutaciones de resistencia al cloranfenicol en levadura) se hallan en el dominio V del modelo de la estructura secundaria del ARNr 21S (que es homóloga a la del ARNr 23S de *Escherichia coli*). Los tres *loci* se hallan situados en el bucle central del dominio V. La estructura y fragmentos de la secuencia de esta región se hallan muy conservados evolutivamente. La cercanía entre los sitios de resistencia a estos antibióticos es consistente con el hecho de que la unión del cloranfenicol al ribosoma impide la unión de la eritromicina y viceversa.

Otra prueba de la intervención del bucle central del dominio V del ARNr grande (véase la figura 10) es el hallazgo de Skinner *et al.* (1964) del mecanismo de resistencia a la eritromicina del organismo que la produce, *Streptomyces erythraeus*. Este organismo es resistente además a otros macrólidos, lincomicina y estreptograminas B, y esta resistencia parece deberse a la metilación de una adenina en el ARNr 23S.

En *Staphylococcus aureus* la eritromicina puede inducir un fenotipo idéntico, manifestado por la metilación de adeninas en el ARNr 23S. Skinner y colaboradores hallaron que una metilasa específica modifica una adenina (subrayada abajo) en *S. erythraeus*, produciendo N⁶,N⁶-dimetiladenina, dentro de la secuencia



La adenina modificada corresponde a la A₂₀₅₈ en el bucle central del dominio V de la estructura secundaria del ARNr 23S de *Escherichia coli*.

Gauthier *et al.* (1965) localizaron una mutación de resistencia a la eritromicina en el ARNr grande del cloroplasto de *Chlamydomonas moewusii*, que resulta del cambio de la citosina equivalente a la C₂₆₁₁

del ARNr 23S de *Escherichia coli* por G, dentro del locus *rib 2* en el bucle central del dominio V.

b) Mutantes resistentes al cloranfenicol:

Ettayebi *et al.* (1985) hallaron en 1985 en *Escherichia coli* que dos mutaciones de resistencia al cloranfenicol también mapean en el bucle central del dominio V del ARNr 23S. Los estudios de mutaciones en los genes de los ARNr en *Escherichia coli* son difíciles, puesto que dichos genes se hallan presentes en múltiples copias (a diferencia del genoma mitocondrial de levadura, en el que sólo hay una copia de estos genes). En este estudio se utilizó el operón *rrn B* clonado, en un plásmido en un plásmido que se halla en muchas copias dentro de cada célula. El nucleótido alterado en ambos casos es la G₂₀₅₇, que cambió a A.

c) Mutantes resistentes a la anisomicina:

La anisomicina es un antibiótico que afecta sólo a ribosomas eucarióticos. Interfiere con la unión del extremo CCA del aminoacil-ARNt al centro de la transferasa de peptidilo, y además inhibe directamente la actividad catalítica (formación del enlace peptídico) (1981). Hummel y Böck (1986) estudiaron mutantes resistentes a la anisomicina de las halobacterias *Halobacterium halobium* y *Halobacterium cutirubrum*. Este grupo de arqueobacterias, junto con las metanógenas, son normalmente afectadas por la anisomicina y otros antibióticos que interfieren con la transferasa de peptidilo pero que en general no afectan a ribosomas 70S bacterianos. Esto se ha tomado como base para afirmar que el centro

de transferasa de peptidilo de los ribosomas 70S de las arqueobacterias es similar al de los ribosomas 80S de los eucariontes.

Estos investigadores hallaron que todas las mutantes que aislaron caían dentro de una de tres clases: una de ellas, con poca resistencia al antibiótico, resulta del cambio de la A₂₄₇₂ por C. La segunda, con una resistencia media, se debe al cambio G₂₄₆₆→C. La tercera clase, con alta resistencia a la anisomicina, resulta del cambio C₂₄₇₁→U. Estas tres posiciones se hallan en el bucle central del dominio V de la estructura secundaria del ARNr 23S, lo que una vez más, indica la importancia de esta región para la actividad de transferasa de peptidilo.

◆

Otros antibióticos que inhiben la actividad de transferasa de peptidilo y para los que han hallado mutaciones de resistencia en el gen del ARNr 23S son la lincosamida (macrólido) y las estreptograminas g₍₁₂₁₎.

El dominio II de la estructura secundaria del ARNr 23S (véase la figura 7) también parece intervenir en la actividad de transferasa de peptidilo: Douthwaite *et al.* (1977) localizaron en *Escherichia coli* una mutación de resistencia débil a la eritromicina en ese dominio, consistente en la pérdida de las bases 1219 a 1230. Aunque esta región no está conservada evolutivamente, los autores citan evidencia de interacciones entre el dominio II y el V, obtenidas por entrecruzamiento. Basándose en esto, proponen que hay una interacción funcional entre estos dos dominios, que puede ser importante en la actividad del centro de transferasa de peptidilo.

Debido a que tanta evidencia indirecta señala que el bucle central del dominio V del ARNr grande interviene en la actividad de formación

del enlace peptídico. este bucle ha llegado a ser conocido como el "bucle de la transferasa de peptidilo"⁽¹⁵⁰⁾.

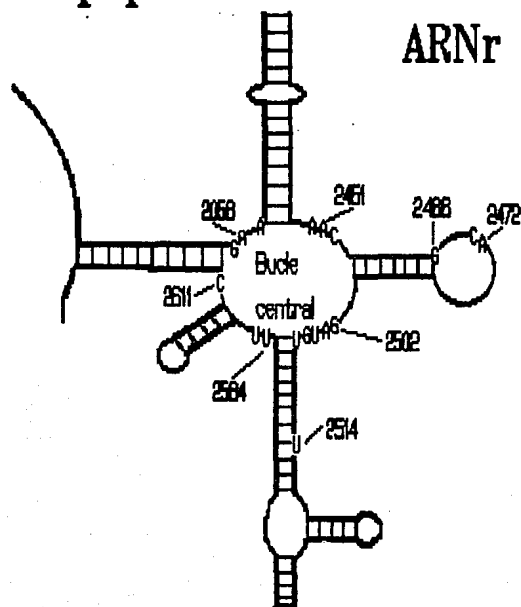
3) Evidencias de la participación del ARNr grande; métodos de reconstitución.

El marcaje por afinidad permite identificar componentes que estén en el centro activo de la transferasa de peptidilo o muy cerca de éste, pero que no necesariamente participan en la actividad. Los métodos de reconstitución, en cambio, identifican a componentes entre los que forzadamente se hallan los responsables de la actividad, ya sea en forma directa o indirecta (por ejemplo, permitiendo la unión o la conformación correcta de otro componente que participe directamente en la actividad catalítica).

El grupo de Nierhaus⁽¹⁴⁴⁾ logró identificar 9 componentes del ribosoma que son esenciales para la reconstitución de la actividad de transferasa de peptidilo en ribosomas de *Escherichia coli*. Estos incluyen a 8 proteínas de la subunidad 50S y al ARNr 23S.

Con el desarrollo de los métodos de ADN recombinante ha sido posible hacer experimentos de reconstitución utilizando moléculas de ARNr con mutaciones específicas, y observar el efecto de éstas sobre las actividades del ribosoma. Vester y Garret⁽¹⁵⁰⁾ utilizaron la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para obtener ARNr 23S con los siguientes cambios. todos ellos en nucleótidos universalmente conservados y adyacentes a sitios relacionados con resistencia al cloranfenicol

Figura 10:
Bucle de la transferasa de
peptidilo en el dominio V del
ARNr grande.



en mitocondrias (véanse las secciones anteriores):

A₂₀₆₀——> C

A₂₄₅₀——> C

G₂₅₀₂——> A

A₂₅₀₃——> C

Las dos primeras mutaciones son letales para las células. Los ARNr mutados son incorporados en las subunidades 50S, pero la capacidad de asociación de éstas con las subunidades 30S disminuye considerablemente. Las otras dos mutaciones (posiciones 2502 y 2503) se incorporan a las subunidades 50S y forman ribosomas activos, pero las células crecen más lentamente que las normales. La mutación de la A₂₅₀₃ por C había sido identificada como la responsable de un fenotipo de resistencia al cloranfenicol, lo cual fué confirmado en este estudio. La mutación de la G₂₅₀₂ no alteró la sensibilidad a dicho antibiótico. Este trabajo evidencia la importancia de tres nucleótidos que implicados (o adyacentes a otros que lo han sido) en la transferasa de peptidilo por mercaje por afinidad (véase la sección anterior): A₂₄₅₀, G₂₅₀₂ y A₂₅₀₃, pues al ser cambiados, los ribosomas muestran graves alteraciones.

Todas estas evidencias, junto con los hallazgos de mercaje por afinidad, asegura que el ARNr 23S es un componente indispensable de la transferasa de peptidilo, aunque aún no se sepa exactamente si su papel en esta actividad es realmente catalítico.

◆

Ha habido reportes de reconstitución de ribosomas sin el ARNr 5S que no presentan actividad de transferasa de peptidilo ni unión del complejo ternario aminoacil-ARNt·EF-Tu·GTP (citados en la ref. 160).

pero es difícil precisar si la falta de actividad enzimática es un efecto secundario de la falta de unión del aminoacil-ARNt, o una indicación de un posible papel del ARNr 5S en el centro de transferasa de peptidilo.

B) Evidencias de la participación del ARNr chico.

El ARNr chico también participa importantemente en la transferasa de peptidilo.

La evidencia que apoya la participación del ARNr chico en la formación del enlace peptídico proviene principalmente de estudios de mutantes resistentes a antibióticos como la paromomicina y la higromicina, la estreptomycinina y otros aminoglicósidos, y de experimentos de protección contra la modificación química.

La paromomicina y la higromicina son dos aminoglicósidos que, al igual que la estreptomycinina afectan el reconocimiento de los codones en el centro de la transferasa de peptidilo, causando errores en la traducción⁽¹³²⁾.

Moazed y Noller⁽¹³³⁾ han detectado que la base G₁₄₉₄ del ARNr 16S de *Escherichia coli* es protegida por la modificación química por la unión de la higromicina a la subunidad 30S. Este sitio se halla cerca de la U₁₉₄₅, la cual al mutar a C proporciona resistencia a la higromicina.

