

Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica



Ésta obra está bajo una [Licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/)

Patricia Julián Vallejo

Tesis Doctoral

Derio, octubre 2010



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica

Memoria presentada por
Patricia Julián Vallejo
para optar al grado de Doctor

Trabajo dirigido por:
Mikel Valle Rodríguez

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el programa ETORTEK (2007/2009) del Departamento de Industria, Innovación, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco y gracias a una beca predoctoral concedida por el CICbioGUNE. La beca para realizar la estancia en Instituto MaxPlanck de biofísica (Gottingen, Alemania) fue concedida por la EMBO.



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Mikel Valle y a todo su grupo; Melisa Lázaro, Gorka Lasso, David Gil y Xabier Aguirrezabala, por la ayuda y apoyo que he recibido durante estos años. A el grupo de Marina V. Rodnina del Instituto Max Planck de Biofísica, especialmente a Phol Milon y Andrey L. Konevega por la preparación de los complejos ribosomales. A Sjors Scheres por su ayuda con el programa XMIPP de clasificación y al centro nacional de supercomputación. Por último, a todo el personal de CICbioGUNE, companer@s y amig@s, gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos v

Capítulo 1. Introducción 1

1.1	Ribosomas y síntesis de proteínas	3
1.2	Estructura del ribosoma procariota	5
1.2.1	Estructura general del ribosoma procariota	7
1.2.2	Estructura atómica del ribosoma procariota	9
1.2.2.1	Estructura atómica de la subunidad 30S	9
1.2.2.2	Estructura atómica de la subunidad 50S	12
1.3	Traducción	14
1.3.1	Regulación de la traducción	17
1.3.2	Etapas de la traducción	18
1.3.2.1	Iniciación	18
1.3.2.1.1	Factor de iniciación 1	19
1.3.2.1.2	Factor de iniciación 2	20
1.3.2.1.3	Factor de iniciación 3	22
1.3.2.1.4	ARNm	25
1.3.2.1.5	ARNt iniciador	26
1.3.2.2	Elongación	27
1.3.2.2.1	Acomodación	28
1.3.2.2.2	Formación del enlace peptídico	29
1.3.2.2.3	Translocación	29
1.3.2.3	Terminación	31
1.3.2.4	Reciclaje	31
1.4	Motivación y objetivos del estudio	32
1.4.1	Complejo de iniciación	32
1.4.2	Complejo de pretranslocación	33

Capítulo 2. Materiales y Métodos 35

2.1.	Preparación de los complejos para microscopía	37
2.1.1.	Complejo de iniciación	37
2.1.2.	Complejo de pretranslocación	37
2.2.	Vitrificación	37

	Índice
2.3. Crio-microscopía electrónica	38
2.3.1. Complejo de iniciación	38
2.3.2. Complejo de pretranslocación	38
2.4. Procesamiento digital de imágenes	39
2.4.1. Corrección de la CTF	39
2.4.2. Alineamiento y reconstrucción tridimensional	40
2.4.3. Clasificación	40
2.5. Modelado de IF2	41
Capítulo 3. Complejo ribosomal de iniciación 30S	43
3.1. Resultados	45
3.1.1. Clasificación y reconstrucción del complejo de iniciación 30S	45
3.1.2. Rotación de la subunidad 30S en la formación del 30SIC	48
3.1.3. Complejo IF2·fMet-ARNt ^{fMet} en el 30SIC	49
3.1.4. Localización de IF3 en el 30SIC	56
3.2. Discusión	58
3.2.1. Interacciones de IF2 sobre la subunidad ribosomal	59
3.2.2. Implicaciones del 30SIC en la formación del 70SIC	61
Capítulo 4. Complejo ribosomal de pretranslocación	65
4.1. Resultados	67
4.1.1. Reconstrucción y clasificación del complejo ribosomal de pretranslocación	67
4.1.2. El ARNt híbrido A/P	73
4.2. Discusión	75
4.2.1. ARNts híbridos asociados a cambios conformacionales en el ribosoma	76
4.2.2. Equilibrio entre estados clásicos e híbridos	77
4.2.3. Conformación híbrida intermedia en la translocación	78
Capítulo 5. Conclusiones	79
5.1. Complejo de iniciación 30S	81
5.2. Complejo de pre-translocación	81

Capítulo 6. Anexo: Purificación y preparación de los complejos **83**

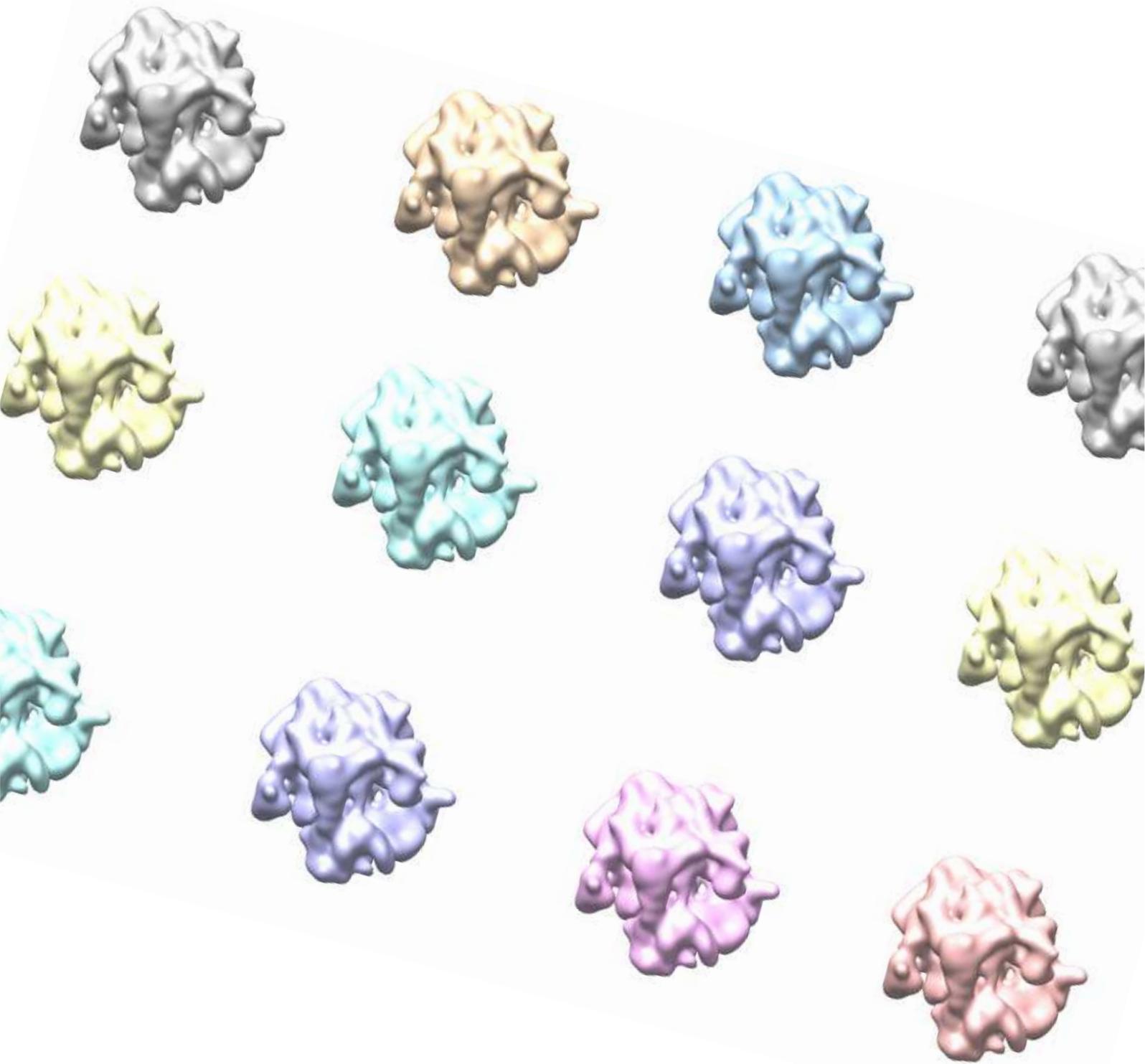
6.1. Complejo de iniciación	85
6.1.1. Tampones generales	85
6.1.2. Purificación de ribosomas 70S y subunidades 30S	85
6.1.3. Purificación de los factores de iniciación	87
6.1.3.1. Expresión de IF1, IF2 e IF3 y preparación de lisados celulares	87
6.1.3.2. Purificación de IF1 e IF3	88
6.1.3.3. Purificación de IF2	89
6.1.3.4. Purificación de fMet-ARNt ^{fMet}	89
6.1.3.5. Purificación de ARNm 002	91
6.2. Complejo de pretranslocación	91
6.2.1. Purificación de los componentes del complejo	91
6.2.2. Formación del complejo	91

Bibliografía **93**

Publicaciones **109**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
CCD	Charged Coupled Device
Crio-ME	Criomicroscopía electrónica
GDP	Guanosin-5'-difosfato
GTP	Guanosin-5'-trifosfato
IF1	Factor de iniciación 1
IF2	Factor de iniciación 2
IF3	Factor de iniciación 3
EF-Tu	Factor de proliferación Tu
EF-G	Factor de proliferación G
RMN	Resonancia magnética nuclear
RF1	Factor de terminación o liberación 1
RF2	Factor de terminación o liberación 2
RF3	Factor de terminación o liberación 3
RRF	Factor de reciclaje
SD	Shine-Dalgarno
2D	Bi-dimensional



Capítulo 1

Introducción

1.1. RIBOSOMAS Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

El mecanismo de biosíntesis de proteínas, también denominado traducción, es uno de los procesos biológicos más complejos en el que participan un número elevado de enzimas y macromoléculas. En las células eucariotas participan más de 70 proteínas ribosomales diferentes en la síntesis de proteínas; se necesitan 20 o más enzimas para activar los aminoácidos precursores; se requiere una docena de enzimas auxiliares y de otros factores proteicos específicos para la iniciación, la elongación y la terminación de los polipéptidos; y, probablemente, son necesarios 100 o más enzimas adicionales para llevar a cabo el procesamiento final de las diferentes clases de proteínas. Además, deben incluirse, también, 70 o más moléculas distintas de ARNs ribosomales (ARNr) y de transferencia (ARNt). Por lo tanto, en la síntesis de proteínas, colaboran casi 300 macromoléculas diferentes. Por otra parte, muchas de estas moléculas están organizadas en una compleja estructura tridimensional de ARN y proteína llamada ribosoma, con el fin de llevar a cabo paso a paso la transposición del ARN mensajero (ARNm) a medida que se va construyendo el polipéptido. De hecho, si los numerosos componentes que participan en la traducción del ARNm tuvieran que interactuar en solución libre, la probabilidad de que ocurrieran interacciones entre los componentes sería tan pequeña que la velocidad de polimerización de aminoácidos sería muy baja. Por lo tanto, la eficiencia de traducción se incrementa mucho por la unión del ARNm y los aminoacil-ARNt individuales al complejo de ARN y proteína más abundante de la célula, el ribosoma.

A pesar de la gran complejidad que implica el proceso de traducción, las proteínas pueden sintetizarse a velocidades elevadas. Así, sólo se precisan unos 5 segundos para que un ribosoma de *Escherichia coli* construya una cadena polipeptídica completa que contiene 100 residuos. Por otra parte la síntesis de los millares de proteínas diferentes existentes en cada célula, está regulada de modo muy preciso, por lo que, en cualquier clase de circunstancias metabólicas, sólo se produce el número de moléculas necesario de cada una de ellas (Marzi et al., 2007). La complejidad funcional de los ribosomas está estrechamente vinculada a su complejidad estructural que se describirá posteriormente.

Históricamente, uno de los grandes logros que sentaron las bases del actual conocimiento sobre la biosíntesis de proteínas fue el descubrimiento de los ribosomas a principios de los años 50 por Paul Zamecnik y sus colaboradores del Hospital General de Massachusetts (Zamecnik et al., 1949). A partir de entonces, diferentes estudios bioquímicos realizados en los años 60 mostraban que la subunidad ribosomal 50S en *E. coli* catalizaba la formación del enlace

peptídico, mientras que la interacción entre ARNm y ARNt en la subunidad pequeña tenía como finalidad la traducción del código genético (Carbon, 1964). Durante el mismo periodo se identificaron los sitios de unión específicos de los ARNt en el ribosoma. Todos estos avances pronto condujeron al reconocimiento de las diferentes etapas en el proceso de síntesis de proteínas. Hasta aproximadamente la década de los 80, el estudio de los ribosomas y de la síntesis de proteínas fue llevado a cabo en su práctica totalidad de la mano de la biología molecular, pero a partir de ese momento, dos nuevas técnicas emergentes, la microscopía electrónica y la cristalografía de rayos X auguraban un conocimiento más amplio del ribosoma y de la síntesis proteica.

A pesar de los años de investigación con herramientas bioquímicas y biofísicas no fue hasta la aplicación de la crio-microscopía electrónica (crio-ME) y técnicas de reconstrucción tridimensional cuando se empezó a comprender la manera en la que el ribosoma interactuaba con el ARNm, ARNt y factores ribosomales. Entre las cuestiones que permanecían abiertas estaban las trayectorias del ARNm y de la cadena polipeptídica, así como las posiciones de anclaje de los factores ribosomales. Otra cuestión importante era la concerniente a los cambios conformacionales en el ribosoma para favorecer estas uniones. Un prerequisite a la hora de dar respuesta a estas cuestiones era la obtención de un mapa tridimensional en el que estos elementos estructurales pudieran ser posicionados (Frank, 2001).

Las primeras visualizaciones de ribosomas en tinción negativa mediante microscopía electrónica (Lake, 1976) mostraban poco más que una partícula dividida en dos subunidades de diferente tamaño (*Figura 1.1*).

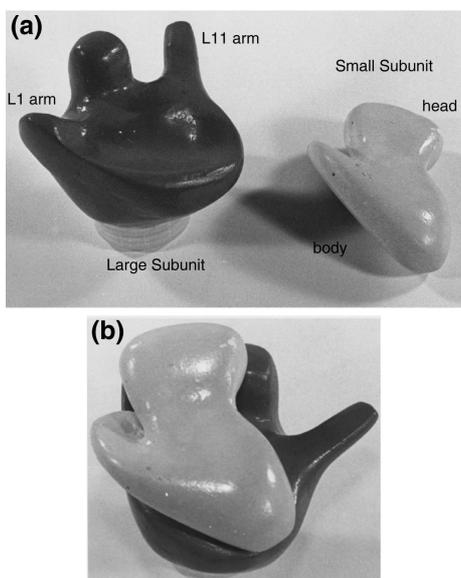


Figura 1.1. El ribosoma a baja resolución. Las fotografías realizadas por James Lake muestran modelos en plástico de las subunidades ribosomales. Los modelos han sido obtenidos a partir de imágenes de microscopía electrónica de ribosomas de *E. coli* (Lake, 1976). (a) La subunidad mayor en la izquierda y la subunidad pequeña en la derecha de la figura. (b) Disposición de las dos subunidades en un ribosoma 70S.

El primer mapa “razonable” del ribosoma a baja resolución se obtuvo mediante una combinación de las técnicas de crio-ME y reconstrucción de partículas individuales (Frank, 2001). A partir de ese momento, una constante mejora en la resolución de los mapas obtenidos mediante estas técnicas, permitió distinguir algunas de las características estructurales generales de las subunidades de ribosomas. Los estudios de crio-ME claramente contribuyeron a la comprensión de la función ribosomal al mostrar los sitios de interacción de los ARNt y factores en el ribosoma y los cambios conformacionales que sufre el ribosoma con la unión de estos factores (Gabashvili et al., 2000; Frank & Agrawal, 2000; Valle et al., 2003). En el año 2000, se obtuvieron las primeras estructuras cristalográficas para la subunidad ribosomal 30S de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* (Wimberley et al., 2000; Schluenzen et al., 2000) y la subunidad ribosomal 50S de la arqueobacteria *Haloaccula marismortui* (Ban et al., 2000). También fue construido un modelo molecular del ribosoma 70S completo de *T. thermophilus* (Yusupov et al., 2001). Con la ayuda de estas estructuras de alta resolución fue posible correlacionar las características observadas a baja resolución con hélices de ARNr y proteínas ribosomales particulares (Ramakrishnan & Moore, 2001). Además, la disponibilidad de éstas y otras estructuras de alta resolución resueltas mediante cristalografía o RMN, hacen posible la investigación más detallada de la dinámica de los ribosomas mediante su combinación con mapas de microscopía. Por otro lado, y a diferencia de las otras técnicas de biología estructural, la crio-ME permite la caracterización estructural de las macromoléculas en su estado nativo y posibilita el estudio de complejos macromoleculares demasiado grandes (como por ejemplo el ribosoma eucariota) o demasiados flexibles (proteínas L7/L12 y proteína L1). De hecho, el ribosoma en su conjunto es una estructura flexible, condición indispensable para la realización de su función.