Spangler y Blackburn⁽¹³⁴⁾ identificaron dos mutaciones de resistencia a la higromicina y a la paromomicina en el ARNr17S de *Tetrahymena thermophila*. Tanto la mutación de resistencia a la paromomicina (G₁₇₀₇ → A) como la de resistencia a la higromicina (U₁₇₁₁ → C) se hallan en regiones conservadas evolutivamente en el dominio 3' menor del ARNr. La primera se localiza en la base de la

horquilla mayor de este dominio, por lo que es posible que la mutación la desestabilice (en levadura se localizó una mutación en la base complementaria en la horquilla, que produce el mismo fenotipo). La mutación de resistencia a la higromicina se halla en una base no apareada cerca de la base de la horquilla mayor. Esta evidencia sugiere la participación de esta región del ARNr chico en la corrección de errores en la traducción.

La estreptomicina es un antibiótico del grupo de los aminoglicósidos. Interfiere con la transferasa de peptidilo en forma indirecta al impedir la unión del ARNt, y también directamente, alterando el reconocimiento de los codones y causando errores en la traducción⁽¹²¹⁾. Este último efecto probablemente se debe más a una alteración en el mecanismo de corrección.

Montandon *et al.*⁽¹²²⁾ estudiaron el efecto de un cambio de base en el ARNr 16S de *Escherichia coli* en la resistencia a la estreptomicina. Partieron del hecho de que en mutantes cloroplásticos de *Euglena gracilis* resistentes al antibiótico, detectaron un cambio de la C₂₇₆ por T en el gen del ARNr 16S del cloroplasto. Este hecho es de por sí interesante, ya que las mutaciones de resistencia a estreptomicina en *Escherichia coli* se han relacionado con la proteína S12, no con el ARNr. La C₂₇₆ es equivalente en la estructura secundaria a la C₂₁₂ del ARNr 16S de *E. coli*, así que los autores cambiaron esta base por T y vieron los efectos *in vivo* en *E. coli*. Hallaron que las mutantes así construidas son resistentes a la estreptomicina. La base mutada se halla en una región del dominio central del ARNr 16S, conservada en eubacterias, cloroplastos y mitocondrias, en la base de una hélice corta. Quizá esta mutación altera la hélice, impidiendo que la estreptomicina afecte el mecanismo de corrección.

Etzold y colaboradores⁽¹⁴³⁾ estudiaron una mutante de *Nicotiana tabacum* (tabaco) resistente a la estreptomycin. La mutación había sido previamente localizada en el genoma cloroplástico, y se había mostrado que disminuye la afinidad del antibiótico por la subunidad 30S. Basándose en la mutación de resistencia que había sido localizada por Montandon *et al.* en la C_{612} de *E. gracilis*, buscaron una mutación similar en el sitio correspondiente en el cloroplasto de tabaco. La mutación que hallaron (un cambio de la C_{660} por A) tiene el mismo efecto que había sido hallado en *Euglena*: desestabiliza aproximadamente en un 35% una hélice del dominio central del ARNr grande. En cloroplasto de tabaco, el gen del ARNr 16S se halla en dos copias; ambas presentaron la misma mutación. Resultados equivalentes han sido obtenidos por Fromm *et al.*⁽¹⁴⁷⁾

Estos dos casos no demuestran conclusivamente la participación del ARNr en la transferasa de peptidilo, ya que el cambio de la base podría alterar la unión de una proteína ribosomal que sea la que intervenga en la actividad catalítica.

Gauthier *et al.*⁽¹⁵⁵⁾ localizaron una mutación de resistencia a la estreptomycin en el gen del ARNr chico del cloroplasto de *Chlamydomonas eugametos*. La mutación, que cambia la adenina equivalente a la A_{623} del ARNr 16S de *Escherichia coli* por C, se halla en un bucle del dominio 5'. La proteína S4, que ha sido implicada en la respuesta al antibiótico, se une a este mismo bucle. Otras mutaciones de resistencia a la estreptomycin han sido localizadas en *Chlamydomonas reinhardtii* en las bases A_{1191} y G_{1193} , en el dominio 3' mayor del mismo ARNr.

Moazed y Noller⁽¹⁵⁰⁾ localizaron, por experimentos de protección de la modificación por cetoxal o sulfato de dimetilo, que las bases

A₁₁₃₋₉₁₀, U₉₁₁ y C₉₁₂ son protegidas por antibióticos que interfieren con la actividad de transferasa de peptidilo. Esto sugiere una vez más que esta última base y las que la rodean intervienen en la dicha actividad. La región alrededor de la base 915 ha sido implicada en la corrección (*proofreading*).

Otros aminoglicósidos (*neomicina*, *paromomicina*, *gentamicina*, *kanamicina*) que tienen efectos análogos a los de la estreptomicina protegieron las bases A₁₄₀₀ y G₁₄₉₄. Se han localizado sitios de resistencia a estos antibióticos en las bases 1401 y 1491, muy cercanas a las protegidas.

4. Función del ARNr en la translocación:

El ARNr chico monitorea la conservación del marco de lectura correcto durante el avance del ARNm en la translocación.

Durante la translocación, el ARNt descargado que queda en el sitio P es expulsado del ribosoma, al tiempo que el nuevo peptidil-ARNt del sitio A pasa al P y el ARNm es desplazado un codón (todo esto requiere de la unión del EF-Tu y la hidrólisis de una molécula de GTP; véase el capítulo I).

En 1987-88 han surgido ciertas indicaciones de que el ARNr chico puede ser responsable del avance del ARNm y de la conservación del marco de lectura correcto, es decir, de que el avance del ARNm sea de tres en tres bases.

Burma *et al.* (1988) propusieron un modelo en el que el ARNr 23S participa activamente en la translocación por medio de cambios conformacionales, inducidos por la unión de GTP ó GDP (véase el capítulo II).

Moazed y Noller⁽¹³⁰⁾ localizaron algunas bases en el ARNr 16S que son protegidas de la modificación con cetoxal o sulfato de dimetilo por la espectinomicina, un aminoglicósido que inhibe la traslocación⁽¹³¹⁾. Las bases protegidas, C₁₀₆₃ y G₁₀₆₄, se hallan apareadas en la estructura secundaria con un sitio en el que se han localizado mutaciones de resistencia al mismo antibiótico (C₁₁₀₂). Esto parece implicar a esta región del ARNr 16S en la translocación.

Trifonov⁽¹³⁴⁾ observó que existen algunos ARNm que son siempre traducidos con un cambio de marco a la mitad de la lectura (*i.e.* tienen una mutación "normal" de cambio de fase), por ejemplo el gen RF-2 de *Escherichia coli*, y propuso que los ARNm deben tener de alguna manera codificada la información que controla el marco de lectura correcto, por ejemplo con una señal cada tres bases. Normalmente se acepta que el marco de lectura correcto queda determinado por la unión del ARNm a la subunidad pequeña, con ayuda de la interacción codón-anticodón y del reconocimiento de la secuencia Shine-Dalgarno o de su equivalente y de la capucha (*cap*) en eucariontes². Sin embargo, algunos análisis habían sugerido desde tiempo atrás una posible regularidad con una periodicidad de tres bases en ARNm de diversas especies, e.g. la preferencia de codones que comienzan con G.

Trifonov analizó las secuencias de 1,030 ARNm de 130 especies, incluyendo animales, plantas, hongos, bacterias, organelos, virus, plásmidos y transposones. Halló una marcada preferencia de la presencia de G en la primera posición (se halla en el 35% de los codones, contra el 25% que se esperaría por azar), y una tendencia a evitar G en la segunda posición (se halla en sólo el 18% de los codones) y propone que este patrón (G-noG-N) n es el portador del "código de marco de traducción" (*Translation framing code*). De este modo, el marco correcto es

aquél que tiene el mayor número de G en la primera posición. Algunas evidencias que presenta en apoyo de su hipótesis son las siguientes:

- El patrón sólo se halla en secuencias codificadoras (no en las secuencias anteriores al codón de iniciación, ni en las posteriores al de terminación)
- En cuatro casos concretos de mutaciones por cambio del marco de lectura, el patrón cesa inmediatamente antes del sitio de la mutación, y reaparece inmediatamente después del mismo, en fase con el nuevo marco de lectura.
- Esta última característica es aún más acusada en el caso del ARNm RF-2 de *E. coli*, lo que puede explicar que sea siempre traducido con una mutación de cambio de fase.

Trifonov supone que el ARNr 16S es la molécula responsable de monitorear la conservación del marco correcto de lectura, con base en la regularidad del ARNm. Al buscar secuencias con C distribuidas regularmente cada tres bases en el ARNr 16S y que no formen hélices en la estructura secundaria, halla las tres siguientes:

(LAS BASES EN LETRA MAS GRANDE Y SUBRAYADAS SON LAS QUE PUEDEN APAREARSE CON LA SENALES PROPUESTAS DEL ARNm)

... 517 GC CAG CAG CCG CG GUAAU 534 ...

... 1392 GUACA CAC CGC CG GUCA 1408 ...

... 1530 GAU CAC CCU CUA 1542 ...

(esta última es la secuencia Shine-Dalgarno, la cual se une al ARNm)

Según el modelo de Trifonov, estas tres secuencias del ARNr 16S interactúan con las G espaciadas regularmente del ARNm, monitoreando

cial requiere que el ARNm avance 4 nucleótidos en vez de tres en el sitio de la mutación de supresión.

Por otro lado, Stiege *et al.* (22) entrecruzaron poli-U o poli-A con el ARNr 16S por medio de luz ultravioleta. Aislado y secuenciando el fragmento entrecruzado, hallaron que comprende la secuencia

...1324ACACAC1325...

la cual coincide con uno de los sitios postulados por Trifonov para interacción entre el ARNm y el ARNr 16S.

Es claro, entonces, que todos estos hechos prestan apoyo directo al papel del ARNr chico en el avance en fase del ARNm durante la fase de prolongación.

CAPITULO V

PARTICIPACION DE LOS ARNr EN OTRAS FUNCIONES DEL RIBOSOMA.

Aparte de su participación en la estructura y el ensamblaje de los ribosomas y en las etapas de iniciación y de prolongación en la síntesis de proteínas, los ARNr parecen participar en otros procesos como son la terminación de la traducción y la translocación cotraduccional de proteínas a través de membranas.

1. Participación de los ARNr en la terminación de la traducción.

El ARNr 16S parece participar en el reconocimiento de los codones de terminación.

La terminación es la fase menos estudiada de la síntesis de proteínas (véase el capítulo I). Posiblemente debido a esto, hay poca evidencia de que los ARNr participen en esta etapa.

Shine y Dalgarno, en su artículo original⁽⁷⁾, propusieron (además de la interacción entre el ARNm y el ARNr 16S) que la secuencia UUA₆₄₋₃ del ARNr 16S de *Escherichia coli* interviene en la terminación, ya que puede aparearse con los codones de terminación del ARNm. La secuencia UUA en el extremo 3' se halla muy conservada en procariontes y eucariontes.

El apareamiento de UUA₆₄₋₃ con los codones de terminación UAA y UAG (con balanceo en la tercera base en el último caso). UGA también podría ser reconocido si hay balanceo en la segunda posición, con lo que sólo se aparearían la primera y la tercera bases.

Dentro de este modelo, la supresión de mutaciones de terminación (*nonsense*) se debería a una competencia entre el anticodón del ARNt supresor (que es capaz de aparearse con un codón de terminación) y la secuencia UUA_{OH-3'} del ARNr 16S. Esta interesante predicción proporciona una ruta de experimentación que permitiría comprobar si la proposición es correcta. Finalmente, Shine y Dalgarno sugirieron que el apareamiento del codón de terminación y el ARNr 16S podría ser la señal para la unión de los factores de liberación.

Otra región del ARNr 16S de *E. coli* también parece intervenir en la terminación, reconociendo a un codón de terminación. Murgola *et al.* (148) hallaron una mutación del gen *rrnB* (que codifica para el ARNr 16S) la cual suprime una mutación de terminación por UGA del producto del gen *trpA*. Este hallazgo es novedoso debido a que todos los casos de mutaciones de supresión anteriormente reportados se hallan en los genes de los ARNt o de las sintetetas de aminoacil-ARNt (en los casos de supresión de mutaciones de cambio de aminoácido (*missense*)).

Los autores comprobaron que la mutación consiste en la pérdida del nucleótido C₁₀₅₄ del ARNr 16S, y que suprime específicamente al codón de terminación UGA (no a UAA ni UAG). Claramente, estos resultados indican una participación de esa región del ARNr 16S en la terminación (por lo menos cuando se utiliza el codón).

El mecanismo que proponen para dicha participación se basa en la presencia de la secuencia 1199UCAUCA1204 en el mismo tallo en la estructura secundaria en el que se halla la C₁₀₅₄, en posiciones casi opuestas. Ambas regiones son conservadas evolutivamente. El codón UGA podría aparearse con las UCA repetidas 1199-1204, lo que permitiría su reconocimiento como señal de terminación. La alteración de la estruc-

tura del tallo por la pérdida de la *C1.054* impediría dicho reconocimiento, causando el fenotipo de supresión.

2. Participación de los ARNr en la translocación cotraduccional de proteínas a través de membranas.

Otra función en la que ha sido implicado el ARNr, aunque no en forma directa, es la translocación cotraduccional de proteínas a través de membranas. (no debe confundirse con la translocación del peptidil-ARNt en el ribosoma).

La translocación de proteínas a través de membranas (como las del retículo endoplásmico) es un proceso que se da en forma simultánea a la síntesis de la proteína. Poco después de la iniciación de dicha síntesis, la parte recién sintetizada de la proteína, llamada **peptido señal**, se une a un complejo ribonucleoproteico llamado **partícula de reconocimiento de señal (SRP)**. El complejo del ribosoma que sintetiza la proteína y la SRP se une a la membrana por medio de un receptor que reconoce a la SRP, y la proteína es translocada conforme avanza su síntesis. Así, la SRP al interactuar íntimamente con el ribosoma actúa como un adaptador que acopla la traducción con la translocación de la proteína naciente⁽¹²⁷⁾.

Boehm⁽¹²⁸⁾ halló que el ARNr 7SL, que forma parte de la SRP, tiene una región cuya secuencia y estructura secundaria es altamente homóloga a la región del ARNr 5S que permite la unión de la proteína ribosomal L5. La propuesta de Boehm es que dicha región del ARNr 7SL compite con el ARNr 5S por la unión de L5. La unión de L5 y el ARNr 7SL

permitiría la unión del ribosoma con la *SRP*, y puede causar además cambios conformacionales en la región de la transferasa de peptidilo, la cual está muy cercana a *L5*.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CAPACIDAD DE LOS ARNr PARA LLEVAR A CABO LA SINTESIS DE PROTEINAS

En este capítulo final, presento una recapitulación de la evidencia recopilada en este trabajo de la participación de los ARNr en las diversas funciones del ribosoma. Luego presento la evidencia, obtenida por un grupo de investigación hindú, de que un complejo constituido únicamente por los ARNr 16S, 23S y 5S, junto con unas cuantas proteínas ribosomales, es capaz de llevar a cabo todas las funciones esenciales de un ribosoma completo, aunque con una eficiencia mucho menor.

1. Resumen de las funciones ribosomales en las que participan los ARNr.

Los ácidos ribonucleicos ribosomales juegan muchos papeles de importancia en los ribosomas. A lo largo de este trabajo se han revisado las evidencias de su participación en la mayoría de los procesos en los que intervienen estos organelos. Según la fase de la traducción en la que participan, los he agrupado como sigue:

A. Papel estructural de los ARNr:

La participación de los ARNr en la estructura y el ensamblaje de los ribosomas no es un papel activo. Su importancia, sin embargo, es

fundamental ya que permite el mantenimiento de los ribosomas como unidades estructurales independientes.

- Los ARNr parecen ser capaces de adquirir sus conformaciones nativas sin participación de las proteínas ribosomales. Esto contrasta con la visión que se tenía anteriormente, en la que se pensaba que eran las proteínas las que determinaban la conformación de los ARNr.
- Por lo menos en el caso de dos ARNr que se hallan formando parte de la misma subunidad ribosomal (ARNr 5.8S y ARNr 28S), la unión directa ARNr-ARNr parece ser la que determina que dichos ARNr permanezcan juntos.
- Los ARNr sirven como una armazón a la que se unen las proteínas ribosomales, lo que permite el ensamblaje y el mantenimiento de la estructura del ribosoma. Este es el único papel que tradicionalmente se juzgaba que tenían los ARNr.
- Cambios en la conformación del ARNr chico inactivan al ribosoma, lo que indica que la conformación nativa del ARNr es necesaria para la actividad ribosomal.
- El ARNr grande juega un papel en la translocación, ya que su conformación cambia durante este proceso. También se han detectado cambios conformacionales en los ARNr 5S y 5.8S, aunque no se sabe que papel juegan.

B. Funciones de los ARNr en la iniciación de la traducción.

Los ARNr parecen participar en esta etapa del proceso de síntesis de proteínas principalmente facilitando la unión de moléculas que son

necesarias y la unión de las dos subunidades ribosomales para formar el complejo de iniciación.

- El IF-3 se une al ARNr chico en procariontes y eucariotes.
- El IF-2 eucariótico se une al ARNr 18S.
- El ARNm se une a la subunidad chica por medio de un apareamiento de bases con el extremo 3' del ARNr chico en procariontes y eucariotes, aunque la importancia de esta interacción es mucho mayor en los procariontes.

Este mecanismo de unión del ARNm al ribosoma parece ser evolutivamente más antiguo que las otras interacciones entre el ARNm y otros componentes del ribosoma.

Una interacción ente el ARNr chico y el ARNm también parece intervenir en la alineación correcta de este último sobre la subunidad chica.

- La unión de las subunidades ribosomales para formar el ribosoma activo es posible gracias a que hay una unión de los ARNr de una subunidad con los de la otra; específicamente el ARNr grande se une con el chico, ya sea por apareamiento de bases o por otro tipo de interacciones.

C. Funciones de los ARNr en la prolongación de la cadena polipeptídica.

Los ARNr se hallan implicados activamente en la mayoría de los procesos del ciclo de prolongación:

- Tanto el ARNr chico como el grande y el 5S participan en la unión de los ARNt a los sitios ribosomales A y P.

- Los factores de prolongación de procariontes y eucariontes se unen al ARNr grande.
- El bucle central del dominio V del ARNr grande de procariontes y eucariontes es parte fundamental del centro de transferasa de peptidilo. Así, el ARNr participa en la principal actividad enzimática del ribosoma.

Los otros ARNr también parecen participar en esta actividad.

- Los ARNr también participan en la translocación de los ARNt, mediante cambios en su conformación y monitoreando la conservación del marco de lectura correcto (i.e. asegurando que el ARNm avance tres nucleótidos cada vez).

D. Funciones de los ARNr en la terminación de la traducción.

Aunque no es abundante, hay evidencia de que el ARNr 16S participa en la terminación de la traducción, reconociendo a codones de terminación.

E. Papel de los ARNr en el transporte cotraduccional de proteínas a través de membranas.

La participación de el ARNr 5S en este proceso es muy indirecta, pues parece competir con el ARNr 7SL de la partícula de reconocimiento de señal por la unión de la proteína L5.

◆

Como se ha visto, los ARNr participan en cada paso de la síntesis de proteínas, especialmente en aquellos de importancia central como son el reconocimiento de las moléculas necesarias (ARNt, ARNm, factores de

iniciación y prolongación), el reconocimiento de las señales de terminación y muy importantemente la catálisis de la reacción de formación del enlace peptídico.

Toda esta evidencia, la cual además se halla presente tanto en eucariontes como en procariontes, sugiere que la participación de los ARNr es evolutivamente muy antigua. Es muy probable que en el ribosoma primitivo los ARNr hallan tenido una participación tan o más importante que en los actuales.

2. Capacidad de los ARNr para llevar a cabo la síntesis de proteínas.

El grupo encabezado por Debi P. Burma y D. S. Tewari en la India ha realizado estudios en los que se comprueba que los ARNr 16S y 23S de *Escherichia coli* pueden formar, en altas concentraciones de sales, un complejo bimolecular semejante en cierta forma a las dos subunidades ribosomales unidas⁽¹⁰⁵⁾. El IF-3, que separa las subunidades ribosomales, también estimula débilmente la separación del complejo 23S-16S.