En los siguientes apartados de la introducción, se describirá la estructura del ribosoma procariota, puesto que es el objeto de este estudio. De la misma manera se explicarán los mecanismos y las etapas involucradas en la síntesis de proteínas en procariotas.

1.2. ESTRUCTURA DEL RIBOSOMA PROCARIOTA

Los ribosomas son los enzimas más complejos y de mayores dimensiones (aproximadamente 250Å de diámetro) que existen en la naturaleza. Están compuestos, incluso en los organismos más sencillos, de más de 50 proteínas distintas y ARNs que constituyen una masa por encima de los dos millones de daltons. Los ribosomas se componen de tres (en bacterias) o cuatro (en

eucariotas) moléculas de ARNr y de tantas como 83 proteínas (*Tabla 1.1*), organizadas en una subunidad mayor y en otra menor. Las subunidades ribosomales y las moléculas de ARNr se suelen designar en unidades Svedberg (S), una medida de la velocidad de sedimentación de partículas centrifugadas en condiciones estándares, de manera que en procariotas la subunidad menor se denomina 30S y la subunidad mayor 50S. La subunidad 30S contiene una molécula única de ARNr, denominada ARNr 16S, mientras que la subunidad 50S contiene una molécula de 23S ARNr y otra 5S ARNr, La longitud de las moléculas de ARNr, la cantidad de proteínas en cada subunidad, y por consiguiente los tamaños de las subunidades son diferentes en células bacterianas y eucariotas. El ribosoma está constituido por el ensamblaje de las dos subunidades, que en eubacterias se denominan 70S y en eucariotas 80S. A pesar de que los ribosomas eucariotas contienen más componentes y son significativamente más grandes que los ribosomas procariotas, la apariencia general y el *modus operandi* es muy similar (Ramakrishnan & Moore, 2001). La preservación de la función está unida con la conservación de su estructura general, y los ribosomas de organismos filogenéticamente tan lejanos como bacterias, arqueas y eucariotas muestran un grado remarcable de parecido.

Tabla 1.1. Componentes ribosomales de los 3 dominios de vida (bacteria, arquea y eucaria) considerando su tamaño, masa y número de proteínas.

Características	Bacteria	Arquea	Eukarya
Tamaño ribosomal	70S	70S	80S
Subunidad pequeña			
Tamaño	30S	30S	40S
Masa (MDa)	0.8	0.8	1.4
ARNr	16S	16S	18S
Nº proteínas	20	28	32
Subunidad grande			
Tamaño	50S	50S	60S
Masa (MDa)	1.6	1.6	2.6
ARNr	23S, 5S	23S, 5S	28S, 5.8S, 5S
Nº proteínas	34	40	46

1.2.1. Estructura general del ribosoma procariota

En bacterias, la subunidad 50S es aproximadamente dos veces la masa de la subunidad 30S, y en ambas, aproximadamente 2/3 de su peso se debe al ARNr mientras que el resto del peso es atribuible a la parte proteica del ribosoma.

La subunidad 30S tiene una forma más o menos trapezoidal cuando se tiene una vista frontal desde la zona de interacción de subunidades (*Figura 1.2*) y es uniformemente estrecha cuando se tiene una visión lateral. En la subunidad 30S se distinguen la cabeza y cuerpo. Del cuerpo salen dos lóbulos hacia arriba, denominados “plataforma” y “espalda”. A la hendidura que se forma entre la plataforma y la cabeza se la conoce por ser el centro de decodificación.

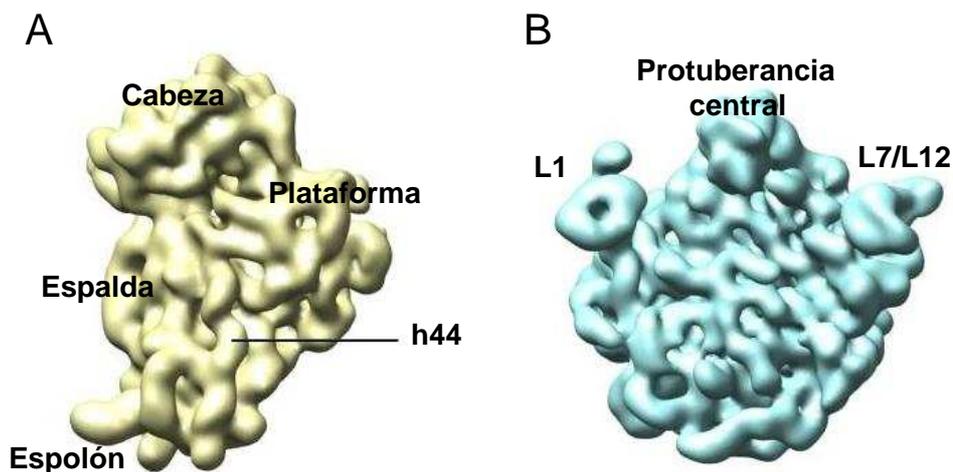


Figura 1.2. (A) Vista de la subunidad ribosomal 30S desde la zona de interacción entre subunidades. (B) Vista de la subunidad ribosomal 50S desde la zona de interacción entre subunidades.

La subunidad 50S tiene una forma aproximadamente hemisférica enfrentada a la subunidad 30S por su lado liso. Desde la región de interacción entre subunidades se distinguen 3 protuberancias: el tallo L7/L12 que se extiende a lo largo de su base, la protuberancia central y el tallo L1. El tallo L7/L12, formado por las proteínas diméricas L7/L12, a veces puede estar ausente en mapas de microscopía electrónica debido a su elevada flexibilidad. La protuberancia central está formada, en su mayor parte, por el ARNr 5S. Al contrario que el tallo L7/L12, el tallo L1 está siempre bien definido, formado por la proteína ribosomal L1 y parte del ARNr

23S.

En un ribosoma 70S, las dos subunidades se enfrentan de tal manera que se crea un espacio de morfología complejo (*Figura 1.3*): el espacio entre subunidades, por donde irán circulando los ARNt durante la traducción. El ensamblaje se mantiene mediante diversos puentes que se crean entre subunidades. Existe un total de 12 puentes entre subunidades creados por más de 30 interacciones individuales y la mayoría de ellos involucran contactos entre ARNr (Yusupov et al., 2001). Sin embargo, los puentes que se crean entre subunidades no confieren al ribosoma 70S una estructura totalmente rígida. La naturaleza dinámica del proceso de traducción implica que el ribosoma sea una estructura flexible con componentes móviles que posibiliten su función (Spirin, 1969).

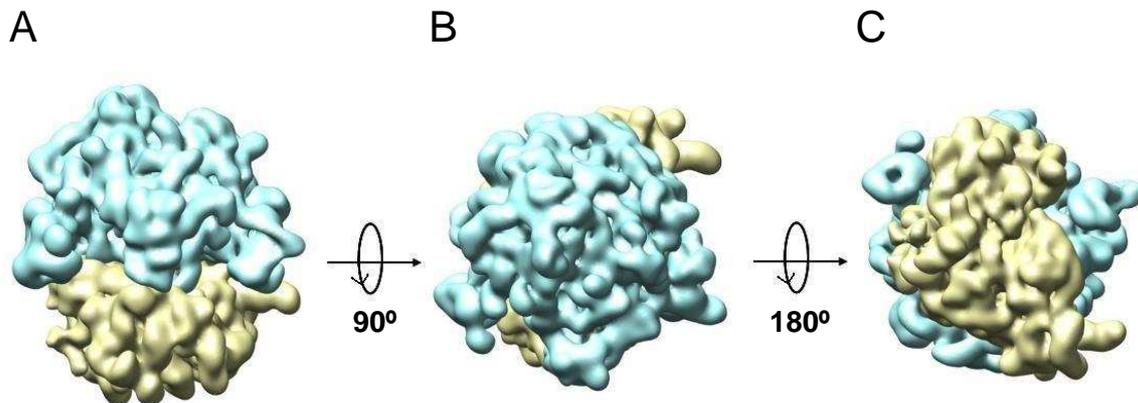


Figura 1.3. Ensamblaje de las subunidades ribosomales en un ribosoma 70S y sus diferentes vistas; (A) vista frontal, (B) vista superior desde la subunidad 50S (coloreada en azul), (C) vista inferior desde la subunidad 30S (coloreada en amarillo).

1.2.2. Estructura atómica del ribosoma procariota

Las estructuras cristalográficas de las subunidades ribosomales 30S y 50S de los organismos *T. thermophilus* y *H. matismortui* respectivamente fueron resueltas en el año 2000 (Wimberly et al., 2000; Ban et al., 2000). Un año más tarde, se presentó un modelo para la estructura atómica del ribosoma 70S en *T. thermophilus* incluyendo ARNt y ARNm a una resolución de 5.5Å.

1.2.2.1. Estructura atómica de la subunidad 30S

La morfología de la subunidad 30S queda determinada en gran medida por el componente de ARNr. De hecho, ninguna de las características esenciales de la subunidad queda determinada completamente por proteína (Wimberly et al., 2000). Desde la región de interacción entre subunidades, la estructura terciaria del 16S ARNr muestra una cabeza con un saliente apuntando hacia la izquierda, el cuerpo de la 30S con la espalda en la región superior izquierda y el espolón (spur) en la región inferior izquierda y la plataforma en la región superior derecha (*Figura 1.4 A y C*) (Yusupov et al., 2001). Diferentes dominios de ARNr conforman cada una de estas características morfológicas (*Figura 1.4 A y B*). El dominio 5' o dominio I constituye la mayor parte del cuerpo de la subunidad; el dominio central o dominio II la mayor parte de la plataforma; el dominio 3' principal o dominio III constituye la cabeza; y el dominio 3' secundario o dominio IV forma parte del cuerpo siendo una región de interacción entre las subunidades y constituyendo la hélice 44 (h44). Los cuatro dominios de estructura secundaria del 16S ARNr irradian desde el punto central en la zona del cuello, que es la región más importante de la subunidad 30S desde el punto de vista funcional.

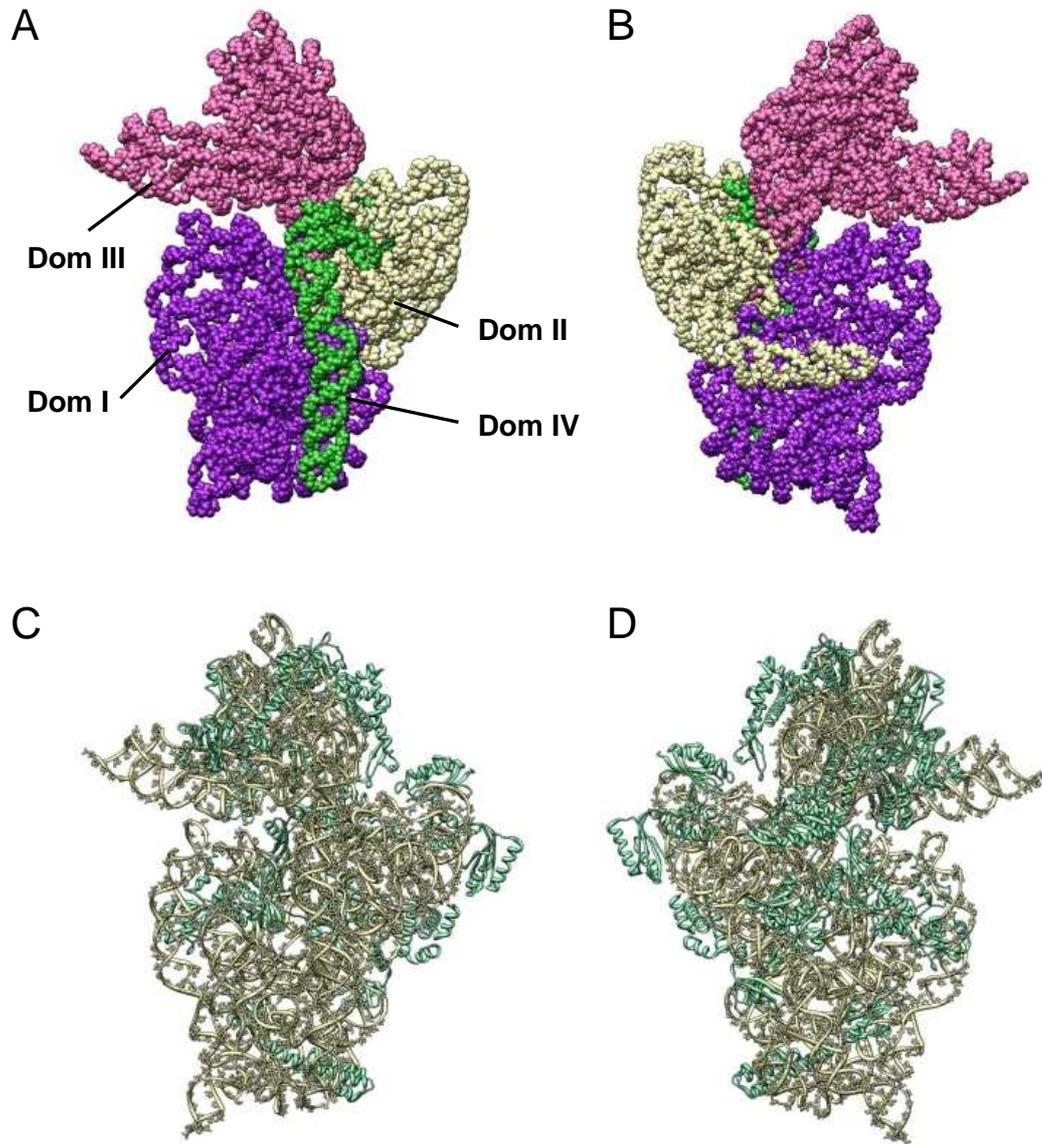


Figura 1.4. Estructura atómica de la subunidad 30S. (A) (B) Dominios de estructura secundaria del ARNr que componen la subunidad 30S. Dominio I (DomI) en violeta; Dominio II (DomII) en amarillo; Dominio III (DomIII) en rosa y Dominio IV (DomIV) en verde. A vista superior y B vista inferior. (C) (D) Constitución de ARNr y proteínas de la subunidad 30S. (C) vista superior y (D) vista inferior. Los componentes de ARNr están coloreados en amarillo y las proteínas ribosomales en verde.

La estructura secundaria del ARNr 16S contiene alrededor de 50 hélices de doble cadena conectadas mediante segmentos irregulares de cadena sencilla, así el ARNr 16S puede ser descrito como una configuración tridimensional de elementos helicoidales. El empaquetamiento de estos elementos helicoidales determina en gran medida el plegamiento de los cuatros dominios del ARNr. Los segmentos cortos de ARNr de cadena sencilla crean interacciones entre regiones distantes que estabilizan el empaquetamiento de los elementos helicoidales. Las proteínas también ayudan a estabilizar la estructura terciaria del ARNr mediante la unión a dos o más elementos helicoidales.

En cuanto a la disposición de las proteínas y del ARNr, ésta es asimétrica en la 30S, al igual que en la subunidad 50S, de manera que las proteínas están concentradas en la cara exterior de la subunidad (*Figura 1.4 C y D*) (Gao et al., 2003). Ninguna de las proteínas se encuentra unida completamente en el interior de un dominio de ARNr. La superficie de interacción con la 50S se encuentra libre de proteínas, con la excepción de S12 que está próxima al sitio de decodificación en la parte superior de la hélice 44 (Ramakrishnan & Moore, 2001). Otras proteínas ribosomales se sitúan en la periferia de la superficie de interacción permitiendo crear un contacto con la subunidad 50S.

Las proteínas generalmente contienen uno o más dominios globulares y el mismo tipo de empaquetamiento se encuentra frecuentemente en diferentes proteínas, como por ejemplo la estructura de barril β en las proteínas S12 y S17. Aparte del dominio o dominios globulares, casi todas las proteínas ribosomales contienen largas extensiones que establecen contactos íntimos con el ARNr y que generalmente, no son visibles en estructuras aisladas porque se encuentran desordenados en ausencia de ARNr. Las extensiones de las proteínas ribosomales se insertan profundamente dentro de la estructura de ARNr, lo que probablemente resulta importante para la estabilización de la estructura terciaria del ARNr. Además, muchas de las proteínas mantienen contactos con elementos de ARNr que pertenecen a dominios distintos, lo que favorece la ordenación de la estructura global de la subunidad. De hecho, muchos de los contactos entre la cabeza y el cuerpo están mediados por proteínas, como S2 y S5. Las extensiones tienen las características apropiadas para realizar tal función, ya que son estrechas, permitiendo su inserción entre diferentes elementos de ARNr y contienen los residuos básicos necesarios para neutralizar la repulsión por cargas del ARNr (Wimberly et al., 2000)

Además de los contactos entre proteínas y ARNr, se han descrito varias interacciones proteína-proteína. S3, S10 y S14 forman un grupo que se mantiene unido mediante interacciones

hidrofóbicas. Contrariamente, otros grupos de proteínas, como el compuesto por S4, S5 y S8 se mantienen unidos predominantemente mediante interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno.