El mismo grupo comprobó⁽¹⁷¹⁾ que el ARNr 5S no puede unirse a dicho complejo, utilizando centrifugación en gradientes de sacarosa para detectar la unión. La unión del ARNr 5S, sin embargo es posible en forma estequiométrica (una molécula de ARNr 5S por cada complejo 16S-23S) cuando se añaden tres proteínas ribosomales: L5, L18 y L15 ó L25. La adición de estas proteínas solas o de parejas de ellas no estimulan la unión de ARNr 5S en forma notable. Estas proteínas ya habían sido relacionadas con la unión del ARNr 5S a la subunidad 50S.

En un detallado estudio de 1985⁽¹⁷²⁾, este grupo de investigadores comprobó que el complejo de los ARNr 16S, 23S y 5S, mas unas cuantas

proteínas ribosomales, pueden llevar a cabo en forma rudimentaria todas las funciones asociadas con la síntesis de proteínas ribosomal.

Las funciones estudiadas fueron las siguientes:

• Unión de ARNt

La primera función estudiada fué la unión, mediada por poli-U de un peptidil-ARNt sintético (polifenilalanil-ARNt) al complejo 16S·23S·5S·L5·L18·L25 (las tres proteínas son necesarias para la unión del ARNr 5). Dicha unión se obtiene, aunque es sólo el 3% de la que se obtiene en ribosomas completos, y es específica para ese ARNt y ese ARNm. La unión del ARNm sintético poli-U al complejo es el 6% de la unión a ribosomas.

• Actividad de GTPasa dependiente de EF-G.

Esta actividad se considera como un criterio para medir la translocación. En este caso, no se necesitó la presencia del ARNr 5S ni las proteínas L5, L18 y L25, pero fué necesario añadir el complejo formado por las proteínas ribosomales L7/L12 y L10 (complejo (L7/L12)·L10). Se sabe que este complejo es necesario para la actividad de GTPasa en los ribosomas *in vivo*. La hidrólisis de GTP obtenida es específica (no se hidroliza ATP) y dependiente de EF-G, aunque es sólo el 2% de la actividad de GTPasa de ribosomas intactos.

▪ Formación de complejos de iniciación.

En tercer lugar se midió la formación de complejos de iniciación a partir del complejo 16S·23S·5S·L5·L18·L25·(L7/L12)·L10. El complejo de iniciación incluye a las dos subunidades ribosomales, el ARNm, el aminoacil-ARNT iniciador, y requiere de la participación de los factores de iniciación IF-3, IF-2 y de GTP.

Utilizando poli-U y N-acetilfenilalanil-ARNT en vez del aminoacil-ARNT iniciador, comprobaron que se forman complejos equivalentes a los de iniciación.

▪ Actividad de transferasa de peptidilo.

La detección de esta actividad, que puede considerarse como la función central del ribosoma, se midió por medio de la reacción de la puromicina. Esta sustancia es un análogo de aminoacil-ARNT, por lo que es capaz de entrar el sitio A ribosomal y de aceptar el grupo peptidilo que es transferido desde el sitio P por la transferasa de peptidilo. El producto de dicha reacción, peptidil-puromicina (o aminoacil-puromicina) puede detectarse por extracción y cromatografía en papel.

La formación de fenilalanil-puromicina detectada con el complejo 16S·23S·5S·L5·L18·L25·(L7/L12)·L10 fué del 3% de la obtenida con ribosomas intactos.

• Síntesis de poli-fenilalanina dirigida por poli-U.

Este experimento, cuya importancia es crucial, demostró que el complejo de los ARNr 16S, 23S y 5S con las proteínas ribosomales L5, L18, 125, L7/L12 y L10 es capaz de catalizar la síntesis de poli-fenilalanina utilizando poli-U como ARNm. La síntesis detectada fué el 5% de la obtenida con ribosomas intactos, y consistió principalmente en péptidos cortos. La síntesis requiere de los factores de prolongación EF-G y EF-Tu, y es inhibida parcialmente por los antibióticos tioestreptón y estreptomina.

En todos los experimentos anteriores se obtuvieron los mismos resultados cuando en vez de condiciones de recostitución (alta concentración de sales) se utilizó una concentración baja de sales y etanol 1M. Los ARNr utilizados se purificaron mediante varias extracciones con fenol, por lo que la contaminación residual por proteínas ribosomales fué de menos del 0.1% (determinando proteínas ribosomales radiactivas).

Debido a que en las condiciones de reconstitución utilizadas con el complejo los ribosomas intactos sólo tienen el 20-30% de su actividad, la comparación entre ésta y la del complejo sólo es aproximada. Es claro, sin embargo, que el complejo de los ARNr-proteínas tiene entre el 2 y el 5% de la actividad de los ribosomas intactos.

3. Comentarios finales.

La importancia de la participación de los ARNr en las funciones ribosomales se ve subrayada bajo la perspectiva de la hipótesis del mundo del ARN, descrita en el capítulo I.

En este esquema, las primeras moléculas autorreplicantes estaban hechas de ARN, y los ARN también participaron en la evolución de la maquinaria celular de síntesis de proteínas.

Las funciones que desarrollan los ARNr en el ribosoma moderno pueden así ser consideradas como evidencias "fósiles" en el nivel molecular; remanentes de la etapa en que el ribosoma primitivo estaba constituido totalmente por ARN.

Aunque la evidencia presentada en este trabajo muchas veces no es conclusiva, sino circunstancial, parece claro que los ARNr efectivamente siguen teniendo una importancia fundamental en las funciones ribosomales. Esta evidencia nos permite avanzar en el estudio del origen del ribosoma, prestando apoyo a la hipótesis del mundo del ARN y de las RNP, al mismo tiempo que nos ayuda a comprender más profundamente su funcionamiento.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.

LIBROS:

- I. ALBERTS, Bruce; Bray, Dennis; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith y Watson, James D.
1983 "Molecular biology of the cell."
Garland, New York, USA.
xxxx-1146-I35
- II. MOORE, J. Kenneth.
1984 "Chloroplasts."
Plenum Press, New York, USA.
xii-280.pp.
- III. LEWINER, Albert L.
1975 "Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular." Segunda edición.
Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España.
xxiv-1117 pp.
- IV. LEWINER, Albert L.
1984 "Principios de Bioquímica."
Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España.
1013 pp.
- V. LEWIN, Benjamin.
1982 "Genes, third edition."
John Wiley & sons, New York, USA.
xxii-761 pp.
- VI. STRAYER, Lubert.
1981 "Biochemistry, Second Edition."
W.H. Freeman & Co., EUA.
xxx-949 pp.
- VII. TIAGLOFF, Alexander
1982 "Mitochondria." (Cellular Organelle Series)
Plenum Press, New York, USA.
356 pp.

- VIII. WATSON, James D.; Hopkins, Nancy H.; Roberts, Jeffrey W.; Steitz, Joan Argetsinger, y Weiner, Alan M.
1987 "Molecular biology of the gene, fourth edition." Volume 1: General Principles.
Volume 2: Specialized aspects.
Benjamin/Cummings, California, EUA.
xxxxviii-1300p.

ARTICULOS DE REVISTAS:

- 1- MOORE, Peter B.
"The ribosome returns."
Nature 331/223-227 (January 21, 1988).
- 2- CRICK, Francis H. C.
"The origin of the genetic code."
J.Mol.Biol. 38/367-379(1968).
- 3- ORSEL, Leslie E.
"Evolution of the genetic apparatus."
J.Mol.Biol. 38/381-393(1968).
- 4- ORSEL L.E.
"Evolution of the genetic apparatus: a review."
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 52/9-16
(1987)
- 5- JOYCE, Gerald F.
"RNA evolution and the origins of life."
Nature 338/217-224(March 16, 1989).
- 6- TINOCO Jr., I.; Davis, P.W.; Hardin, C.C.; Puglisi, J.D.; Walker, G.T. y Wyatt, J.
"RNA structure from A to Z."
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 52/135-146(1987).
- 7- NOLLER, Harry F. y Woese, Carl R.
"Secondary structure of 16S ribosomal RNA."
Science 212/4493/403-411(1981).
- 8- NOLLER, Harry F.
"Structure of ribosomal RNA."
Ann.Rev.Biochem. 53/119-162(1984)
- 9- GARRET, R.A.; Douthwaite, S. y Noller, H.F.
"Structure and role of 5S RNA-protein complexes in protein biosynthesis."
TIBS 6/5/137-139(May, 1981).

- 10- PIELER, Tomas y Erdmann, Volker A.
"Three-dimensional structural model of subbacterial 15S RNA that has functional implications."
PNAS 79/4599-4603 (August, 1982).
- SPRINZL, M. et al.
Biochem. 15/3031-3039 (1976);
- OFFENBAND, J. y Henes, C.
J. Biol. Chem. 244/6241-6253 (1969).
(Referencias 6, 7 y 8 citadas en ref. 20).
- 11- NAZAR, Ross N.
"A 5.8S rRNA-like sequence in prokaryotic 23SrRNA."
FEBS Lett. 119/2/212-214 (1980).
- 12- BRINACOMBE, Richard.
"Conservation of structure in ribosomal RNA."
TIBS 9/6/273-277 (June, 1984)
- 13- LO, Amy C.; Liu, Wangyi y Nazar, Ross N.
"Alternative conformational states in the ribosome-associated 5.8S RNA."
Eur. J. Biochem. 141/549-553 (1984).
- 14- STIEGLER, Patrick; Carbon, Philippe; Ebel, Jean-Pierre y Ehresmann, Chantal.
"A general secondary-structure model for prokaryotic and eukaryotic RNAs of the small ribosomal subunits."
Eur. J. Biochem. 120/487-495 (1981).
- 15- DOUTHWAITE, Stephen; Christensen, Anni y Garret, Roger A.
"Higher order structure in the 3'-minor domain of small subunit ribosomal RNA from a Gram negative bacterium, a Gram positive bacterium and a eukaryote."
J. Mol. Biol. 169 249-279 (1983)
- 16- CHAN, Yuen-Ling; Gutell, Robin; Noller, Harry F. y Wool, Ira G.
"The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic acid and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid."
J. Biol. Chem. 259/1/224-230 (January 10, 1984).
- 17- DE LA CRUZ, Vidal F.; Lake, James A.; Simpson, Agda M. y Simpson, Larry.
"A minimal ribosomal RNA: Sequence and secondary structure of the 9S kinetoplast ribosomal RNA from *Leishmania tarentolae*."
PNAS 82/1401-1405 (March, 1985).

- 18- MÜLLER Harry F.; Kop, Jo Ann; Wheaton, Virginia; Brosius, Jürgen; Gutell, Robin R.; Kopylov, Alexei M.; Dohme, Ferdinand y Herr, Winship.
"Secondary structure model for 23S ribosomal RNA."
Nucl.Ac.Res. 9/22/6167-6187(1981).
- 19- MARCONI, Richard T. y Hill, Walter E.
"Identification of defined sequences in domain V of E.coli 23S rRNA in the 50S subunit accessible for hybridization with complementary oligodeoxyribonucleotides."
Nucl.Ac.Res. 16/4/1603-1615(1988).
- 20- CLARK, C. Graham; Tague, Brian W.; Ware, Vassie C. y Gerbi, Susan A.
"Xenopus laevis 28S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications."
Nucl.Ac.Res. 12/15/6197-6220(1984).
- 21- NOMURA, M.
"The role of RNA and protein in ribosome function: a review of early reconstitution studies and prospects for future studies".
COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 52/653-663 (1987).
- 22- RAUE, Hendrik A.; Lorenz, Siegfried; Erdmann, Volker A. y Planta, Rudi.
"Reconstitution of biologically active 50S ribosomal subunits with artificial 5S RNA molecules carrying disturbances in the base pairing within the molecular stalk."
Nucl.Ac.Res. 9/5/1263-1269(1981).
- 23- FOI, J. Wesley y Wong, Kin-Ping.
"Acquisition of native conformation of ribosomal 5S ribonucleic acid from Escherichia coli. Hydrodynamic and spectroscopic studies on the unfolding and refolding of ribonucleic acid."
Biochem. 21/2096-2102(1982).
- 24- KLEIN, Barbara K.; Staden, Arthur y Schlessinger David.
"Alternative conformations in Escherichia coli 16S ribosomal RNA."
PNAS 82/3539-3542(June, 1985).
- 25- KLEIN, Barbara K.; Staden, Arthur y Schlessinger, David.
"Electron microscopy of secondary structure in partially denatured precursor and mature Escherichia coli 16S and 23S rRNA."
J. Biol. Chem. 260/13/8114-8120(July 5, 1985).
- 26- KING, Thomas C.; Sirdeshmukh, Ravindra y Schlessinger, David.
"RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA."
PNAS 81/185-188(January, 1984).

- 27- STARK, Michael J.R.; Gourse, Richard L. y Dahlberg, Albert E.
"Site-directed mutagenesis of ribosomal RNA. Analysis of
ribosomal RNA deletion mutants using maxicells."
J.Mol.Biol. 159/417-439(1982).
- 28- MCDONOUGH, John y Nazar, Ross N.
"Accessibility of phosphodiester bonds in the yeast ribosomal 5S
RNA protein complex."
FEBS Lett. 209/1/52 56(December, 1986).
- 29- SHIH, Thomas O.; Banerjee, Nandita y Nazar, Ross N.
"Effect of point mutations on 5.8S ribosomal ribonucleic acid
secondary structure and the 5.8S-28S ribosomal ribonucleic acid
junction."
Biochem. 20/4029-4033(1981).
- 30- WALKER, Thomas A.; Johnson, Kimberly D.; Olsen, Gary J.; Peters, Mary
A. y Pace, Norman R.
"Enzymatic and chemical structure mapping of mouse 28S ribosomal
ribonucleic acid contacts in 5.8S ribosomal ribonucleic acid."
Biochem. 21/2320-2329(1982).
- 31- PETERS, Mary A.; Walker, Thomas A. y Pace, Norman R.
"Independent binding sites in mouse 5.8S ribosomal ribonucleic
acid for 28S ribosomal ribonucleic acid."
Biochem. 21/2329-2335(1982).
- 32- WALKER, Thomas A.; Endo, Yaeta; Wheat, William H.; Wool, Ira G. y
Pace, Norman R.
"Location of 5.8S rRNA contact sites in 28S rRNA and the effect
of α -sarcosine on the association of 5.8S rRNA with 28S rRNA."
J.Biol.Chem. 258/1/333-338(January 10, 1983).
- 33- CHOI, Yong C.
"Structural organization of ribosomal RNAs from Novikoff
hepatoma II. Characterization of possible binding sites of 5S
rRNA and 5.8S rRNA to 28S rRNA."
J.Biol.Chem. 260/23/12773-12779(October 15, 1985).
- 34- BRIMACOMBE, Richard; Stöffler, G. y Wittmann, H.G.
"Ribosome structure."
Ann.Rev.Biochem. 47/217-249(1978).
- 35- GRAY, P.N.; Bellemare, G.; Monier, R.; Gerret, R.A.; y Stöffler,
G.
"Identification of the nucleotide sequences involved in the
interaction between *Escherichia coli* 5S RNA and specific 50S
subunit proteins."
J.Mol.Biol. 77/133-152(1973).
- 36- DOUTHWAITE, Steve; Christensen, Anni y Garret, Roger.
"Binding sites of ribosomal proteins on prokaryotic 5S
ribonucleic acids: a study with ribonucleases."
Biochem. 21/2313-2320(1982).

- 37- MEIER, N.; Göringer, H.U.; Kleuvers, B.; Scheibe, U.; Eberle, J.; Szymkowiak, C.; Zacharias, M. y Wagner, R.
"The importance of individual nucleotides for the structure and function of rRNA molecules in *E. coli*. A mutagenesis study."
FEBS Lett. 204/1/89-95 (August, 1986).
- 38- METSPALU, E.; Ustav, Mart; Maimets, Toivo y Villems, Richard.
"The composition and properties of the *Escherichia coli* 5-S RNA-protein complex."
Eur. J. Biochem. 121/383-389 (1982).
- 39- METSPALU, E.; Ustav, Mart y Villems, Richard.
"The properties of the tRNA-protein complex of the *Escherichia coli* ribosome. Interaction with tRNA, 5-S RNA and 30-S ribosomal subunit."
Eur. J. Biochem. 124/269-273 (1982).
- 40- ULRICH, Norbert; Todokoro, Kazuo; Ackerman, Eric J. y Wool, Ira G.
"Characterization of the binding of rat liver ribosomal proteins L6, L7 and L19 to 5S ribosomal ribonucleic acid."
J. Biol. Chem. 255/16/7712-7715 (August 25, 1980).
- 41- ULRICH, Norbert; Lin, Alan; Todokoro, Kazuo y Wool, Ira G.
"Identification by affinity chromatography of the rat liver ribosomal proteins that bind to *Escherichia coli* 5S ribosomal ribonucleic acid."
J. Biol. Chem. 255/2/797-801 (January 25, 1980).
- 42- TERAO, Kazuo; Uchiumi, Toshio y Ogata, Kikuo.
"Cross-linking of L5 protein to 5S RNA in rat liver 60S subunits by ultraviolet irradiation."
Biochim. Biophys. Acta 609/306-312 (1980).
- 43- ISODA, Noboru; Tanaka, Tatsuo e Ishikawa, Kiichi.
"Isolation of a 5S RNA-protein L5 complex from 60S subunits of rat liver ribosomes by cesium sulfate density-gradient equilibrium centrifugation."
J. Biochem. 90/551-554 (1981).
- 44- MARION, Marie-Jeanne y Reboud, Jean-Paul.
"An argument for the existence of a natural complex between protein L5 and 5S RNA in rat liver 60-S ribosomal subunits."
Biochim. Biophys. Acta 652/193-203 (1981).
- 45- TERAO, Kazuo; Uchiumi, Toshio y Ogata, Kikuo.
"Identification of the protein cross-linked to the 3'-terminus of 5S RNA in rat liver ribosomal 60S subunits."
Biochim. Biophys. Acta 697/20-24 (1982).
- 46- PALEOLOGUE, Anne; Reboud, Anne-Marie y Reboud, Jean-Paul.
"Photo-induced protein cross-linking to 5S RNA and 28-S.8S RNA within rat-liver 60S ribosomal subunits."
Eur. J. Biochem. 149/525-529 (1985).

- 47- TODOKORO, Kazuo; Ulbrich, Norbert; Chan, Yuen-Ling y Wool, Ira G.
"Characterization of the binding of rat liver ribosomal proteins L6, L8, L19, S9 and S13 to 5.8S ribosomal ribonucleic acid."
J. Biol. Chem. 256/14/7207-7212 (July 25, 1981).
- 48- KARGEL, H.-J.; Stahl, J.; Gross, B.; Knespel, S.; Bielka, H. y Saarma, M.
"Studies on interaction of 5S RNA with ribosomal proteins."
FEBS Lett. 220/1/126-128 (August, 1987).
- 49- LEE, John C.; Henry, Beth y Yeh, Yee-chun.
"Binding of proteins from the large ribosomal subunits to 5.8S rRNA of *Saccharomyces cerevisiae*."
J. Biol. Chem. 258/2/854-858 (January 25, 1983).
- 50- LEE, John C. y Traut, Robert R.
"Proximity of 5.8S RNA-binding proteins and A-site proteins in yeast ribosomes inferred from cross-linking."
J. Biol. Chem. 259/16/9971-9974 (August 25, 1984).
- 51- BREMER, Linda A. y Noller, Harry F.
"Ribonucleic acid-protein cross-linking within the intact *Escherichia coli* ribosome, utilizing (...) a reversible, bifunctional reagent: identification of 308 proteins."
Biochem. 22/4310-4315 (1983).
- 52- GOLINSKA, Barbara; Millon, Régine; Backendorf, Claude; Olomucki, Martin; Ebel, Jean-Pierre y Ehresmann, Bernard.
"Identification of a 16S RNA fragment cross-linked to protein S1 within *Escherichia coli* ribosomal 30S subunits by the use of a cross-linking reagent: ethyl 4-azidobenzoylaminoacetimidate."
Eur. J. Biochem. 115/479-484 (1981).
- 53- CHIARUTTINI, Claude; Milet, Michéle; Hayes, Donald H. y Expert-Bezancon, Alain.
"Multiple crosslinks of proteins S7 and S9 to domains 3 and 4 of 16S ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30S particle."
Eur. J. Biochem. 160/363-370 (1986).
- 54- ZIMMERMANN, Robert A.; Gates, Stephen M. y Ofengand, James.
"Covalent cross-linking of transfer ribonucleic acid to the ribosomal P site. Site of reaction in 16S ribonucleic acid."
Biochem. 18/20/4333-4339 (1979).
- 55- ZAGORSKA, Ludwika; Van Duin, Jan; Noller, Harry; Pace, Bernardette; Johnson, Kimberly D. y Pace, Norman R.
"The conserved 5S rRNA complement to tRNA is not required for translation of natural mRNA."
J. Biol. Chem. 259/5/2798-2802 (March 10, 1984).
- 56- LICHUW, Toshio; Terao, Kazuo y Ogata, Kikuo.
"Ribosomal proteins cross-linked to 28S RNA and 18S RNA separated by sedimentation after ultraviolet irradiation of rat-liver ribosomes."
Eur. J. Biochem. 132/495-499 (1983).