1.2.2.2. Estructura atómica de la subunidad 50S

La estructura secundaria de el ARNr 23S se divide en seis dominios diferentes, cada uno de los cuales tiene una estructura terciaria muy asimétrica (*Figura 1.5 A y B*). Los seis dominios se conforman una masa compacta de ARN y aparentemente no hay señal de división de la estructura en sus dominios diferenciados. Esto se debe en parte a que no posee subdominios estructurales evidentes.

En cuanto a la arquitectura del ARNr, todos los seis dominios del ARNr 23S y el ARNr 5S tienen configuraciones complejas que se ajustan de manera adecuada para originar una masa compacta y única de ARN. Por lo tanto, a pesar de la organización del ARNr a un nivel de estructura secundaria, en su organización tridimensional, la subunidad 50S es un único dominio de dimensiones elevadas. En este aspecto la 50S es bastante diferente a la 30S, en la que cada uno de sus cuatro dominios estructurales pueden ser diferenciados (Ban et al., 2000).

Algunos de los dominios que conforman la 50S contienen motivos estructurales dignos de mencionar por su repercusión en su estructura y función. El Dominio II es el mayor de los seis dominios del ARNr 23S que explica la mayor parte de la región posterior de la partícula. Uno de sus componentes es el segmento de ARNr del tallo L7/L12, que es conocido por su interacción con factores de elongación. Componentes con un alto grado de flexibilidad, como es el ejemplo del tallo L7/L12, no suelen aparecer en las estructuras cristalográficas, ya que se trata de elementos desordenados. El dominio V, se conoce por estar implicado en la actividad peptidil-tranferasa. El dominio más pequeño del ARNr 23S, el dominio VI que contiene la región diana para toxinas sarcina-ricina, es esencial para la unión de factores proteicos al ribosoma.

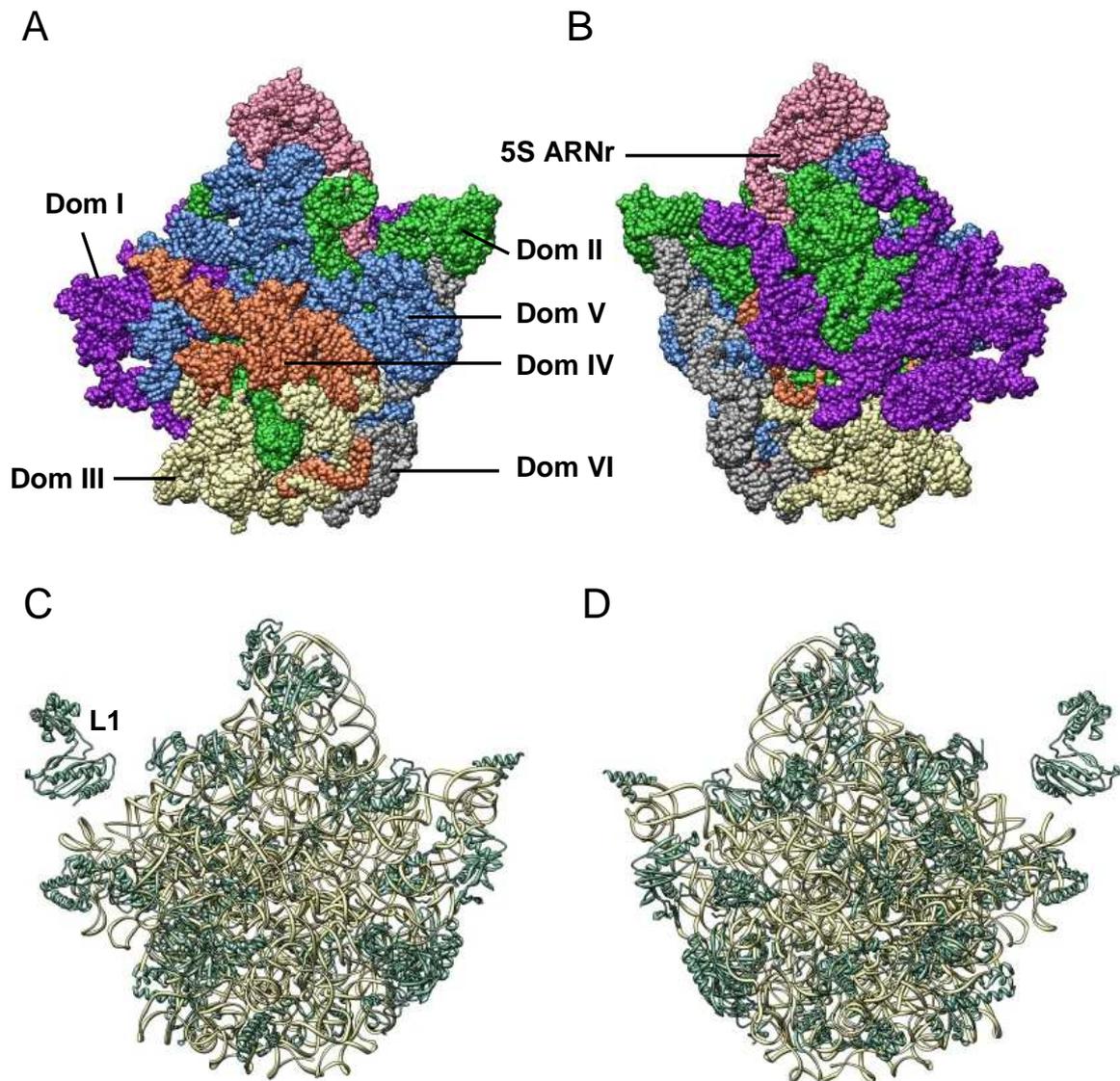


Figura 1.5. Estructura atómica de la subunidad 50S. (A) (B) Dominios de estructura secundaria del ARNr que componen la subunidad 30S. En el ARNr 23 S distinguimos: Dominio I (DomI) en violeta; Dominio II (DomII) en verde; Dominio III (DomIII) en amarillo; y Dominio IV (DomIV) en salmón; DominioV (DomV) en azul; Dominio VI (DomVI) en gris. El ARNr 5S está representado en color rosa. A vista superior y B vista inferior. (C) (D) Constitución de ARNr y proteína de la subunidad 50S. C vista superior y D vista inferior. Los componentes de ARNr están coloreados en amarillo y las proteínas ribosomales en verde.

La distribución de las proteínas ribosomales por la subunidad 50S es bastante uniforme, con excepción de la hendidura que forma los sitios A, P y E y la superficie de interacción con la 30S (Ramakrishnan & Moore, 2001). La superficie posterior de la subunidad, que incluye la salida del túnel del polipéptido naciente, se encuentra incrustada de proteínas ribosomales. De hecho, se postula que las seis proteínas que rodean la salida del túnel juegan un papel importante en la secreción del polipéptido porque forman parte de la superficie que hace frente a la membrana y el traslocón cuando se sintetizan proteínas de membrana o secreción (Beckmann et al., 1997). El interior de la subunidad, al igual que ocurre con la 30S, tiene una proporción menor de proteínas comparado con su cara externa. También de manera similar a lo que ocurre con la 30S, la mayoría de las proteínas contienen extensiones que generalmente surgen de dominios globulares de la superficie y que penetran en el interior de la partícula ocupando espacios entre distintos segmentos de ARNr. De esta manera, las interacciones creadas entre las extensiones polipeptídicas y el ARNr estabilizan la estructura general de la subunidad. En cuanto al tipo de interacción, mientras que la mayoría de las proteínas ribosomales de la 50S interactúan principalmente con componentes de ARN, un grupo menor de ellas interactúan con otras proteínas. Un ejemplo es el conjunto formado por las proteínas L3, L6, L13, L14 y L24 que se encuentran próximos al sitio de unión a factores de traducción (Ban et al., 2000).

1.3. TRADUCCIÓN

El dogma central de la biología molecular es un concepto que ilustra los mecanismos de transmisión y expresión de la herencia genética (*Figura 1.6*). Propone que existe unidireccionalidad en la expresión de la información contenida en los genes de una célula. El ADN es transcrito a ARNm y éste es traducido a proteínas, elementos que finalmente realizan la acción celular. Aunque este dogma funciona en la mayoría de los organismos, el estudio de ciertos tipos de virus ha permitido encontrar algunas excepciones significativas como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que con la retrotranscriptasa puede transferir la información que tiene en forma de ARN a ADN.

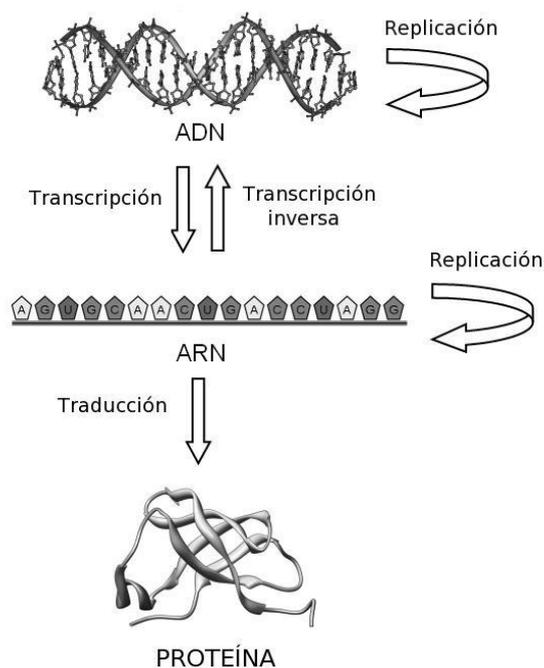


Figura 1.6. Dogma central de la biología. La información fluye desde el ADN al ARN mediante el proceso de transcripción y de este a las proteínas mediante el proceso de traducción.

Si bien el ADN almacena información para la síntesis de proteínas y el ARNm transmite las instrucciones codificadas en el ADN, la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por proteínas. El orden lineal de los aminoácidos en cada proteína determina su estructura tridimensional y actividad. Por lo tanto, el ensamblaje de aminoácidos en el orden correcto, como está codificado en el DNA, es crítico para la producción de proteínas funcionales y por lo tanto para el funcionamiento correcto de las células y organismos. La traducción hace referencia al conjunto de mecanismos mediante los que la secuencia de nucleótidos contenida en el ARNm es leída y traducida a proteínas, utilizando como traductor el código genético. Este proceso, como ya se ha mencionado antes, tiene lugar en complejos macromoleculares de ribonucleoproteínas llamados ribosomas, de manera que éstas catalizan la formación del enlace peptídico y sintetizan proteínas basándose en el código genético que es interpretado por los ARNt (Laursen et al., 2005)

Cada subunidad ribosomal tiene 3 sitios de unión para el ARNt, nombrados sitio A (aminoacil), que acepta el nuevo ARNt aminoacilado; el sitio P (peptidil), que sostiene el ARNt con la cadena polipeptídica que se está sintetizando; y el sitio E (exit, salida), que sostiene el ARNt deacilado antes de que abandone el ribosoma. La subunidad 30S se une al ARNm y a los ARNt mediante la región del anticodón, y contribuye a la fidelidad en la traducción al monitorizar la complementariedad de las bases entre el codón y anticodón en el proceso de decodificación. Por su parte, la subunidad 50S se une al brazo aceptor del ARNt y cataliza la

formación del enlace peptídico entre el aminoácido del ARNt entrante en el sitio A y la cadena peptídica naciente del ARNt en el sitio P. En la traducción no sólo participa el ribosoma. Distintos tipos de ARNs, moléculas de GTP y numerosas proteínas conocidas como factores de traducción (factores de iniciación, elongación y terminación), de las cuales algunas son GTPasas activadas por el ribosoma, se suman al grupo de moléculas implicadas en la traducción.

Conceptualmente, la traducción se divide en cuatro etapas diferenciadas (*Figura 1.7*): iniciación, elongación, terminación y reciclaje. En la iniciación el ribosoma se ensambla al ARNm y el ARNt se posiciona en el sitio P interaccionando codón-anticodón. La elongación se refiere a la polimerización del péptido, función principal del ribosoma y en la terminación y reciclaje incluye una secuencia de eventos que siguen el reconocimiento del codón de terminación en el ARNm (Allen & Frank, 2007). A pesar de que el esquema general del proceso de traducción fue descrito hace aproximadamente 4 décadas, en la actualidad aún se están revelando mecanismos de funcionamiento en estas etapas. Antes de comenzar con la descripción de las fases que conforman el proceso de traducción sería conveniente hacer hincapié en los mecanismos de regulación durante este proceso.

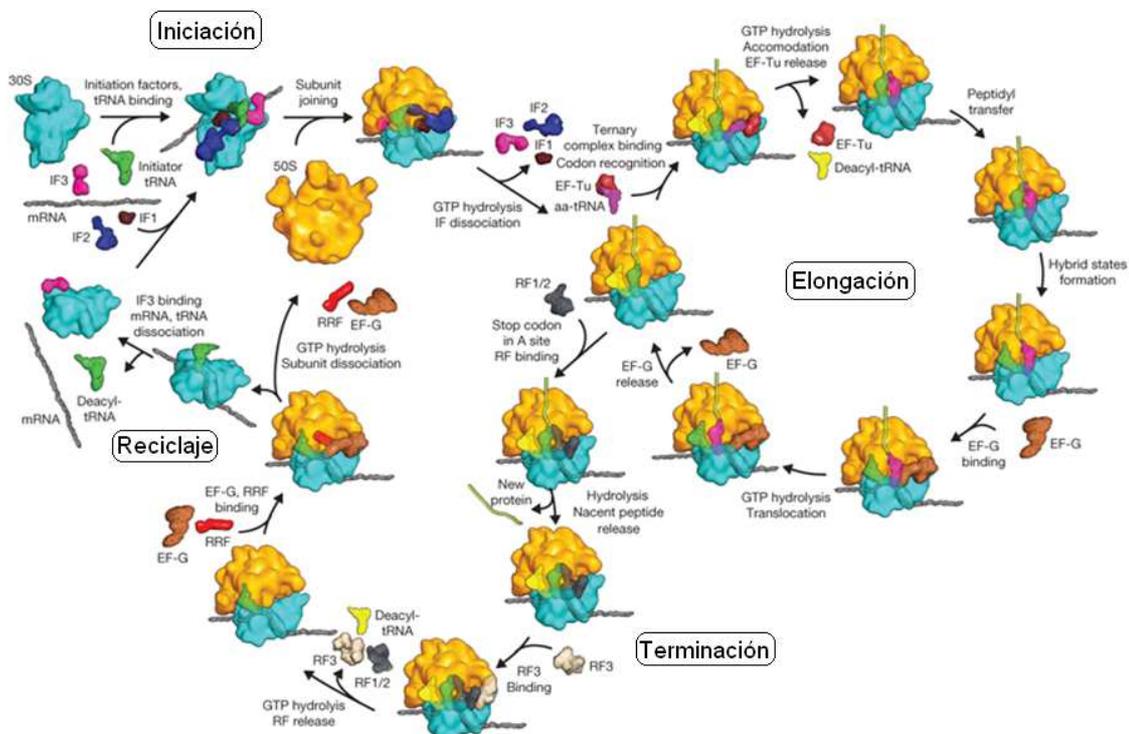


Figura 1.7. Esquema general del proceso de traducción en procariotas con las etapas en las que conceptualmente se divide el proceso: iniciación, elongación, terminación y reciclaje. Modificado de TM Schmeing & V Ramakrishnan (2009).

1.3.1. Regulación de la traducción

La síntesis proteica es uno de los procesos más importantes en lo que concierne a la vida de todo organismo y se tiene que dar de un modo rápido y preciso. El requerimiento de rapidez deriva de la necesidad de los organismos de responder a tiempo a los cambios ambientales. El requerimiento de precisión deriva del hecho de que el plegamiento correcto de una proteína, que es esencial para su propia función, y la integridad de los centros funcionales que dependen de la correcta localización de un residuo de aminoácido particular, puede ponerse en peligro por una simple mutación puntual (Frank, 2000).