- 57- WOWER, Iwona; Wower, Jacek; Meinke, Marlis y Brimacombe, Richard.
"The use of 2-iminothiolane as an RNA-protein cross-linking agent in *Escherichia coli* ribosomes, and the localisation on 23S RNA of sites cross-linked to proteins L4, L6, L21, L23, L27 and L29."
Nucl.Ac.Res. 9/17/4289-4302(1981).
- 58- BRANLANT, Christiane; Krol, Alain; Machatt, Ali y Ebel, Jean-Pierre.
"The secondary structure of the protein L1 binding region of 23S ribosomal RNA. Homologies with putative secondary structures on the L11 mRNA and a region of mitochondrial 16S rRNA."
Nucl.Ac.Res. 9/2/293-307(1981).
- 59- GOURSE, Richard L.; Thurlow, David L.; Gerbi, Susan A. y Zimmermann, Robert A.
"Specific binding of a prokaryotic ribosomal protein to a eukaryotic ribosomal RNA: implications for evolution and autoregulation."
PNAS 78/5/2722-2726(May, 1981).
- 60- DAISNAN-Fornier, Bertrand y Bolotin-Fukuhara, Monique.
"Mutational study of the rRNA in yeast mitochondria: functional importance of T-1696 in the large rRNA gene."
Nucl.Ac.Res. 16/19/9299-9306(1988).
- 61- COI, Robert A.; Greenwell, Philip y Hirst, William.
"Reactivation of the peptidyltransferase centre of rabbit reticulocyte ribosomes after inactivation by exposure to low concentrations of magnesium ion."
Biochem.J. 160/521-531(1976).
- 62- CHIARUTTINI, Claude; Milet, Michèle y Hayes, Donald.
"Structural differences between active and inactive 30S ribosomal subunits revealed by RNA-protein crosslinking."
FEBS Lett. 173/1/90-94 July, (1984).
- 63- MOAZED, Danesh; Van Stolk, Barbara J.; Douthwaite, Stephen y Noller, Harry F.
"Interconversion of active and inactive 30S ribosomal subunits is accompanied by a conformational change in the decoding region of 16S rRNA."
J.Mol.Biol. 191/483-493(1986).
- 64- ERICSON, Gwen y Wollenzien, Paul.
"An RNA secondary structure switch between the inactive and active conformations of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit."
J.Biol.Chem. 264/1/540-545(January 5, 1989).
- 65- MOAZED, Danesh y Noller, Harry F.
"Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes".
Cell 47/985-994(December, 1985).

- 66- BURNA, D.P.; Srivastava, A.K.; Srivastava, S.; Tewari, D.S.; Dash, D. y Sengupta, S.K.
 "Differences in physical and biological properties of 50S ribosomes and 23S RNAs derived from tight and loose couple 70S ribosomes."
 Bioch. Bioph. Res. Com. 124/3/970-978 (November 14, 1984).
- 67- BURNA, Debi P.; Srivasta, Anand K.; Srivasta, Suman y Dash, Debabrata.
 "Interconversion of tight and loose couple 50S ribosomes and translocation in protein synthesis".
 J. Biol. Chem. 260/19/10, 517-10, 525 (September 5, 1985).
- 68- STIESE, Wolfgang; Stade, Katrin; Schdler y Brimacombe, Richard.
 "Covalent cross-linking of poly(A) to *Escherichia coli* ribosomes, and localization of the cross-link site within the 16S RNA."
 Nucl. Ac. Res. 16/6/2369-2388 (1988).
- 69- ABURASHIDOVA, G.G.; Tsvetkova, E.A.; Chernyi, A.A.; Kaminir, L.B. y Burdowsky, E.I.
 "Intersubunit RNA-protein contacts in pre- and post-translocated *E. coli* ribosome."
 FEBS Lett. 185/2/291-294 (June, 1985).
- 70- VAN den Eynde, Hilde y De Wachter, Rupert.
 "Variable base pairing in a helix of eubacterial 5S ribosomal RNA points to the existence of a conformational switch."
 FEBS Lett. 217/2/191-196 (June, 1987).
- 71- POH, Cynthia L. y Gualerzi, Claudio.
 "The role of 16S RNA in ribosomal binding of IF-3."
 Biochem. 15/4/804-811 (1976).
- 72- POH, Cynthia L.; Brimacombe, Richard y Gualerzi, Claudio.
 "Cross-linking of *Escherichia coli* initiation factor IF-3 to the RNA moiety of the 30S ribosomal subunit."
 Biochem. 16/26/5681-5686 (1977).
- 73- WICKSTROM, Eric; Hous, Hans A.; Haasnoot, Cornelis A.G. y van Knippenberg, Peter H.
 "Circular dichroism and 500-MHz proton magnetic resonance studies of the interaction of *Escherichia coli* translational initiation factor 3 protein with the 16S ribosomal RNA 3' cloacin fragment."
 Biochem. 25/2770-2777 (1986).
- 74- EHRESMANN, Chantal; Moine, Hervé; Mougel, Marylène; Dondon, Jacques; Grunberg-Manago, Marianne; Ebel, Jean-Pierre y Ehresmann, Bernard.
 "Cross-linking of initiation factor IF3 to *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit by trans-diamminedichloroplatinum(II): characterization of two cross-linking sites in 16S rRNA; a possible way of functioning for IF3."
 Nucl. Ac. Res. 14/12/4803-4821 (1986).

- 75- NYGARD, Odd y Westermann, Peter.
"Specific interaction of one subunit of eukaryotic initiation factor eIF-3 with 18S ribosomal RNA within the binary complex, eIF-3-small ribosomal subunit, as shown by cross-linking experiments."
Nucl.Ac.Res. 10/4/1327-1334(1982).
- 76- WESTERMANN, P.; Sohi, M.K. y Arnstein, H.R.V.
"The 66kDa component of eukaryotic initiation factor 3 interacts with globin mRNA and 18S-RNA in preinitiation complexes."
FEBS Lett. 205/2/171-174(september, 1986).
- 77- WESTERMANN, Peter; Nygard, Odd y Bielka, Heinz.
"The α and τ subunits of initiation factor eIF-2 can be cross-linked to 18S ribosomal RNA within the quaternary initiation complex, eIF-2-Met-tRNA^f-GDPCP-small ribosomal subunit."
Nucl.Ac.Res. 8/14/3065-3071(1980).
- 78- SHINE, J. and Dalgarno, L.
"The 3' sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites."
PNAS 71/4/1342/1346 (April, 1974)
- 79- STEITZ, Joan Argetsinger y Jakes, Karen.
"How ribosomes select initiator regions in mRNA; base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*."
PNAS 72/12/4734-4738(December, 1975).
- 80- TANIGUCHI, Tadatsugu y Weissmann, Charles.
"Inhibition of 30S ribosome initiation complex formation by an oligonucleotide complementary to the 3' terminal region of *E. coli* 16S ribosomal RNA."
Nature 275/770-772(October 26, 1976).
- 81- ECKHARDT, Hartmut y Lührmann, Reinhard.
"Blocking of the initiation of protein synthesis by a pentanucleotide complementary to the 3' end of *Escherichia coli* 16S RNA."
J.Biol.Chem. 254/22/1185-1188(November 25, 1979).
- 82- BACKENDORF, Claude; Overbeek, Gerrit P.; VanBoom, Jacques H.; Van der Marel, Gijb; Veeneman, Gerrit y Van Duin, Jan.
"Role of 16-S RNA in ribosome messenger recognition."
Eur.J.Biochem. 110/599-604(1980).
- 83- HUI, Anna y de Boer, Herman A.
"Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*."
PNAS 84/4762-4766(July, 1987).

- 84- VAN DUIN, Jan; Ravensbergen, Cees J.C. y Doornbos, Joost.
"Basepairing of oligonucleotides to the 3' end of 16S ribosomal RNA is not stabilized by ribosomal proteins."
Nucl.Ac.Res. 12/12/5079-5086 (1984).
- 85- OAKES, M.; Scheinman, A.; Rivera, M.; Soufer, D. Shankweiler, G. y Lake, J.
"Evolving ribosome structure and functions: rRNA and the translation mechanism".
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 52/675-685 (1987).
- 86- VAN DUIN, Jan; Overbeek, Gerrit P. y Backendorf, Claude.
"Functional recognition of phage RNA by 30S ribosomal subunits in the absence of initiator tRNA."
Eur.J.Biochem. 110/593/597 (1980).
- 87- BACKENDORF, C.; Ravensbergen, C.J.C.; Van der Plas, J.; van Boom, J.H.; Veeneman, G. y Van Duin, J.
"Basepairing potential of the 3' terminus of 16S RNA: dependence on the functional state of the 30S subunit and the presence of protein B21."
Nucl.Ac.Res. 9/6/1425-1444 (1981).
- 88- ZAGORSKA, L.; Szkopinska, A.; Klita, S. y Szafranski, P.
"Effect of removal of 160 nucleotides from the 3' end of Escherichia coli 16S rRNA on the reconstitution and activity of 30S ribosomes."
Bioch.Bioph.Res.Com. 95/3/1152-1559 (August 14, 1980).
- 89- EMRANIAN, M.B.
"How bacterial ribosomes select translation initiation sites."
J.Theor.Biol. 84/103-118 (1980).
- 90- NAKASHIMA, Kunio; Darzynkiewicz, Edward y Shatkin, Aaron J.
"Proximity of mRNAs 5'-region and 18S rRNA in eukaryotic initiation complexes."
Nature 286/226-230 (July 17, 1980).
- 91- YOKOE, Seiichi; Tanaka, Minoru; Hibasami, Hiroshige; Nagai, Jun y Nakashima, Kunio.
"Cross-linking of tobacco RNA and capped polyribonucleotides to 18S rRNA in wheat germ ribosome-mRNA complexes."
J.Biochem. 94/803-1808 (1983).
- 92- CLEAN, Mark A. y Donahue, Thomas F.
"Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast - a review."
Gene 59/1-18 (1987).
- 93- MAROUN, Leonard E.; Degner, Mary Kay; Precup, James W. y Franciskovich, Phillip P.
"Eukaryotic mRNA 5'-leader sequences have dual regions of complementarity to the 3'-terminus of 18S rRNA."
J.Theor.Biol. 120/85-98 (1986).

- 94- BAER, Richard y Dubin, Donald T.
"The 3'-terminal sequence of the small subunit ribosomal RNA from hamster mitochondria."
Nucl.Ac.Res. 8/21/4927-4941(1980).
- 95- ERNI, Bernhard y Staehelin, Theophil.
"Base-pair formation between 18S ribosomal RNA and globin mRNA during initiation of protein synthesis *in vitro*."
FEBS Lett. 148/1/79-82(november, 1982).
- 96- THOMAS, N. Shaun B. y Arnstein, Henry R.V.
"Formation of a 22S mRNA-rRNA-protein complex during translation of globin messenger RNA."
Eur.J.Biochem. 143/27-33(1984).
- 97- MOTOJIMA, Kiyoto y Oka, Takami.
"5'-terminal sequence of the mRNA of mouse whey acidic protein contains three possible sites of interaction with 18S rRNA."
Bioch.Bioph.Res.Com. 116/1/167-172(october 14, 1983).
- 98- SHATKIN, A.J.
Cell 9/645-653 (1976).
(Referencia 6, citada en ref. 96).
- 99- BRANAN, David R.; Gregory, Stephen P. y Butterworth, Peter H.W.
"A possible novel interaction between the 3' end of 18S ribosomal RNA and the 5' leader sequence of many eukaryotic messenger RNAs."
FEBS Lett. 147/2/133-136 (october, 1982).
- 100- PETERSEN, G.B.; Stockwell, P.A. y Hill, D.F.
"Messenger RNA recognition in *Escherichia coli* a possible second site of interaction with 16S ribosomal RNA."
EMBO J. 7/12/3957-3962 (1988).
- 101- JAIN, Swatantra K.; Crampton, J.; González, I.L.; Schmickel, R.D. y Drysdale, J.W.
"Complementarity between ferritin H mRNA and 28S ribosomal RNA."
Bioch.Bioph.Res.Com. 1312/863-867(september 16, 1985).
- 102- SAHNER, Melvin y Shane, Sara.
"Area of 16S ribonucleic acid at or near the interface between 30S and 50S ribosomes of *Escherichia coli*."
J.Bacteriol. 130/2/900-910(May, 1977).
- 103- HERR, Winship y Noller, Harry F.
"Protection of specific sites in 23S and 5S RNA from chemical modification by association of 30S and 50S ribosomes."
J.Mol.Biol. 130/421-432(1979).
- 104- BRON, David A. y Noller, Harry F.
"Protection of ribosomal RNA from kethoxal in polyribosomes. Implication of specific sites in ribosome function."
J.Mol.Biol. 163/1/27-46 (1983).

- 105- BURMA, D.P.; Nag, B. y Tewari, D.S.
"Association of 16S and 23S ribosomal RNAs to form a bimolecular complex."
PNAS 80/4875-4878(August, 1983).
- 106- TAPPRICH, William E. e Hill, Walter E.
"Involvement of bases 787-795 of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA in ribosomal subunit association."
PNAS 83/556-560(February, 1986).
- 107- ROTHMANN, Norbert; Kleuvers, Barbara; Atmajda, Johannes y Wagner, Rolf.
"Mutants with base changes at the 3'-end of the 16S RNA from *Escherichia coli*. Construction, expression and functional analysis."
Eur. J. Biochem. 177/81-90(1988).
- 108- SELIVANOVA, O.M.; Gongadze, G.M.; Gudkov, A.T. y Vasiliev, V.D.
"Structure of protein-deficient 50S ribosomal subunits. Particles without 5S RNA-protein complex retain the L7/L12 stalk and associate with 30S subunits."
FEBS Lett. 197/1,2/79-83(March, 1986).
- 109- GIRSHOVICH, A.S.; Bochkareva, E.S. y Gudkov, A.T.
"Specific interaction of the elongation factor EF-G with the ribosomal 23S RNA from *Escherichia coli*".
FEBS Lett. 150/1/99-102 (December, 1982).
- 110- BOCHKAREVA, E.S. y Girshovich, A.S.
"Elongation factor G protects a nuclease-sensitive site of 23S RNA within the ribosome".
FEBS Lett. 171/2/202-206 (June, 1984).
- 111- SKOLD, Sven-Erik.
"Chemical crosslinking of elongation factor G to the 23S RNA in 70S ribosomes from *Escherichia coli*".
Nucl. Ac. Res. 11/14/4923-4932(1983).
- 112- MOAZED, Danesh; Robertson, James M. y Noller, Harry F.
"Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA".
Nature 334/6180/362-364 (July 28, 1988).
- 113- BLANC, Hugues; Adams, Camellia W. y Wallace, Douglas C.
"Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance in two human cell lines."
Nucl. Ac. Res. 9/21/5785-5795(1981).
- 114- THOMPSON, Jill; Schmidt, Frank y Cundliffe, Eric.
"Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring resistance to tiorstrepton."
J. Biol. Chem. 257/14/7915-7017(July 25, 1982).

- 115- SLOBIN, Lawrence I.
 "Binding of eukaryotic elongation factor Tu to nucleic acids".
 J.Biol.Chem. 258/8/4895-4900 (April 25, 1983).
- 116- NYGÅRD, Odd y Nilsson, Lars.
 "The ribosomal binding site for eukaryotic elongation factor EF-2 contains 5S ribosomal RNA."
 Bioch.Bioph.Acta. 908/46/53(1987)
- 117- NYGÅRD, Odd; Nilsson, Lars y Westermann, Peter.
 "Characterisation of the ribosomal binding site for eukaryotic elongation factor 2 by chemical cross-linking."
 Bioch.Bioph.Acta. 910/245/253(1987)
- 118- CHAN, Yuen-Ling; Ulbrich, Norbert; Ackerman, Eric J.; Todokoro, Kazuo; Slobin, Lawrence I.; Safer, Brian; Singler, Paul y Wool, Ira G.
 "The binding of transfer ribonucleic acids to 5S and 5.8S eukaryotic ribosomal ribonucleic acid-protein complexes".
 J.Biol.Chem. 257/5/2522-2527 (March 10, 1982).
- 119- OFENGAND, James; Liou, Richard; Kohut III, John; Schwartz, Ira y Zimmermann, Robert A.
 "Covalent cross-linking of transfer ribonucleic acid to the ribosomal P site. Mechanism and site of reaction in transfer ribonucleic acid".
 Biochemistry 18/20/4322-4332 (1979).
- 120- GONICKI, Piotr; Ciesiolka, Jerzy y Ofengand, James.
 "Cross-linking of the anticodon of P and A site bound tRNAs to the ribosome via aromatic azides of variable lengths: involvement of 16S RNA at the A site".
 Biochem. 24/18/4924-4930 (1985).
- 121- PRINCE, Jeffrey B.; Hixson, Stephen S. y Zimmermann, Robert A.
 "Photochemical cross-linking of tRNA^{Leu} and tRNA²⁹¹⁰ to 16S RNA at the P site of *Escherichia coli* ribosomes".
 J.Biol.Chem. 254/11/4745-4749 (June 10, 1979).
- 121- TAYLOR, Brian H.; Prince, Jeffrey B.; Ofengand, James y Zimmermann, Robert A.
 "Nonanucleotide sequence from 16S ribonucleic acid at the peptidyl transfer ribonucleic acid binding site of the *Escherichia coli* ribosome".
 Biochem. 20/26/7581/7588 (1981).
- 123- PRINCE, Jeffrey B.; Taylor, Brian H.; Thurlow, David L.; Ofengand, James y Zimmermann, Robert A.
 "Covalent crosslinking of tRNA^{Val} to 16S RNA at the ribosomal P site: identification of crosslinked residues."
 PNAS 79/5450-5454 (September, 1982).

- 124- OFENGAND, James y Liou, Richard.
"Evidence for pyrimidine-pyrimidine cyclobutanedimer formation in the covalent cross-linking between transfer ribonucleic acid and 16S ribonucleic acid at the ribosomal P site".
Biochem. 19/21/4814-4822 (1980).
- 125- OFENGAND, James; Gornicki, Piotr; Chakraborty, Kalpana y Nurse, Kelvin.
"Functional conservation near the 3' end of eukaryotic small subunit RNA: Photochemical crosslinking of P site-bound acetylvalyl-tRNA to 18S RNA of yeast ribosomes."
PNAS 79/2817-2821 (May, 1982).
- 126- CIESTOLKA, Jerzy; Gornicki, Piotr y Ofengand, James.
"Identification of the site of cross-linking in 16S rRNA of an aromatic azide photoaffinity probe attached to the 5'-anticodon base of A site bound tRNA".
Biochem. 24/18/4931-4938 (1985).
- 127- DENMAN, Robert; Colgan, John; Nurse, Kelvin y Ofengand, James.
"Crosslinking of the anticodon of P site bound tRNA to C-1400 of E. coli 16S RNA does not require the participation of the 50S subunit."
Nucl. Ac. Res. 16/1/165-178 (1988).
- 128- THOMAS, Cheryl L.; Gregory, Richard J.; Winslow, Gary; Muto, Akira y Zimmermann, Robert A.
"Mutations within the decoding site of *Escherichia coli* 16S rRNA: growth rate impairment, lethality and intragenic suppression."
Nucl. Ac. Res. 16/16/8129-8146 (1988).
- 129- NOLLER, H.F. y Chaires, J.B.
PNAS 69/3115-3118 (1972) (citado en ref. 127).
- 130- MDAZED, Danesh y Noller, Harry F.
"Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA."
Nature 327/389-394 June 4, (1987).
- 131- PESTKA, Sidney.
"Inhibitors of ribosome functions."
Ann. Rev. Microbiol. 25/487-562 (1971).
- 132- BOERN, Siegfried.
"Similarities between a predicted secondary structure for the M1 RNA ribozyme and the tRNA binding center of 16S rRNA from E. COLI."
FEBS Lett. 220/2/283-287 (August, 1987).
- 133- KRZYWOSIĄK, W.; Denman, R.; Nurse, K.; Hellman, W.; Boublik, M.; Gehrke, C.W.; Agris, P.F. y Ofengand, J.
"In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome."
Biochem. 26/2353-2364 (1987)