Los organismos procariotas han desarrollado numerosos mecanismos para adaptar su crecimiento de manera rápida a cambios ambientales como pueden ser cambios de temperatura, cambios en la disponibilidad de nutrientes y agua, presencia de sustancias tóxicas,... etc. (Simonetti et al, 2008). Un prerrequisito para la inducción de una respuesta apropiada ante el estrés es ser capaz de monitorizar los parámetros tanto internos como externos. A pesar de que la regulación transcripcional es el principal mecanismo de respuesta ante el estrés, la regulación de la traducción es más rápida y consecuentemente muy importante. De hecho, los ribosomas inician el proceso de traducción incluso antes de que la transcripción haya concluido, de manera que transcripción y traducción son dos procesos estrechamente regulados (Laursen et al., 2005). La regulación post-transcripcional ocurre a diferentes niveles, incluyendo la estabilización del ARNm y la iniciación de la traducción. La etapa de iniciación es el paso limitante en la traducción ya que los ribosomas se ensamblan al ARNm en intervalos de aproximadamente 3,2 segundos (Kennel & Riezman, 1977), mientras que la elongación se lleva a cabo a la tasa de 12 aminoácidos por segundo.

La regulación en la etapa de iniciación tiene lugar a través de una serie de eventos que controlan la formación de un ribosoma competente para la etapa de elongación. El único componente variable en esta etapa es el ARNm. La secuencia y estructura del ARNm determinan su interacción con la maquinaria de traducción y por tanto, la eficiencia y rapidez del proceso de traducción. Para expresar un ARNm, éste debe contener algunos o todos estos componentes: (i) un codón de iniciación correcto para que interactúe con el ARNt iniciador; (ii) una secuencia Shine-Dalgarno complementaria a la secuencia anti-Shine-Dalgarno en el 16S ARNr; (iii) una traza de pirimidinas que interactúan con la proteína S1; y (iv) elementos potenciadores de la unión entre pares de bases secuencia arriba o secuencia abajo del codón de iniciación. La regulación traduccional también puede implicar elementos cis-reguladores del ARNm que

forman estructuras secundarias o terciarias que secuestran el sitio de unión al ribosoma. Otros elementos trans-reguladores incluyen proteínas, ARN sin sentido, y otros factores que afectan a la eficiencia en la formación del complejo de iniciación.

A pesar de que el ARNm y las características que éste posea son críticos en el control y regulación de la expresión del ARNm, y por lo tanto en la síntesis de la proteína para la que codifica, los niveles relativos de los factores de iniciación también tienen un papel en la regulación de este proceso. De manera que la expresión de ARNm sin secuencia guía se ve suprimida por el factor de iniciación IF3 e incrementada por el factor de iniciación IF2 (Grill et al., 2001). Este hecho establece la hipótesis de que la deficiencia relativa de IF3 que se produce cuando un incremento en el crecimiento altera la proporción ribosoma/IF3 podría favorecer la expresión de ARNm sin secuencia guía. Además, la estequiometría de los tres factores de iniciación con relación al ribosoma es mayor que el doble durante el periodo de aclimatación de respuesta al frío. Estos factores estimulan selectivamente la expresión de determinados ARNm a bajas temperaturas (Gualerzi et al., 2003).

1.3.2. Etapas de la traducción

1.3.2.1. Iniciación

La iniciación de una cadena polipeptídica en procariotas precisa de: (1) la subunidad ribosomal 30S; (2) el ARNm que codifica para el polipéptido que ha de sintetizarse; (3) el N-formilmetionil-ARNt^{fMet} iniciador (fMet-ARNt^{fMet}); (4) el conjunto de factores proteicos denominados factores de iniciación 1 (IF1), 2 (IF2) y 3 (IF3); y (5) GTP (Gualerzi & Pon, 1990).

El proceso comienza al nivel de la subunidad 30S que se mantiene disociada de la subunidad 50S mediante la acción de IF3 (Simonetti et al., 2008). Seguidamente, los otros dos factores IF1 e IF2 se unen a la subunidad 30S favoreciendo la incorporación del ARNm y el ARNt. De manera combinada, los tres factores de iniciación controlan cinéticamente el proceso y aseguran su fidelidad y precisión (Boelens & Gualerzi, 2002). El ARNm es entonces acomodado en la subunidad 30S conduciendo a la formación de un complejo de iniciación 30S (30SIC) activo. En este complejo, el primer codón del ARNm, generalmente AUG, interactúa físicamente con la región anticodón del ARNt de iniciación en el sitio P. El último paso implica la unión de la subunidad mayor 50S al 30SIC. Este ensamblaje dispara la hidrólisis de la molécula de GTP

unida a IF2, que hace que la elección del sitio de iniciación sea irreversible y disocia los complejos no específicos (Grigoriadou et al., 2007). Finalmente los factores de iniciación se desensamblan del complejo y la maquinaria continúa hacia la fase de elongación donde se produce la lectura del ARNm.

A continuación se describen los componentes del 30SIC en procariotas, detallando su estructura, localización en el complejo y funciones descritas.

- **Factor de iniciación 1 (IF1)**

IF1 en *E. coli* tiene una masa de 8.2 kDa, siendo el más pequeño de los tres factores de iniciación en bacterias. La estructura de IF1 en solución fue determinada mediante RMN (Sette et al., 1997). IF1 pertenece a una familia de proteínas de unión a oligonucleótidos (OB; oligonucleotide binding), y su estructura consiste en un barril de 5 hojas beta con un loop que conecta las hebras 3 y 4 y que contiene una hélice α corta y flexible (*Figura 1.8*) (Sette et al., 1997). Otras proteínas de unión a nucleótidos son la proteína ribosomal S1, las proteínas “cold shock” CspA y CspB (Bycroft et al., 1997) o eIF2 α (Nonato et al., 2002). Ha sido demostrado que los defectos celulares en la síntesis de las proteínas “cold shock” CspB y CspC en *Bacillus subtilis* pueden ser complementados mediante la expresión de IF1 de *E. coli* (Weber et al., 2001), hecho que confirma la similitud estructural y funcional entre IF1 y las proteínas “cold shock”.

Los aminoácidos involucrados en la unión a la 30S han sido identificados mediante mutagénesis dirigida, RMN y cristalografía (Gualerzi et al., 1989; Sette et al., 1997; Carter et al., 2001). IF1 se une a la subunidad 30S en una hendidura formada entre la hélice 44, el bucle 530 del 16S ARNr y la proteína S12 de la subunidad 30S. Específicamente, IF1 inserta el loop que contiene los residuos del 17 al 25 en la hélice 44 interactuando con las adeninas A1492 y A1493 y causando un giro en estos nucleótidos. Este giro induce un cambio conformacional a lo largo de la hélice 44 (Carter et al., 2001) afectando el equilibrio de asociación-disociación entre subunidades (Milon et al., 2008).

Anteriormente ya se había demostrado que esta unión del factor a la subunidad 30S protege a los nucleótidos A1492 y A1493 de modificaciones frente al dimetil sulfato (Moazed et al., 1995). Estos nucleótidos también están protegidos por la unión del ARNt en el sitio A ribosomal, de manera que IF1 se encuentra bloqueando el sitio de unión del ARNt en A para que el ARNt iniciador se posicione correctamente el sitio P. Además, IF1 coopera con IF2 para

prevenir la incorrecta interacción en el sitio P y asegurar que únicamente el ARNt iniciador es el que ocupa esta posición. IF1 está además implicado en la liberación de IF2 del ribosoma 70S y en la estimulación de la formación del complejo de iniciación, favoreciendo la actividad de los otros dos factores (Pon & Gualerzi, 1984).

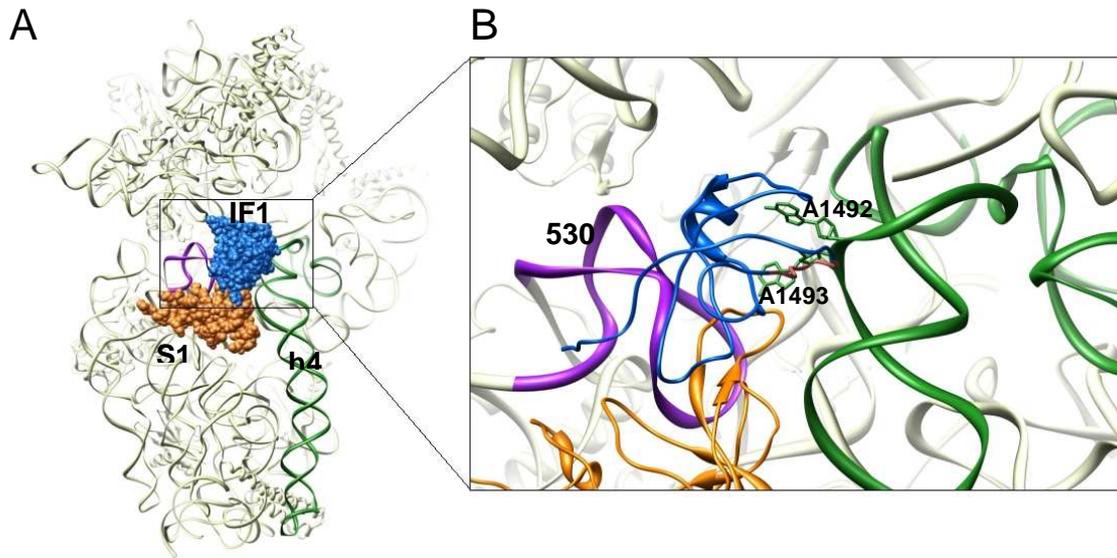


Figura 1.8. Estructura y posición de IF1 en el complejo de iniciación. (A) Estructura cristalográfica de IF1 unido a la subunidad 30S (Carter et al., 2001). IF1 coloreado en azul; la proteína ribosomal S12 en naranja; la hélice 44 (h44) en verde; el loop 530 en violeta y el resto de la subunidad ribosomal en blanco. (B) Vista cercana de las conexiones de IF1 en la subunidad. Interacción de IF1 con los nucleótidos A1493 y A1492 de la hélice 44 del 16S ARNr.

● Factor de iniciación 2 (IF2)

IF2 es el mayor de los factores de iniciación en procariontes. Existen tres isoformas diferentes de este factor en *E. coli* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*; isoforma 1 (97.3 kDa y 890 aminoácidos), isoforma 2 (79.7 kDa y 733 aminoácidos) e isoforma 3 (78.8 kDa y 726 aminoácidos). *Bacillus subtilis* es el único organismo que no pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y en el que más de una isoforma de IF2 ha sido demostrada experimentalmente. Se requiere la presencia de las tres isoformas para un crecimiento óptimo en *E. coli* y el contenido celular de la isoforma 2 junto con la isoforma 3 es cercano al contenido celular de la isoforma 1 en condiciones óptimas de crecimiento (Sacerdot et al., 1992). IF2 pertenece a la familia de proteínas de unión al GTP-GDP (*GTPasas*) que son activadas por el ribosoma. Otros factores ribosomales que pertenecen al mismo grupo son los factores de

elongación Tu (EF-Tu) y G (EF-G); y el factor de liberación 3 (RF3) (Rodnina et al., 2000).

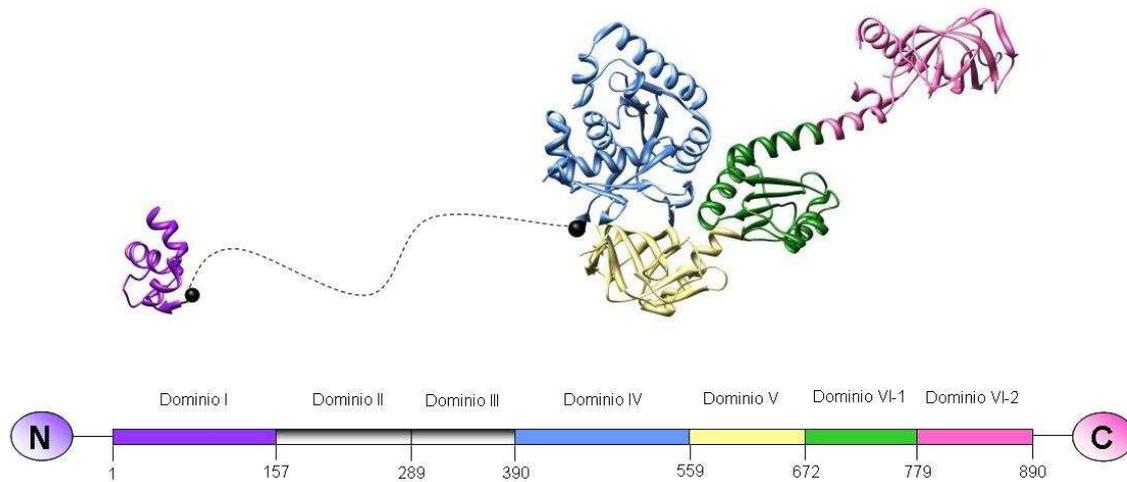


Figura 1.9. Estructura de IF2. La estructura IF2N de *E. coli* determinada por RMN coloreada en púrpura [PDB 1ND9] se muestra a la izquierda de la figura. La estructura del IF2 ortólogo aIF5B del organismo *Methanobacterium. thermoautotrophicum* resuelta mediante cristalografía de rayos X se muestra a la derecha [PDB 1G7T] y corresponde a IF2C en *E. coli*. Los dominios estructurales representados en la figura están coloreados de acuerdo con el esquema de la parte inferior que describe la organización de dominios en la estructura primaria de IF2 en *E. coli*. Los dominios están nombrados según la nomenclaturas utilizadas en la literatura por Mortensen et al., 1998.

Estructuralmente, IF2 se divide en seis dominios, y el dominio VI a su vez se divide en dos subdominios: VI-1 y VI-2 (Figura 1.9). La región C-terminal (del dominio IV al VI) está muy conservada entre las diferentes especies, mientras que la región N-terminal (del dominio I al III) varía en cuanto a extensión y composición aminoacídica (está incluso ausente en arqueas) (Steffensen et al., 1997). Hasta el momento, la principal fuente de información estructural de IF2 en bacterias es la estructura resuelta mediante cristalografía de la proteína homóloga aIF5B en *Metanobacterium thremoautotrophicum* (Roll-Mecak et al., 2000). Esta proteína se corresponde con la región C-terminal de IF2 en *E. coli*. La estructura de aIF5B muestra una forma extendida y se compone de 4 dominios. El dominio IV está formado por 8 hebras β e incluye el motivo de unión al GTP y el dominio V está formado en su mayor parte por la estructura de barril β . Por último, el dominio VI-1 está formado por una estructura de sándwich $\alpha\beta$, que está conectado con otro barril β correspondiente a la estructura del dominio VI-2 mediante una extensa hélice α (Roll-Mecak et al., 2000). En cuanto a la región N-terminal, la estructura del dominio I en *E. coli*, que corresponde a los primeros 157 aminoácidos del factor,

ha sido investigada mediante RMN (Laursen et al., 2003) y los primeros 50 aminoácidos de esta proteína se caracterizaron como un dominio bien ordenado, globular y compacto (*Figura 1.9*) que se lo denominó IF2N. Los dominios restantes de la región N-terminal, que se localizan entre IF2N y la región C-terminal de la proteína no están caracterizados estructuralmente. Sin embargo, se sabe que ésta región es muy flexible y con un contenido helicoidal significativo (Laursen et al., 2003). Aunque es probable que la estructura tridimensional de aIF5B sea similar a la de IF2 en bacterias ya que mantienen un 40% de identidad (Marzi et al., 2003), tal como se ha indicado antes, aIF5B carece de la región N-terminal, que en *E. coli* la constituyen 390 aminoácidos. Además desde el punto de vista funcional, aIF5B tiene propiedades ligeramente distintas a las de IF2 en bacterias (Boelens et al., 2002).

La función principal de IF2 es la estimulación de la unión del ARNt iniciador al complejo y su correcto posicionamiento en el sitio P. La interacción se da entre el extremo CCA del ARNt iniciador y el dominio VI-2 de IF2. Por otro lado, IF2 estimula la unión de la subunidad 50S al complejo aumentando la superficie de interacción entre ambas subunidades (Caserta et al., 2006). Se ha demostrado que la región N-terminal es la que media en la interacción con ambas subunidades en *E. coli* (Moreno et al., 1999). Además de sus funciones como factor de iniciación, IF2 tiene propiedades de chaperona, promoviendo el plegamiento de proteínas y formando complejos estables con proteínas no plegadas (Caldas et al., 2000).