- 134- ENDO, Yaeta y Wool, Ira G.
"The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the α -sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 257/15/9054-9060 (August 10, 1982).
- 135- ENDO, Yaeta; Tsurugi, Kunio; Yutsudo, Takashi; Takeda, Yoshifumi; Ogasawara, Toshihiro y Igarashi, Kazuei.
"Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins."
Eur. J. Biochem. 171/45-50 (1988).
- 136- ENDO, Yaeta; Tsurugi, Kunio y Lambert, John M.
"The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins."
Bioch. Bioph. Res. Com. 150/3/1032-1036 February 15, (1988).
- 137- STIRPE, Fiorenzo; Bailey, Suzanne; Miller, Stephen P. y Bodley, James W.
"Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants."
Nucl. Ac. Res. 16/4/1349-1357 (1988).
- 138- KEARSEY, Stephen y Craig, Ian W.
"Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance."
Nature 290/607-608 (April 16, 1981).
- 139- BLANC, Hugues; Wright, Catharine T.; Bibb, Maureen J.; Wallace, Douglas C. y Clayton, David A.
"Mitochondrial DNA of chloramphenicol-resistant mouse cells contains a single nucleotide change in the region encoding the 3' end of the larger ribosomal RNA."
PNAS 78/6/3789-3793 (June, 1981).
- 140- SAARNA, Mart; Metspalu, Andres; Villems, Richard; Ord, Tõnis y Toots, Indrek.
"5S RNA and 5.8S RNA build up eukaryotic subribosomal domains active in tRNA binding."
FEBS Lett. 136/2/255-258 (December, 1981).
- 141- EICHMANN, V. A.
Nucl. Ac. Res. 5/1-14 (1978) y 6/29-44 (1979)
(Referencias 18 y 19, citadas en ref. 18).
- 142- PACE, Bernardette; Matthews, Elizabeth A.; Johnson, Kimbely D.; Cantor, Charles R. y Pace, Norman R.
"Conserved 5S rRNA complement to tRNA is not required for protein synthesis."
PNAS 79/1/36-40 (January, 1982).

- 143- ERDMANN, V.A. et al.
Biochem.Biophys.Res.Com. 54/942-948, (1973):
- 144- HAMPL, Hartmut; Schulze, Hartmut y Nierhaus, Knud H.
"Ribosomal components from *Escherichia Coli* 50S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity".
J.Biol.Chem. 256/5/2284-2288 (March 10, 1981).
- 145- LORENZ, Siegfried; Hartmann, Roland K.; Piel, Norbert; Ulbrich, Norbert y Erdmann, Volker A.
"Structural analysis of 5S rRNA, 5S rRNA-protein complexes and ribosomes employing RNase H and d(GTTCGG)".
Eur.J.Biochem. 163/239-246 (1987).
- 146- GARRET, R.A. y Woolley Paul.
"Identifying the peptidyltransferase centre."
TIBS 7/11/385-386 (November, 1982).
- 147- GREENWELL, Philip; Harris, Raymond J. y Symons, Robert H.
"Affinity labelling of 23S ribosomal RNA in the active centre of *ESCHERICHIA COLI* peptidyltransferase."
Eur.J.Biochem. 49/539-554 (1974).
- 148- HALL, Clifford C.; Johnson, Deanna y Cooperman, Barry S.
"i³²H₂-p-Azidopuromycin photoaffinity labelling of *Escherichia coli* ribosomes: evidence for site-specific interaction at U-2504 and G-2502 in domain V of 23S ribosomal RNA."
Biochem. 27/3983-3990 (1988).
- 149- BARTA, Andrea y Kuechler, Ernst.
"Part of the 23S RNA located in the 11S fragment is a constituent of the ribosomal peptidyltransferase centre".
FEBS Lett. 163/2/319-323 (November, 1983).
- 149- STEINER, Guenter; Kuechler, Ernst y Barta, Andrea.
"Photo-affinity labelling at the peptidyltransferase centre reveals two different positions for the A- and P-sites in domain V of 23S rRNA."
EMBO J. 7/12/3949-3955 (1988).
- 150- BARTA, Andrea; Steiner, Guenter; Broisius, Jürgen; Noller, Harry F. y Kuechler, Ernst.
"Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center".
PNAS 81/12/3607-36011 (June, 1984).
- 151- HALL, Clifford C.; Smith, Joseph E. y Cooperman, Barry S.
"Mapping labeled sites in *Escherichia Coli* ribosomal RNA: distribution of methyl groups and identification of a photoaffinity-labelled RNA region putatively at the peptidyltransferase center".
Biochem. 24/21/5702-5711 (1985).

- 152- **SOR**, Frédéric and Fukuhara, Hiroshi.
"Identification of two erythromycin resistance mutations in the mitochondrial gene coding for the large ribosomal RNA in yeast."
Nucl. Ac. Res. 10/21/6571-6577 (1982).
- 153- **SOR**, Frédéric y Fukuhara, Hiroshi.
"Erythromycin and spiramycin resistance mutations of yeast mitochondria: nature of the rib2 locus in the large ribosomal RNA gene."
Nucl. Ac. Res. 12/22/8313-8318 (1984).
- 154- **SKINNER**, Richard; Cundliffe, Eric y Schmidt, Francis J.
"Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics."
J. Biol. Chem. 258/20/12702-12706 (October 25, 1983).
- 155- **ETTAYEBI**, Mohamed; Prasad, Susan M. y Morgan, Edward A.
"Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*."
J. Bacteriol. 162/2/551-557 (May, 1985).
- 155- **GAUTHIER**, Antonin; Turmel, Monique y Lemieux, Claude.
"Mapping of chloroplast mutations conferring resistance to antibiotics in *Chlamydomonas*: Evidence for a novel site of streptomycin resistance in the small subunit rRNA."
Mol. Gen. Genet. 214/192-197 (1988).
- 156- **MURREL**, Heidi y Böck, August.
"23S ribosomal RNA mutations in halobacteria conferring resistance to the anti-BOS ribosome targeted antibiotic anisomycin."
Nucl. Ac. Res. 15/6/2431-2443 (1987).
- 157- **DOUTHWAITE**, Stephen; Prince, Jeffrey B. y Noller, Harry F.
"Evidence for functional interaction between domains II and V of 23S ribosomal RNA from an erythromycin-resistant mutant."
PNAS 82/8330-8334 (December, 1985).
- 158- **GARRET** Roger.
"Antibiotics and active ribosomal RNA sites."
TIBS 8/6/189-190 (June, 1983).
- 159- **VESTER**, Birte y Garret, Roger A.
"The importance of highly conserved nucleotides in the binding region of chloramphenicol at the peptidyl transfer centre of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA."
EMBO J. 7/11/3577-3587 (1988).
- 160- **KRYATEVSKY**, Alexander y Kukhanova, Marina K.
"The peptidyl transferase center of ribosomes."
P. Nucl. Ac. Res. Mol. B. 23/1-51 (1979).

- 161- SPANGLER, Elizabeth A. y Blackburn, Elizabeth H.
 "The nucleotide sequence of the 17S ribosomal rRNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of the point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin."
 J. Biol. Chem. 260/10/6334-6340 (May 25, 1985).
- 162- MONTANDON, P.E.; Wagner, R. y Stutz, E.
 "E. coli ribosomes with a C912 to U base change in the 16S rRNA are streptomycin resistant."
 EMBO J. 5/13/3705-3708 (1986).
- 163- ETZOLD, Thure; Fritz, Christian C.; Schell, Jozef, y Schreier, Peter H.
 "A point mutation in the chloroplast 16S rRNA gene of a streptomycin resistant *Nicotiana tabacum*."
 FEBS Lett. 219/2/343-346 July, 1987.
- 164- TRIFONOV, E.N.
 "Translation framing code and frame-monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16S rRNA nucleotide sequences."
 J. Mol. Biol. 194/643-652 (1987).
- 165- WEISS-Brummer, Brigitte; Sakai, Hajime y Kaudewitz, Fritz.
 "A mitochondrial frameshift-suppressor (+1) of the yeast *S. cerevisiae* maps in the mitochondrial 15S rRNA locus."
 Curr. Genet. 1/295-301 (1987).
- 166- WEISS-BRUNNER, Brigitte; Sakai, Hajime y Magerl-Brenner, Monika.
 "At least two nuclear-encoded factors are involved together with a mitochondrial factor (MF1) in spontaneous mitochondrial frameshift-suppression of the yeast *S. cerevisiae*."
 Curr. Genet. 12/387-390 (1987).
- 167- FROMM, Hillel; Galun, Esra y Edelman, Marvin.
 "A novel site for streptomycin resistance in the "530 loop" of chloroplast 16S ribosomal RNA".
 Plant Molecular Biology 12/499-505 (1989).
- 168- MURGOLA, Emanuel J.; Hijazi, Kathryn A.; Göringer, H. Ulrich y Dahlberg, Albert E.
 "Mutant 16S ribosomal RNA: a codon-specific translational suppressor."
 PNAS 85/4162-4165 (June, 1988).
- 169- PORITI, Mark A; Strub, Katharina y Walter, Peter.
 "Human SRP RNA and E. coli 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain."
 Cell 55/1/4-6 (October 7, 1988).
- 170- BOEHM, Siegfried.
 "A 5S rRNA-like secondary structure in the 7SL RNA may define a ribosomal binding site of the signal recognition particle".
 FEBS Lett. 212/1/15-20 (February, 1987).

- 171- TEWARI, D.S. y Burma, D.P.
"Incorporation of 5S RNA into 16S-23S RNA complex. "
Bioch.Bioph.Res.Com. 114/1/348-354(July 18, 1983).
- 172- BURMA, Debi P.; Tewari, D.S y Srivastava, A.K.
"Ribosomal activity of the 16S-23S RNA complex."
Arch.Biochem.Biophys. 239/2/427-435 (June, 1985).
- 173- EIC. Umberto.
1987 "Cómo se hace una tesis. Técnicas y procedimientos
de investigación, estudio y escritura".
Gedisa, México. 1982 (1ª edición)
1984 (6ª edición)
1987 (4ªreimpresión)
267 págs.