● Factor de iniciación 3 (IF3)

IF3 en *E. coli* es una proteína de 20.4 kDa compuesta por 180 aminoácidos (Sacerdot et al., 1982). Mientras que IF1 e IF2 están universalmente presentes y son importantes para el funcionamiento de todos los organismos, IF3 se limita a un número de especies bacterianas. IF3 está constituida por dos dominios estructurales de aproximadamente el mismo tamaño, el dominio N-terminal (IF3N) y el dominio C-terminal (IF3C), que se encuentran separados por un conector de una longitud aproximada de 45 Å rico en lisinas y altamente flexible (de Cock et al., 1999). Las estructuras de los dos dominios han sido determinadas mediante cristalografía y RMN (García et al., 1995). IF3N consiste en un ensamblaje globular α/β con una hélice α mientras que la estructura de IF3C consiste en un plegamiento α/β sándwich (*Figura 1.10*).

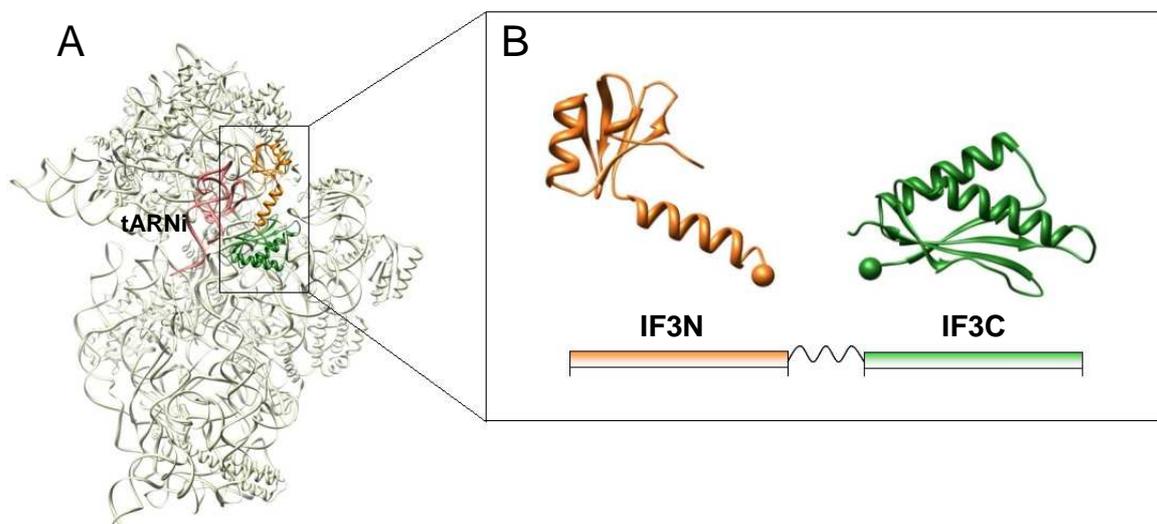


Figura 1.10. Estructura y posición de IF3. (A) Localización aproximada de IF3 de acuerdo con estudios de marcaje químico (Dallas & Noller, 2001). (B) Estructura cristalográfica del dominio N-terminal de IF3 (naranja) (Biou et al., 1995) (código pdb 1TIF); y estructura cristalográfica del dominio C-terminal (verde) (Garcia et al., 1995) (código pdb 2IFE). El Dominio N-terminal está unido al dominio C-terminal mediante un conector flexible.

En lo referente a la localización de IF3 en la subunidad 30S, ésta ha sido estudiada mediante diferentes metodologías obteniendo resultados contradictorios. Esto ha sido en parte debido a la similitud de tamaño entre los dos dominios que conduce a ambigüedad a la hora de asignar el dominio en las reconstrucciones de crio-ME (Myasnikov et al., 2009). Sin embargo, utilizando otras técnicas diferentes tampoco se ha conseguido un consenso a cerca de la localización de IF3 en el ribosoma. IF3 fue posicionado en la superficie de interacción de la plataforma según diferentes estudios de inmuno-microscopía (Stoffler & Stoffler-Meilicke, 1984), crio-ME (McCutcheon et al., 1999), y pruebas bioquímicas (Dallas & Noller, 2001). Estos estudios mantienen que la función que ejerce IF3 de prevenir la asociación entre subunidades es consecuencia del bloqueo directo que ejerce IF3C, ya que esta posición se solapa con la del 23S ARNr de la subunidad 50S. Sin embargo, un estudio de cristalografía de la subunidad 30S junto con IF3C, posicionó este dominio en la zona solvente de la plataforma de la subunidad (Pioletti et al., 2001). Esos autores apuntan a una interacción indirecta como la causante de la función de disociación de IF3. Para IF3N, la situación es aún más compleja ya que no existe una imagen de alta resolución de este dominio en la subunidad 30S y estudios bioquímicos y estructurales lo posicionan en distintas regiones del ribosoma (Dallas & Noller, 2001; McCutcheon et al., 1999).

Son numerosas las funciones que se le asignan a este factor. IF3 mantiene el conjunto celular de 30S libre para iniciar la traducción mediante su unión a la subunidad. También estimula la interacción codón-anticodón entre el fMet-ARNt y el ARNm, promoviendo la formación de un complejo de iniciación 30S correcto. Además, IF3 actúa como factor de fidelidad que desestabiliza la interacción de un ARNt inespecífico en el sitio P (Hartz et al., 1989). Todas las funciones del IF3 nativo pueden ser llevadas a cabo *in vitro* por IF3C aislado, mientras que el dominio IF3N probablemente tiene como fin modular la estabilidad termodinámica de los complejos 30S·IF3 (Petrelli et al., 2001). Mediante mutagénesis dirigida en ocho residuos de arginina del dominio IF3C se han identificado los sitios activos de la proteína (Petrelli et al., 2003). Las argininas en las posiciones 99, 112, 116, 147 y 168 son importantes para la unión con la subunidad 30S. La habilidad de IF3 para disociar el ribosoma en sus dos subunidades se ve afectada mayoritariamente por las mutaciones en los residuos R112 y R147. La estimulación en la traducción se vio afectada por las mutaciones de los residuos R116 y R129 (de manera menos extensa por la mutación en los residuos R99, R112 y R131), mientras que la inhibición de la traducción debido a ARNm no canónicos se vio afectada por las mutaciones en los residuos R99, R112 y R168 (de manera menos extensa en los residuos R116, R129 y R131). Estos resultados indican que IF3C contiene al menos 2 superficies, una de ellas embebida en la subunidad 30S y otra enfrentada al ARNm (Petrelli et al., 2003).

Ambos dominios de IF3 son de unión al ARN e interaccionan independientemente con la subunidad 30S. De hecho, se ha demostrado que el conector que une IF3C e IF3N puede realizar casi todo tipo de movimientos sin restricción (Moreau et al., 1997). Tal alto grado de flexibilidad se ha relacionado con el requerimiento de que los dominios de IF3 interactúen con regiones distantes dentro del ribosoma. IF3C interacciona con mayor afinidad a través de una extensa superficie de residuos distribuidos simétricamente en loops y hélices α , mientras que IF3N interacciona *via* un pequeño número de residuos distribuidos asimétricamente (Sette et al., 1999).

Además de los factores de iniciación, otras dos moléculas de ARN, el ARNm y el ARNt iniciador, son esenciales en la composición del 30SIC.

- **ARNm**

El ARNm interactúa específicamente con el ARNt y con la subunidad 30S durante la iniciación de la traducción. El ARNm se posiciona a lo largo del cuello de la 30S con su extremo 5' sobre el lado de la plataforma y su extremo 3' cerca de la espalda (Yusupov et al., 2001). La región de ARNm cubierta por el ribosoma en la etapa de iniciación se denomina sitio de unión al ribosoma y se extiende a lo largo de 30 nucleótidos (Steitz, 1969).

Los ARNm bacterianos son generalmente policistrónicos y poseen múltiples señales para la iniciación y terminación de la síntesis proteica. La región de iniciación de la traducción en el ARNm no está únicamente caracterizada por la presencia de un codón de iniciación, que puede ser AUG, GUG o UUG (McCarthy & Brimacombe, 1994), aunque AUG es mucho más frecuente que los dos restantes, con un 90% de prevalencia (Schneider et al., 1986). Se necesitan elementos adicionales para promover la etapa de iniciación de manera correcta. Muchos ARNm poseen una secuencia llamada Shine-Dalgarno (SD) rica en purinas, localizada varios nucleótidos hacia arriba (región 5') del codón de inicio (Shine & Dalgarno, 1974), cuyas bases tienen su secuencia complementaria (antiSD) en el extremo 3'-terminal del 16S ARNr de la subunidad 30S. Esta interacción SD-antiSD, que se da en una gran cavidad situada entre la cabeza y la región posterior de la plataforma en la subunidad 30S (Yusupov et al., 2001), posibilita la captura del ARNm por la 30S y asegura el ajuste del codón de inicio cerca del sitio ribosomal P, donde interactúa con el ARNt iniciador (Kaminishi et al., 2007). En *E. coli*, el ARNt normalmente tiene una secuencia GGAGG localizada 7 (\pm 2) nucleótidos hacia arriba del codón de iniciación.

Esta región de iniciación de la traducción (TIR; translation initiation region), que comprende los nucleótidos desde la secuencia SD hasta el codón de iniciación, juega un papel muy importante en la eficiencia de la traducción. Se asume que para obtener una eficiencia máxima en la traducción, el ARNm no debería poseer estructura secundaria alrededor de la región del codón de iniciación y debería poseer una secuencia SD con máxima complementariedad. Además, un espaciado corto entre la secuencia SD y el codón de iniciación también potencia la eficiencia de traducción (Skorski et al., 2006). Específicamente se demostró que los ARNm con mayor número de nucleótidos en la secuencia SD y menor número de nucleótidos de espaciado entre la secuencia SD y el codón de iniciación confieren al complejo de iniciación una conformación que hace que la unión de la subunidad 50S y la liberación de IF3 del complejo sea mucho más lenta que con ARNm con secuencia SD corta y espaciado largo (Milon et al., 2008).

Los ARNts de iniciación se unen al ribosoma directamente al sitio P, mientras que los ARNts de elongación entran en el ribosoma uniéndose primeramente al sitio A y más tarde son translocados al sitio P. La unión de los ARNt a los sitios A y P está controlada por los factores de elongación y de iniciación respectivamente. Es por ello que los ARNts de iniciación poseen unas características estructurales que son reconocidas por los factores de iniciación y son discriminadas frente a los factores de elongación. Las características específicas de los ARNt de iniciación están localizadas en la región del anticodón, el extremo aceptor y en el bucle D e incluyen; la ausencia de emparejamiento de bases entre las posiciones 1 y 72 en el extremo aceptor, tres pares de bases GC consecutivas en la región del anticodón y la presencia de un par de base purina-11-pirimidina-24 en lugar de pirimidina-11-purina-24 que se encuentra en otros ARNts (Laursen et al., 2005) (*Figura 1.11*). Los pares de base GC hacen que el brazo del anticodón sea menos flexible que en los demás ARNt, hecho importante para la selección del ARNt iniciador en el sitio P (Schweisguth & Moore, 1997).

En el último paso de la etapa de iniciación, la subunidad 50S se une al complejo 30SIC estable para formar el complejo de iniciación 70S. En este proceso, los factores IF1 e IF3 son liberados del ribosoma. Seguidamente, el ajuste del ARNt iniciador en el sitio P y la asociación entre unidades se producen como resultado de la hidrólisis de GTP por IF2 y la liberación del fosfato inorgánico. Tras la liberación de IF2, el ribosoma 70S está preparado para entrar en la siguiente etapa de elongación.

Como ya se ha visto, la iniciación de la traducción no involucra únicamente a las subunidades ribosomales, si no también a la unión y disociación de factores proteicos de iniciación, y en el caso del IF2 a la hidrólisis de GTP. Todos estos eventos están acompañados de cambios conformacionales del ribosoma y de los demás componentes del complejo de iniciación.

1.3.2.2. Elongación

La adición de cada aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento tiene lugar en varias etapas. Este ciclo se repite tantas veces como aminoácidos han de adicionarse. Para que la elongación se lleve a cabo se precisan: (1) el complejo de iniciación descrito anteriormente; (2) el siguiente aminoacil-ARNt especificado por el triplete de codificación inmediato del ARNm; (3) un conjunto de tres proteínas denominadas factores de elongación, EF-Tu; EF-Ts y EF-G; y (4) GTP. Los pasos claves de la elongación son la entrada y la acomodación de cada aminoacil-ARNt consecutivo, la formación del enlace peptídico, y el movimiento o translocación del ribosoma a lo largo del ARNm.

• Acomodación

El final de la etapa de iniciación deja un ARNt iniciador en el sitio P y un sitio A desocupado, que será necesario para el comienzo del ciclo de elongación. El aminoacil-ARNt entrante es conducido al sitio A del ribosoma como un complejo ternario junto con el factor de elongación Tu (EF-Tu) y una molécula de GTP (Valle et al., 2003). Esta proteína fue la primera identificada como proteína dependiente de GTP/GDP (proteína G) y con una secuencia de 394 aminoácidos consta de 3 dominios estructuralmente diferenciados.

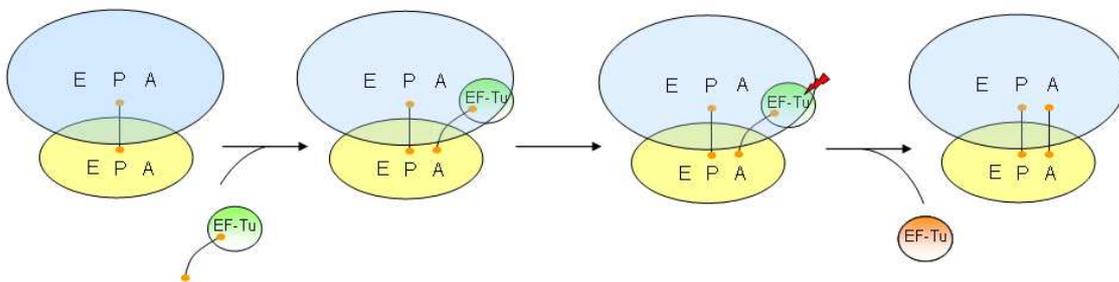


Figura 1.12. Representación del proceso de acomodación en la traducción procariota. El proceso comienza con un ribosoma 70S con un ARNt en el sitio P. Un nuevo ARNt se une al complejo en el sitio ribosomal A junto con EF-Tu. Tras la hidrólisis de GTP por el factor, éste se libera del ribosoma y el ARNt se adapta correctamente al sitio ribosomal A.

Cuando éste complejo ternario se une al ribosoma, el ARNt se encuentra en una conformación A/T, en la que su anticodón está interactuando con el ARNm pero su extremo aceptor se encuentra aún unido a EF-Tu (Moazed & Noller, 1989). Estudios de crio-ME han mostrado que la estructura del ARNt está modificada de manera que se facilita la interacción codón-anticodón (Valle et al., 2002). Una vez verificada la interacción, EF-Tu cataliza la hidrólisis de GTP y se libera el complejo binario EF-Tu·GDP debido a una reducción de la afinidad por el ribosoma y por el ARNt provocado por un cambio de conformación en el factor (Dell et al., 1990). Tras la liberación de EF-Tu·GDP el ARNt queda libre de mover su extremo CCA hacia el sitio de la peptidil-transferasa en la subunidad 50S, donde se producirá la formación del enlace péptido, permitiendo al polipéptido aumentar en un nuevo aminoácido (Kaziro, 1978). La transición del ARNt desde su posición A/T a su sitio A se conoce como acomodación.

• **Formación del enlace peptídico**

En el siguiente paso de la etapa de elongación es esencialmente espontáneo y consiste en la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos cuyos ARNt están localizados en los centros A y P del ribosoma. En esta etapa se transfiere el grupo N-formilmetionilo iniciador desde su ARNt posicionado en el sitio P hasta el grupo amino del aminoácido recién situado en el centro A.

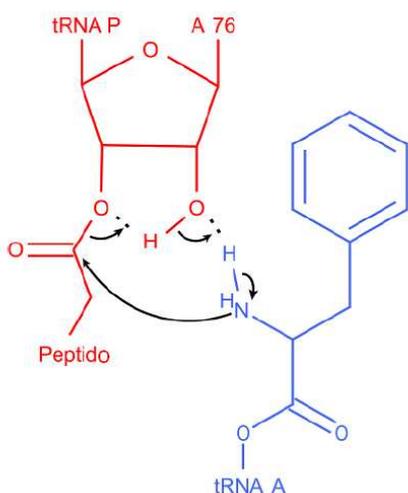


Figura 1.13. Mecanismo de formación del enlace peptídico en el ribosoma. El grupo α -amino del aminoacil-ARNt en el sitio A (azul) ataca (flecha negra de derecha a izquierda) el enlace éster del peptidil ARNt en el sitio P (rojo). Un protón es enviado a través de un grupo OH' de la adenina 76 (A76) del ARNt en el sitio P (flechas negras de izquierda a derecha) con la ayuda de las bases del 23S ARNr y moléculas de agua (Tobro & Aqvist, 2005).

Esta reacción peptidil-transferasa es catalizada por el 23S ARNr de la subunidad 50S, el cual orienta los átomos interactuantes, permitiendo que la reacción continúe. La capacidad catalítica del ARNr 23S ha sido demostrada por la eliminación de la mayoría de las proteínas de la subunidad ribosomal 50S (Noller et al., 1992). Como resultado de esta reacción se forma un dipeptidil-ARNt unido al centro A, mientras que el ARNt iniciador “descargado” permanece unido al sitio P.

• **Translocación**

Tan pronto como el ARNt entrante esté acomodado en el sitio A y la subunidad 50S haya catalizado la formación del enlace peptídico, la translocación del complejo ARNm·ARNt desde los sitios A y P hacia los sitios P y E debe ocurrir de manera que dejen vacante el sitio A para el siguiente ARNt entrante. La translocación normalmente requiere de la acción GTPasa del factor EF-G (Rodnina et al., 1997). EF-G es una proteína de 110Å de largo y está constituido por 5 dominios estructurales, entre ellos el dominio GTPasa que se encuentra en la región de la “cabeza”. Sin embargo, se demostró que bajo ciertas condiciones experimentales, la

translocación puede ocurrir de manera espontánea, sin presencia de ningún factor (Pestka, 1968), sugiriendo que la capacidad de dicho proceso es intrínseca del ribosoma, que está íntimamente unida a su arquitectura (Agirrezabala & Frank., 2009).

Ya en los comienzos del estudio de la síntesis proteica se especuló que debido a la composición del ribosoma en 2 subunidades, la translocación podría implicar un movimiento relativo entre ellas (Spirin., 1968). Posteriormente dicho movimiento conformacional entre subunidades fue observado en mapas de crio-ME de complejos ribosomales unidos a EF-G (Frank & Agrawal, 2000; Valle et al., 2003). En este proceso, la cabeza de la subunidad 30S rota en relación con la 50S con un ángulo de aproximadamente 6 grados, lo que resulta en un desplazamiento máximo de 19Å en la periferia del ribosoma. La rotación de la subunidad 30S se acompaña de varios cambios conformacionales en ambas subunidades. La más destacada es el movimiento de la proteína L1 de la subunidad 50S hacia la zona de interacción entre las dos subunidades, que es una región implicada en la translocación del ARNt deacilado desde el sitio P al sitio E (Valle et al., 2003).

Además del movimiento relativo entre subunidades, la translocación no puede ser entendida sin tener en consideración los estados híbridos o intermedios de los ARNt en el ribosoma. En el proceso de translocación, los extremos CCA de los ARNt que interactúan con la subunidad mayor son los primeros en moverse y lo hacen de manera espontánea. Esto resulta en la formación de un estado híbrido o intermedio de los ARNt. Estos estados intermedios fueron teóricamente sugeridos hace cuatro décadas (Bretscher, 1968) pero no fue hasta 20 años más tarde cuando se mostró una evidencia indirecta de su existencia utilizando ensayos bioquímicos (Moazed & Noller, 1989). Más tarde, en estudios de crio-ME se ha visualizado el ARNt en un estado intermedio P/E en condiciones no fisiológicas (Gao et al., 2005; Valle et al., 2003). Sin embargo los estados híbridos de translocación de ARNt aún no se habían observado en ribosomas activos en traducción.

Como resultado de la translocación, el ARNt iniciador, ya sin la metionina, se desplaza hacia el sitio E (de salida) del ribosoma, y al mismo tiempo, el segundo ARNt, ahora unido covalentemente a un dipéptido, se desplaza al sitio P. Por lo tanto, la translocación retorna a la conformación del ribosoma en el cual el sitio A está desocupado y es capaz de aceptar otro ARNt aminoacilado en complejo con EF-Tu, comenzando así otro ciclo de elongación de la cadena. De esta manera los ARNt son rápida y unidireccionalmente translocados a través de los centros, estructuralmente diferentes, A, P y E en la interfaz de las dos subunidades ribosomales. La repetición del ciclo de elongación descrito adiciona un aminoácido cada vez al extremo C-

terminal de polipéptido que se está sintetizando dirigido por la secuencia del ARNm hasta que se encuentra en esta secuencia con un codón de terminación.

1.3.2.3. Terminación

La finalización de la síntesis del polipéptido y su consecuente liberación está señalizada por uno de los tres tripletes de terminación existentes en el ARNm, situado inmediatamente después del codón que especifica para el último aminoácido de la cadena. Los tripletes de terminación, UAA, UAG y UGA, no codifican para ningún aminoácido. Se denominan tripletes sin sentido, ya que fueron descubiertos por primera vez como resultado de mutaciones puntuales de algunos codones de los aminoácidos, que dieron lugar a la aparición de mutantes de *E. coli* en los que algunas cadenas polipeptídicas eran prematuramente terminadas. Estos mutantes sin sentido, hicieron posible la identificación de los codones de terminación. Al contrario del reconocimiento de los codones por los ARNt, los codones de terminación son reconocidos por proteínas extra-ribosomales llamadas factores de liberación de clase 1 (factor de liberación 1 y factor de liberación 2 o RF1 y RF2) (Kisseley et al., 2003) que se unen al ribosoma y catalizan la hidrólisis y liberación del polipéptido unido al ARNt en el sitio P. En bacterias, los codones de terminación UAG y UAA son reconocidos por el factor RF1, mientras que los codones de terminación UGA y UAA son reconocidos por el factor RF2 (Laurberg et al., 2008). Una vez que el factor de liberación de clase 1 ha reconocido el codón de terminación, otro factor de liberación 3 (RF3) con función GTPasa promueve la rápida disociación de RF1 y RF2 tras la hidrólisis de GTP.

1.3.2.4. Reciclaje

Tras la hidrólisis de GTP por RF3, el factor se disocia del ribosoma, dejando el ARNm y un ARNt deacilado en el sitio P. El ribosoma debe ser convertido a subunidades para un nuevo ciclo de síntesis proteica. En bacterias, una proteína denominada factor de reciclaje (RRF) trabaja junto con EF-G para llevar a cabo este proceso.

Estudios bioquímicos, de crio-ME y cristalografía sugieren similares interacciones de RRF con el ribosoma (Lancaster et al., 2002; Gao et al., 2007; Weixlbaumer et al., 2007). Sin embargo, la localización de RRF en estos estudios es incompatible con la del ARNt en el sitio P de la subunidad 50S, ya que el ARNt estaría superpuesto al dominio I del RRF. Una posible explicación sería que RRF se une al ribosoma con el ARNt en estado híbrido P/E. EF-G se uniría entonces a él de manera similar a la que se une al complejo de pre-translocación

ribosomal (Schemeing & Ramakrishnan, 2009). Esta visión se complica por estudios que sugieren que RRF puede incluso llevar unido un peptidil-ARNt cuando se une al ribosoma (Rao & Varshney, 2001). Por otra parte, estudios de crio-ME de la subunidad 50S con RRF y EF-G sugieren el tipo de cambios que podrían ocurrir antes y después de la actividad de RRF (Gao et al., 2005), sin embargo no está del todo claro si representan un estado específico del proceso de reciclaje en el ribosoma. Además, hasta la fecha no existe ninguna estructura completa del ribosoma con EF-G y RRF.

La hidrólisis de GTP por parte EF-G parece ser un requerimiento para promover la separación entre subunidades (Peske et al., 2005), originando una subunidad 50S y un complejo de la subunidad 30S junto con el ARNm y el ARNt deacilado, que requiere la acción de IF3 para su disociación. La acción de IF3 en disociar el ARNm y el ARNt de la subunidad resulta interesante ya que sirve de vínculo entre el último paso de la síntesis proteica y el primero, al preparar a la subunidad 30S para un nuevo ciclo de traducción, ya que como se ha mencionado antes, el comienzo del proceso de traducción tiene lugar con IF3 unida a la subunidad 30S.

1.4. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Aunque en la actualidad se dispone de una gran información acerca del proceso global de la síntesis proteica, aún quedan lagunas en la comprensión de los mecanismos moleculares. Desde el punto de vista de la microscopía electrónica, el proceso de traducción ribosomal puede ser investigado tomando como objeto de estudio diferentes complejos ribosomales que representen los pasos que dan lugar a lo largo de todo el proceso. En este estudio se pretende realizar una caracterización estructural de dos diferentes complejos ribosomales que representan dos estados estructurales durante las etapas de iniciación y elongación. Para este fin, nos valdremos de la crio-ME y la reconstrucción tridimensional de macromoléculas empleando la técnica de partículas individuales. Los complejos ribosomales a estudio son los siguientes:

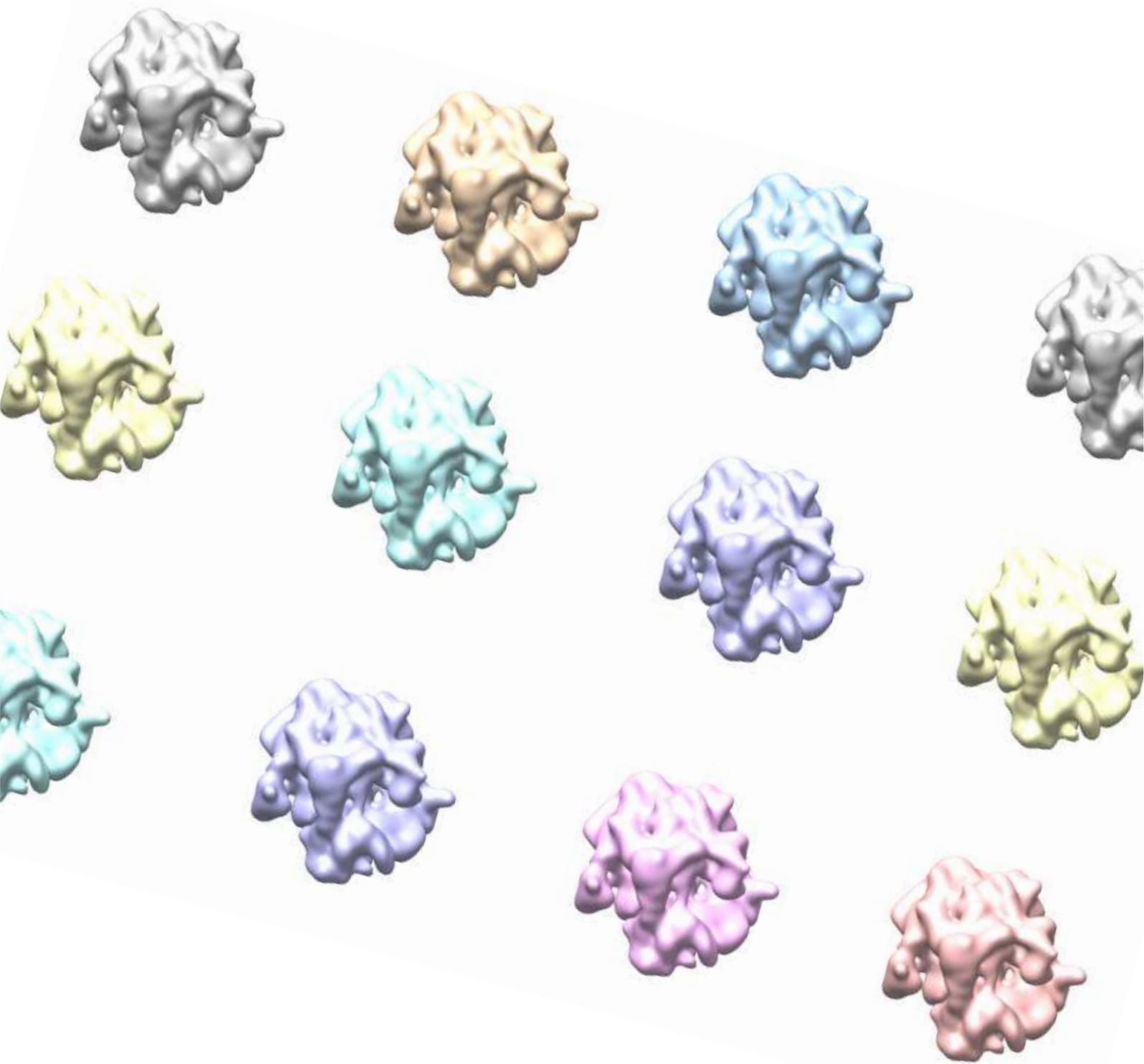
A) Complejo de iniciación 30S en *E. coli*.

Existen numerosos estudios bioquímicos y estructurales referentes al proceso de iniciación en procariontes. Sin embargo, aún no se ha conseguido obtener una estructura del complejo de iniciación 30S completo en ningún organismo procarionte. La motivación de este estudio es la caracterización estructural mediante microscopía de este importante intermediario en el proceso de iniciación en el organismo *E. coli*. Con la información que obtengamos de este estudio

pretenderemos dar respuesta a varias cuestiones como cual es la localización de los diferentes factores de iniciación en el complejo ribosomal y su inferencia en las funciones que ejercen cada uno de ellos. Además comprenderemos los cambios e interacciones que suceden en la subunidad 30S para proceder al ensamblaje y selección de complejos correctos de iniciación que darán origen a un ribosoma 70S eficaz para proceder a la siguiente etapa de elongación. Otra cuestión que puede ser respondida es la estructura del factor IF2 en este organismo, ya que no se tiene información estructural completa y fidedigna de este factor en *E. coli*.

B) Complejo de pre-translocación en *E. coli*.

Los ARNts en los estados híbridos o intermedios han sido caracterizados bioquímicamente, sin embargo, nunca antes han sido visualizados. La motivación en este proyecto es estudiar la presencia de complejos ribosomales con los ARNts en esta conformación, así como estudiar si estos complejos se producen de manera espontánea en el ribosoma sin la participación de EF-G. Por otro lado, mediante el análisis estructural estudiaremos los cambios que tienen lugar en el ribosoma durante la formación de los ARNts híbridos.



Capítulo 2

Materiales y Métodos

La expresión y purificación de los ribosomas, ARNts, ARNm y factores fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Marina V. Rodnina en el Instituto Max Planck de Biofísica (Gottingen, Alemania).

2.1. PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS PARA MICROSCOPIA

2.1.1. Complejo de iniciación

Los complejos de iniciación del organismo *E. coli* se prepararon *in vitro*, mezclando la subunidad ribosomal 30S (0,1 μ M) con los factores de iniciación IF1 (0,3 μ M), IF2 (0,2 μ M) e IF3 (0,3 μ M), el ARNm (0,6 μ M), ARNt iniciador (0,6 μ M) y GDPNP (0,5 μ M) en el tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NH₄Cl 70 mM, KCl 30 mM, y MgCl₂ 7mM). La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Después se mantuvo a 4 °C durante 10 minutos. Antes de la preparación de las rejillas para microscopía, la mezcla se diluyó en el tampón A con 0.5 μ m de GDPNP hasta obtener una concentración final de 30S de 32 nM.

2.1.2. Complejo de pre-translocación

Los complejos de pre-translocación (ARNt^{fMet} en el sitio P y fMetLeu-ARNt^{Leu5} en el sitio A) fueron preparados *in vitro* en el tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NH₄Cl 70 mM, KCl 30 mM, y MgCl₂ 20mM) a una concentración de 1 μ M. Seguidamente, la muestra se diluyó con tampón A hasta obtener una concentración final del complejo de 32 nM. En el caso de la muestra con espermina, este compuesto se añadió en este último paso a una concentración final de 2 mM.

2.2. VITRIFICACIÓN

Para el análisis de las muestras de los complejos de iniciación y pre-translocación se utilizaron rejillas de cobre Quantifoil (Micro Tool GMBH, Jena, Germany) con una fina capa de carbón y previamente ionizadas (Dry Turbo Pumping Station, Model 655, Bal-Tec).

Para la vitrificación, se añadieron 4 μ l de muestra en cada rejilla, previamente ionizada, en unas

condiciones de 4°C de temperatura y 100% de humedad. Seguidamente las rejillas se vitrificaron utilizando un VITROBOT (FEI), sumergiéndolas rápidamente en etano líquido a -180 °C. Debido a la elevada velocidad de congelación se evita la formación de cristales y la macromolécula queda incluida en una capa de hielo vítreo que conserva su estado nativo. Las rejillas vitrificadas se mantienen en nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -170 °C.

2.3. CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el estudio tridimensional de ambos complejos, las fotografías fueron obtenidas en un microscopio electrónico JEM-2200 FS JEOL equipado con un cañón de emisión de campo y estabilizado a 200 kV, utilizando un sistema de mínima dosis. El método que se utilizó en la adquisición de las fotografías para el complejo de iniciación fue mediante un sistema de placas fotográficas (Kodak SO-163), mientras que las fotografías obtenidas para el estudio del complejo de pre-translocación se realizaron mediante la cámara digital CCD 4kx4k (Gatan).

2.3.1. Complejo de iniciación

Las fotografías fueron obtenidas utilizando una magnificación de 50.000X. Una vez reveladas, se escanearon utilizando un escáner Zeiss-Imaging (Z/I Imaging Corporation, Huntsville, AL) con un tamaño de muestreo de 14µm que corresponde a un tamaño de píxel de 2.8 Å en escala real.

Un total de 507 placas fueron escaneadas y, tras ser transferidas a formato Spider, la calidad óptica de las micrografías fue evaluada mediante el examen del espectro de frecuencias de las imágenes, eliminándose aquellas que presentaban defectos como deriva o astigmatismo, de manera que se seleccionaron un total de 239 fotografías que cubren un rango de subenfoco de entre 0.65 a 4 µm.

2.3.2. Complejo de pre-translocación

Las fotografías se obtuvieron mediante cámara (GATAN) a una magnificación de 50.000X que se corresponde con un tamaño de píxel de 2.2Å. Para el complejo de pre-translocación sin espermina un total de 162 fotografías en formato dm3 fueron transferidas a formato Spider y tras la comprobación de la calidad de las imágenes, 74 fotografías fueron seleccionadas. Para el

complejo de pre-translocación con espermina, se obtuvieron un total de 366 fotografías de las que 273 fueron seleccionadas para el procesamiento.

2.4. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

La reconstrucción en 3D de los complejos ribosomales se realizó empleando la técnica de partículas individuales con volumen de referencia utilizando como herramienta el paquete Spire/Spider (Frank et al., 1996).

La reconstrucción tridimensional de partículas individuales es una técnica utilizada en microscopía electrónica para estudiar la estructura de macromoléculas. Siguiendo este enfoque, las moléculas biológicas son estudiadas por la información lograda a partir de miles de proyecciones 2D de la misma partícula, que presentan orientaciones desconocidas e independientes. Una asunción intrínseca es que la población de partículas es homogénea o que subconjuntos homogéneos pueden ser identificados. El procesamiento de imágenes sigue varios procedimientos matemáticos para determinar la orientación de las partículas y combina la información de las proyecciones en un mapa de densidad tridimensional de la muestra.

2.4.1. Corrección de la CTF

Primeramente, el procesamiento de las imágenes obtenidas por crio-ME incluye la determinación del desenfoque y astigmatismo de las imágenes para la corrección de los datos frente a la CTF (Contrast Transfer Function) del microscopio electrónico. La corrección es necesaria debido a que la CTF causa modulaciones de la amplitud dependientes de la resolución y el cambio de fases en la imagen. En nuestro estudio, para la corrección de la CTF, las micrografías se agruparon según la magnitud de su desenfoque, que es cuantificable por la posición de los anillos de Thon en el espectro de frecuencias (Thon, 1966) cambios de signo de la CTF y la función envolvente visible en el promediado radial. La CTF se corrigió durante el procesamiento mediante el filtro de Wiener utilizando las herramientas existentes en el paquete Spider para procesamiento digital de imágenes (Frank et al., 1996).

2.4.2. Alineamiento y reconstrucción tridimensional

Para la asignación de los parámetros de alineamiento, y puesto que la estructura del ribosoma ya es bien conocida, utilizamos un modelo tridimensional como referencia. Siguiendo este procedimiento, las orientaciones de las proyecciones experimentales se obtienen mediante la comparación con las proyecciones en 2D del modelo existente. Un set de proyecciones en 2D de la referencia se generan variando ángulos de proyección. Después, las imágenes obtenidas experimentalmente se comparan con las proyecciones simuladas de la referencia, y se asignan a la proyección más similar. Después se aplican las transformaciones a las imágenes de acuerdo con los parámetros de alineamiento. Un nuevo modelo puede generarse ahora y éste se puede utilizar para refinar los parámetros de alineamiento. A lo largo del refinamiento angular, se utilizan métodos iterativos emparejando las proyecciones experimentales con aquellas calculadas de la reconstrucción a medida que el tamaño del ángulo se va haciendo más pequeño. De esta manera, se permite que las proyecciones experimentales de las partículas se ajusten y encuentren mejores ángulos que los que estaban disponibles al inicio. Consecuentemente, la reconstrucción finalmente obtenida es óptimamente consistente con la información experimental. A los mapas obtenidos se les aplicaron una corrección de amplitudes utilizando un patrón de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) (Gabashvili et al., 2000). El criterio utilizado para definir la resolución alcanzada fue aquel que se corresponde a un valor de correlación por capas en el espacio de Fourier (Fourier Shell Correlation) FSC= 0,5 (Bottcher et al., 1997).

2.4.3. Clasificación

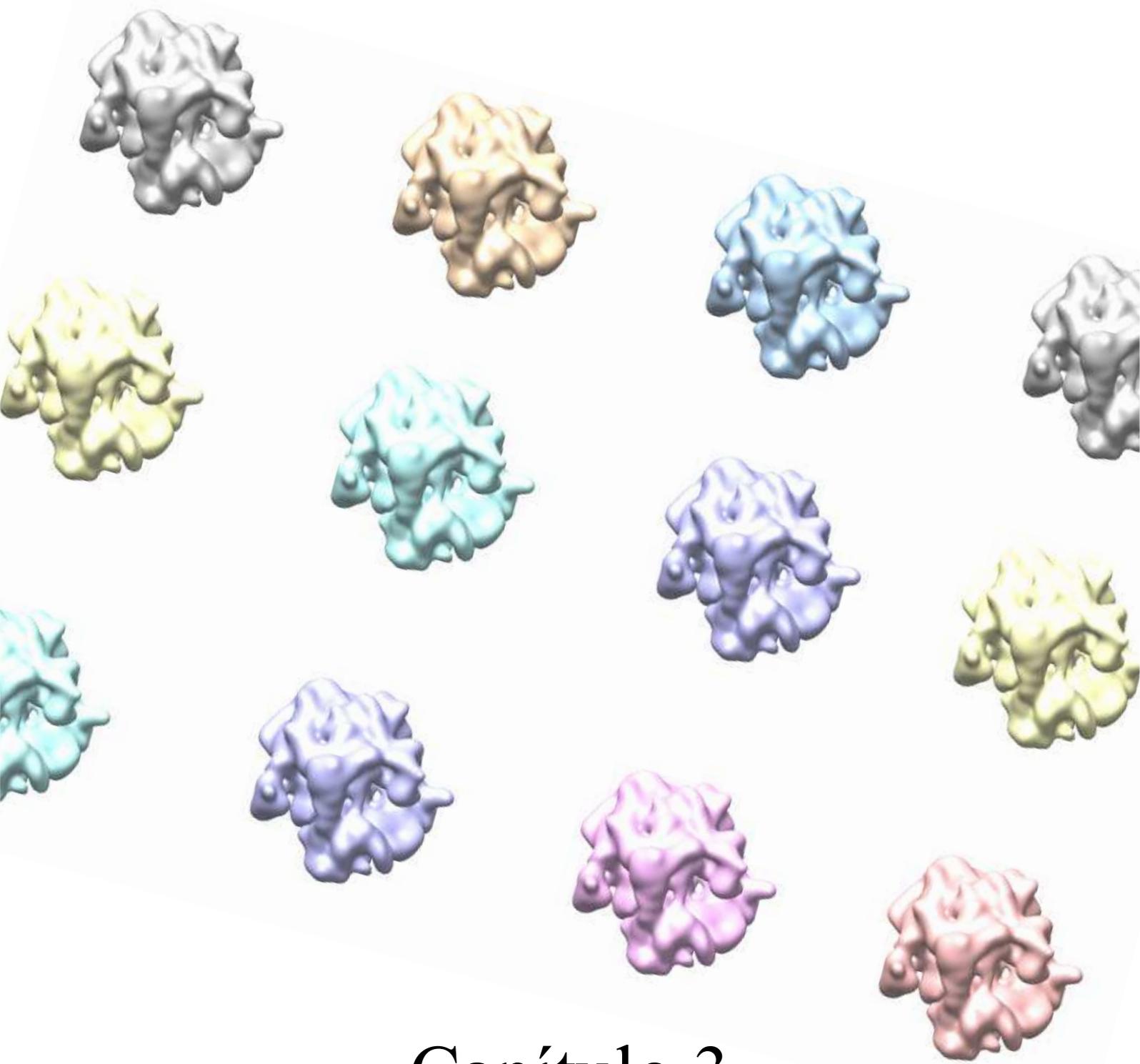
Mediante la técnica de partículas individuales se asume que todas las moléculas visibles en la micrografía tienen la misma estructura y conformación. Si esta asunción no es correcta, como el caso que nos ocupa, ya que los complejos ribosomales presentaban diferentes estados conformacionales, los métodos de clasificación deben ser utilizados con el fin de extraer subpoblaciones homogéneas de partículas.

En el presente estudio, para analizar diferencias conformacionales que se dan en la misma muestra, nos apoyamos en un método de clasificación no supervisada basado en procedimientos estadísticos de máxima verosimilitud (Scheres et al., 2007). El objetivo de la clasificación no supervisada es investigar la posible heterogeneidad existente en un set de partículas de crío-ME.

2.5. MODELADO DE IF2

Debido a la inexistencia de un homólogo para la estructura completa de IF2 en *E. coli*, se llevó a cabo una búsqueda de homólogos mediante BLAST (Altschul et al., 1997) de los subdominios de IF2. Se modelaron cada uno de los subdominios mediante el servidor Swiss-Model (Arnol et al., 2006), los modelos resultantes se ajustaron como cuerpos rígidos a los mapas de crio-ME en Chimera (Petersen et al., 2004) y se unieron un único modelo mediante el programa PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).

Cuando se utiliza un modelo realizado por homología en el ajuste a mapas de microscopía, el modelo puede sufrir distorsiones en loops, movimientos de elementos de estructura secundaria, u otros errores producidos por el mismo programa de alineamiento. Para solucionar este problema, finalmente se aplicó un método de ajuste flexible con el software Flex-EM (Topf et al., 2008), mediante el que la estructura de la proteína es optimizada simultáneamente utilizando el ajuste en el mapa de microscopía y restricciones estereoquímicas.



Capítulo 3

Complejos ribosomales de iniciación 30S

3.1 RESULTADOS

3.1.1. Clasificación y reconstrucción del complejo de iniciación 30S (30SIC)

En este estudio se realizó una caracterización estructural del complejo de iniciación ribosomal 30S (30SIC) mediante crio-ME y reconstrucción tridimensional. Los complejos se formaron *in vitro* con subunidades ribosomales 30S del organismo *E. coli*, los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3, ARNt y ARNm (002) junto con GDPNP, un análogo no hidrolizable del GTP. La reconstrucción tridimensional del complejo ribosomal se realizó utilizando el software SPIRE/SPIDER (Frank et al., 1996) y un total de 48.000 imágenes de partículas individuales se seleccionaron y contribuyeron al mapa inicial (Figura 3.1).

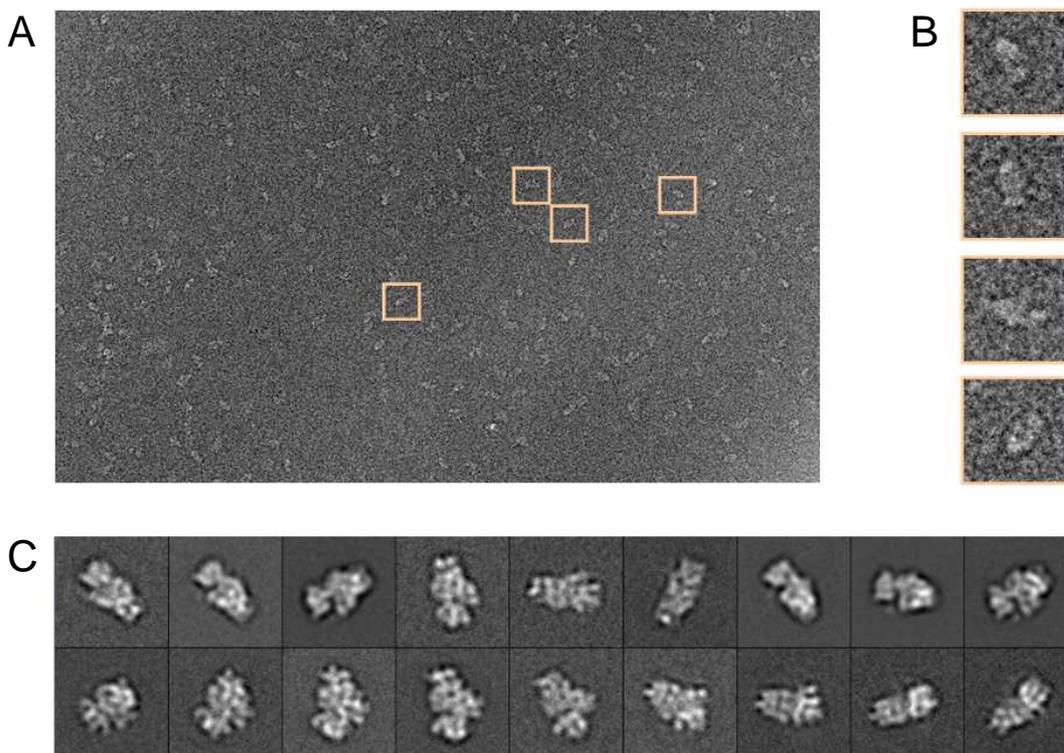


Figura 3.1. Microscopía electrónica de los complejos de iniciación 30S. (A) Micrografía de la muestra de 30SIC mediante crio-ME. (B) Galería de imágenes que muestran diferentes partículas individuales extraídas de la micrografía. (C) Galería de imágenes que muestran las medias de las partículas clasificadas por proyecciones.

El mapa inicial representaba la subunidad ribosomal 30S con una densidad atribuible al complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet} (*Figura 3.2.A.1*). Sin embargo, el aspecto que presentaban ARNt e IF2 no era muy coherente con su estructura. Además la región de interacción entre el ARNt iniciador e IF2 no estaba bien definida (flecha). Por otro lado los complejos ribosomales en la muestra presentaban diferente ocupación con respecto a los factores y ARNt. Todos estos elementos sugieren heterogeneidad estructural de la muestra, y por tanto se aplicó un método de clasificación no supervisada basado en procedimientos estadísticos de máxima verosimilitud (Scheres et al., 2007) que generó 2 clases que representaban 2 estados diferenciados. La clase 1, constituida por un 23% del total de partículas (11.182), mostraba la estructura de una subunidad ribosomal 30S (*Figura 3.2.A.2*) mientras que la clase 2, constituida por el restante 77% de partículas (36.818), mostraba la estructura de la subunidad 30S con el complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet} visiblemente mejorado, al igual que la región de interacción entre ARNt e IF2 (flecha *Figura 3.2.A.3*) y con una pequeña densidad extra sobre la plataforma de la subunidad 30S. Por otro lado, se estudió la presencia de ARNm en los mapas pertenecientes a ambas clases. Para ello se ajustó en ambos mapas la estructura cristalográfica de la subunidad 30S con la hélice SD-antiSD, formada por la región 5' del ARNm y la región 3' del 16S rRNA (Yusupov et al., 2001). La interacción SD-antiSD se mostró en los dos mapas por lo que el ARNm 002 estaba presente en ambos (*Figura 3.2.C*).

Por lo tanto, consideramos que tras aplicar el método de clasificación a nuestro set de partículas obtuvimos dos estados estructurales diferenciados. El primero, que muestra un ribosoma 30S con el ARNm unido a él (30S·ARNm o complejo 1). Y un segundo que muestra un complejo ribosomal de iniciación (30SIC o complejo 2). La resolución obtenida, aplicando un criterio de cutoff de 0.5, es de 16.8Å para el mapa total; 21Å para el mapa correspondiente a la clase 1 y 18.3 Å para el mapa correspondiente a la clase 2.

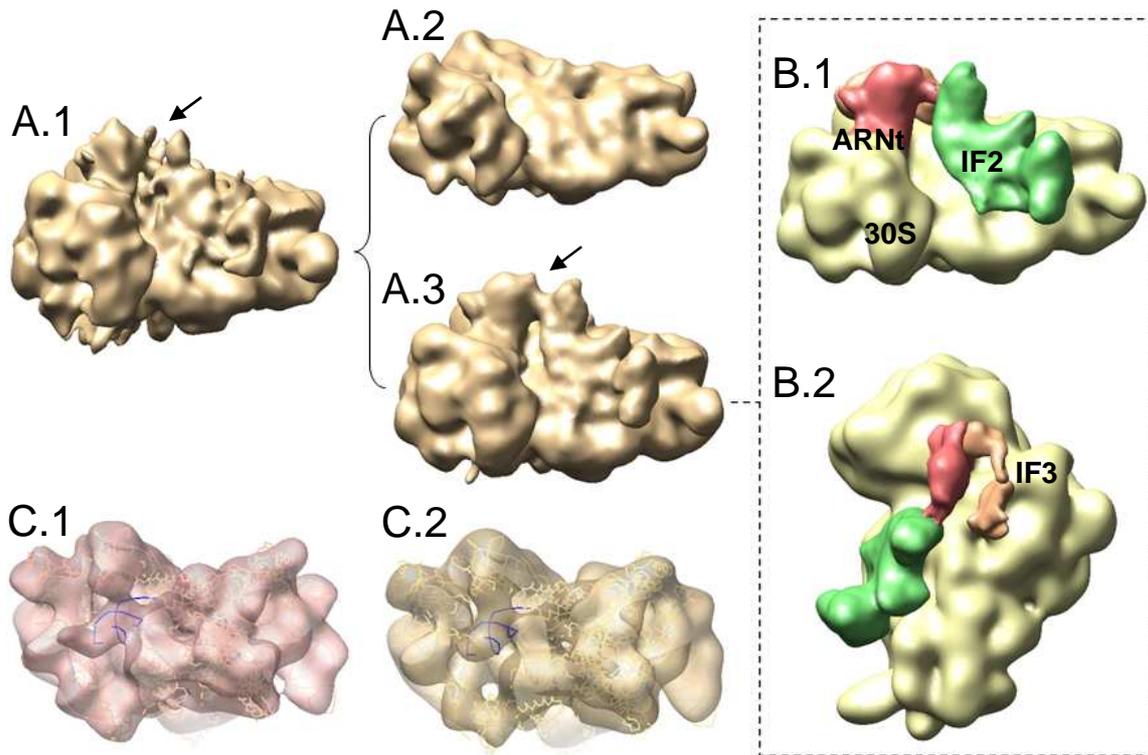


Figura 3.2. Clasificación y reconstrucción del complejo de iniciación. (A) Clasificación de los complejos ribosomales. El set total de partículas (48.000), que dio como resultado un primer mapa (A.1), se clasificó dando como resultado dos estados estructurales diferenciados. La clase 1 con 11.182 partículas dio como resultado una subunidad 30S (A.2) y la clase 2 con 36.818 partículas dio como resultado un complejo de iniciación 30S (A.3). El 30SIC se segmentó en cada uno de sus componentes (B). La vista lateral del 30SIC segmentado muestra la subunidad 30S en amarillo; el ARNt iniciador en rojo e IF2 en verde (B.1). La vista frontal muestra además a IF3 coloreado de naranja en la región de la plataforma (B.2). Presencia de ARNm 002 en los mapas (C). La estructura cristalográfica de la subunidad 30S unida al ARNm se ajustó en cada uno de los mapas y la interacción SD-antiSD formada por ARNm y el 16S rRNA de la subunidad 30S se representa en azul. Clase 1 (C.1) y clase 2 (C.2).

Con el objetivo de interpretar el volumen del 30SIC, se extrajo del mapa el volumen correspondiente a la subunidad 30S y se analizó la densidad restante. La densidad principal se correspondía con el complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet}. Además, otra densidad menor en la zona de la plataforma y el lateral del ARNt se apreciaba en el mapa. Para aislar correctamente dicha densidad, se sustrajeron del mapa los volúmenes correspondientes a la subunidad 30S, ARNt e IF2. El volumen resultante mostraba dos densidades que, de acuerdo con su posición y tamaño (Wickstrom et al., 1986; McCutcheon et al., 1999; Dallas & Noller., 2001; Fabretti et al., 2007),

fueron atribuidas a IF3. En los siguientes apartados se describirá con más detalle los diferentes componentes del complejo, su estructura y la posición que presentan en el 30SIC.

3.1.2. Rotación de la subunidad 30S en la formación del 30SIC

Uno de los aspectos más interesantes del 30SIC concierne al componente íntegramente ribosomal, la subunidad 30S. En la figura 3.3, se comparan las subunidades 30S correspondientes al complejo 1 (30S*ARNm) y complejo 2 (30SIC). Al realizar una superimposición de los mapas de manera que se produzca una máxima correlación entre la región del cuerpo de las subunidades, queda patente una rotación en el sentido de las agujas del reloj de la cabeza de la subunidad en el mapa correspondiente al 30SIC. Se realizó un ajuste rígido de la estructura cristalográfica de la proteína ribosomal S13 en cada una de las cabezas ribosomales con el objetivo de obtener un grado de rotación aproximado. La distancia de 10Å calculada para la posición de S13 entre los dos mapas se correlaciona con un ángulo aproximado de 5°, tomando un eje de rotación que pasa a través de un punto entre los puentes B3 y B5a de la hélice 44 (Valle et al., 2003). Este ligero cambio conformacional que sufre la cabeza de la subunidad 30S también ha sido descrita en el complejo de iniciación 70S (Allen et al., 2005) donde se definió como una rotación reminiscente del “ratcheting” que se observa en los complejos de pre-translocación (Valle et al., 2003; Julián et al., 2008; Agirrezabala et al., 2008). Sin embargo, el denominado “ratcheting” hace referencia al movimiento relativo entre subunidades y, en nuestro caso, se observa una rotación de la cabeza de la 30S con respecto al cuerpo de la subunidad. El hecho de que este movimiento se haya observado tanto en el 30SIC como en el 70SIC sugiere que esta reorganización conformacional de la subunidad 30S se produce en una fase previa a la unión de la subunidad 50S para formar el complejo de iniciación 70S que dará paso a un ribosoma preparado para comenzar el proceso de traducción.

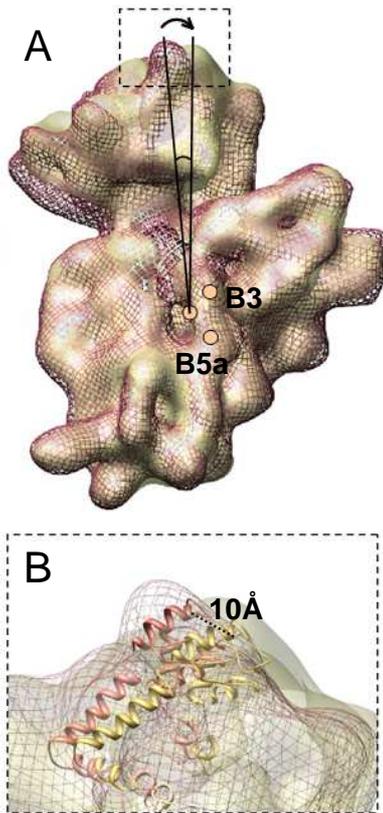


Figura 3.3. Rotación de la subunidad 30S en el 30SIC. (A) Superposición de los mapas del 30S·ARNm (representado como red en malla y coloreado en magenta) y el 30SIC (representado en semitransparente y coloreado en marrón). Si se considera la subunidad 30S como un cuerpo rígido, el vértice del ángulo de rotación podría posicionarse en un punto entre los puentes B3 y B5a de la hélice 44 (Valle et al., 2003). Considerando las posiciones de la proteína S13 en la cabeza de los mapas, el ángulo aproximado que genera la rotación es de 5°. (B) Vista cercana de la región de la proteína S13 en la cabeza de las subunidades- la distancia entre las dos posiciones de S13 es de 10Å.

3.1.3. Complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet} en el 30SIC

La densidad principal sobre la subunidad 30S se corresponde con el complejo formado por el ARNt de iniciación e IF2 (IF2·fMet-ARNt^{fMet}). El sitio de unión de IF2 en el complejo se corresponde con aquél de entrada de factores entre las subunidades (en el caso de complejos 70S) y es consistente con pruebas bioquímicas de IF2 y de su homólogo eIF5B (Marzi et al., 2003) y con anteriores estudios de microscopía de complejos ribosomales con IF2 (Allen et al., 2005; Myasnikov et al., 2005; Simonetti et al., 2008). Además, la localización de IF2 es similar a la de otros factores ribosomales GTPasas como EF-G (Agrawal et al., 1999) o RF-3 (Gao et al., 2007).

La densidad correspondiente a IF2 representa un volumen de dimensiones relativamente grandes que yace sobre la subunidad 30S, al contrario de cómo se mostró en un anterior 30SIC

del organismo *T. thermophilus*, en el que el único punto de apoyo de IF2 en la 30S se correspondía con una región del dominio V de IF2 (Simonetti et al., 2008). Llegados este punto, es necesario analizar la secuencia de IF2 en las diferentes organismos de estudio. Como ya se ha especificado en el capítulo de introducción, el extremo C-terminal de IF2, que se corresponde con los dominios comprendidos entre IV y VI-2, presenta una secuencia muy conservada entre las especies, mientras que el extremo N-terminal, que se corresponde con los dominios I, II y III, varía en cuanto a composición aminoacídica y en cuanto a longitud de la secuencia, estando incluso ausente en arqueas (Steffensen et al., 1997). Específicamente, la secuencia de IF2 en *T. thermophilus* cuenta con 571 aminoácidos, mientras que en *E. coli* IF2 tiene una secuencia de 890 aminoácidos. En un estudio previo de crio-ME con el 70SIC (Allen et al., 2005) la estructura de IF2 de *E. coli* fue modelada a partir de la estructura cristalográfica resuelta de una proteína homóloga de la archa *Metanobacterium thermoautotrophicum* (Roll-Mecak et al., 2000). Sin embargo, como ya se ha mencionado, IF2 de arqueobacterias carece del extremo N-terminal del factor, que en *E.coli* lo constituyen 390 aminoácidos.

Al no disponer de una estructura cristalográfica fiable de IF2, se decidió generar un modelo de esta proteína utilizando su secuencia completa. Para ello primeramente separamos la secuencia de IF2 en su región conservada C-terminal con disponibilidad de homólogos estructurales y su región no conservada N-terminal con deficiente información estructural. Mediante búsquedas de homólogos de los subdominios de IF2 (*Figura 3.4*) se generó un modelo utilizando el servidor Swiss-Model.

Para la región C-terminal, alineamos los correspondientes dominios con respecto a las estructuras homólogas resueltas de otros organismos (1G7S.pdb; 3CW2.pdb; 1Z9B.pdb y 1D1N.pdb) utilizando el software para alineamiento múltiple de secuencias T-Coffe y seleccionamos como referencia aquel alineamiento de mayor similitud. Seguidamente, mediante el servidor Swiss-Model, generamos un modelo para cada uno de los dominios utilizando como referencia el homólogo elegido. De esta manera, los dominios IV y V se modelaron con la estructura cristalográfica de la proteína ortóloga aIF5B de la archa *M. thermoautotrophicum*. (código PDB 1G7S; Roll-Mecak et al., 2000). Por otro lado, los dominios VI-1 y VI-2 se modelaron utilizando las estructuras del organismo *Bacillus stearothermophilus*, obtenidas mediante resonancia magnética nuclear, que mostraban una alta similitud en la secuencia (código PDB 1Z9B, Wienk et al., 2005; código pdb 1D1N, Meunier et al., 2000).

El modelado de la región N-terminal de la proteína supuso mayor dificultad debido a que la única estructura que se encuentra disponible de esta región es un pequeño subdominio del dominio I, que consiste aproximadamente en 50 aminoácidos, que fue resuelta mediante NMR

(Laursen et al., 2003). Para el dominio III y parte del dominio II, se utilizó como referencia para el alineamiento con ClustalW la estructura del homólogo de IF2 del organismo *Sulfolobus solfataricus* (Stolboushkina et al., 2008) y luego se generó el modelo correspondiente mediante SwissModel. Por último, para el vacío existente en la secuencia del modelo entre los aminoácidos 51 y 185 se realizó una búsqueda para un homólogo remoto mediante BLAST y se halló una estructura de una proteína bacteriana similar a la dinamina (Low & Lowe, 2006), que de la misma manera se utilizó para el alineamiento con ClustalW y generar el modelo correspondiente con SwissModel.

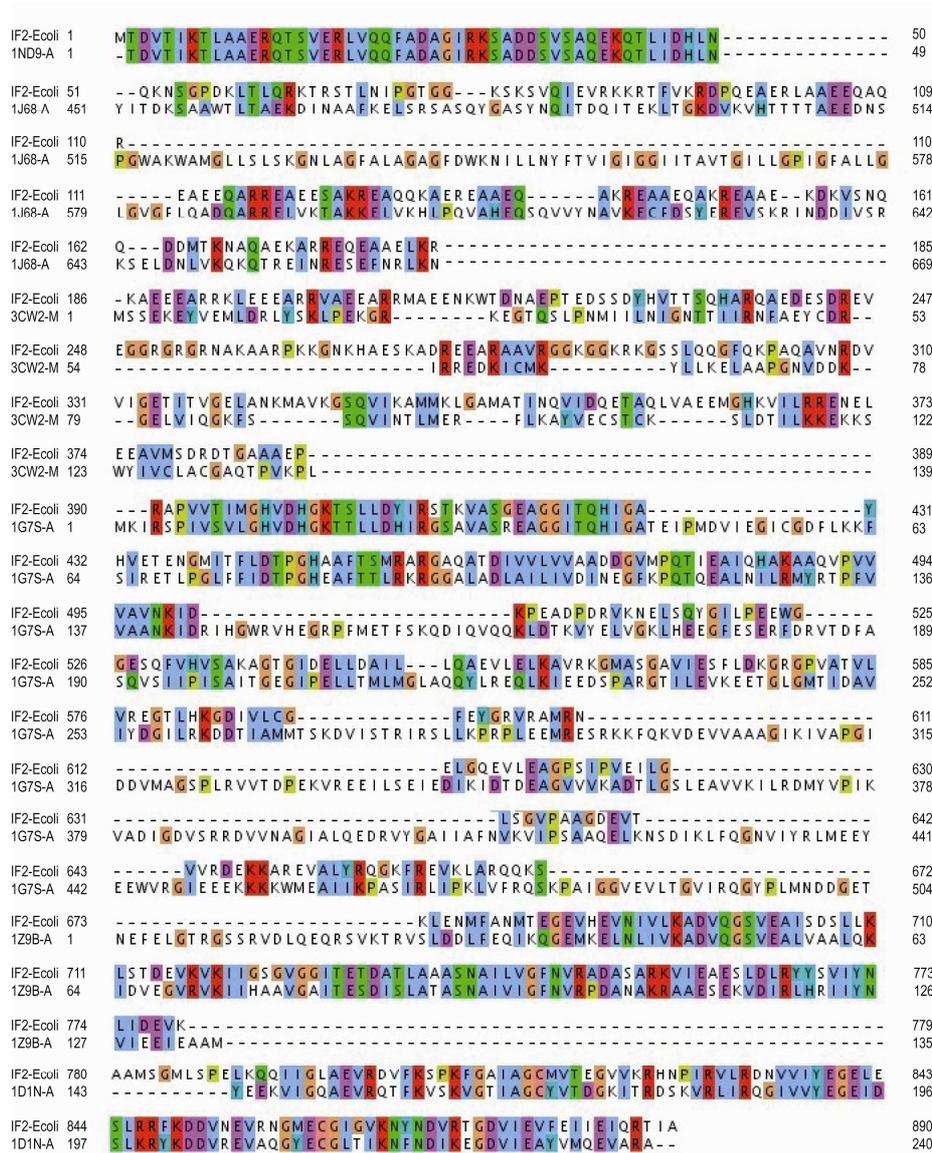


Figura 3.4. Secuencia de alineamiento entre IF2 de *E. coli* y las secuencias de las proteínas utilizadas para generar el modelo. Los códigos PDB de las diferentes coordenadas atómicas están indicados a la izquierda de la figura.

Una vez obtenidos todos estos sub-modelos, se realizó un fitting rígido de cada una de ellos independientemente en el mapa de IF2 en Chimera (Petersen et al., 2004). Después, se combinaron en una única estructura utilizando el software Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997). Finalmente se realizó un ajuste de las coordenadas atómicas en el mapa de crio-ME siguiendo un procedimiento de ajuste flexible combinado con dinámica molecular mediante el software Flex-EM (Topf et al., 2008) (Figura 3.5).

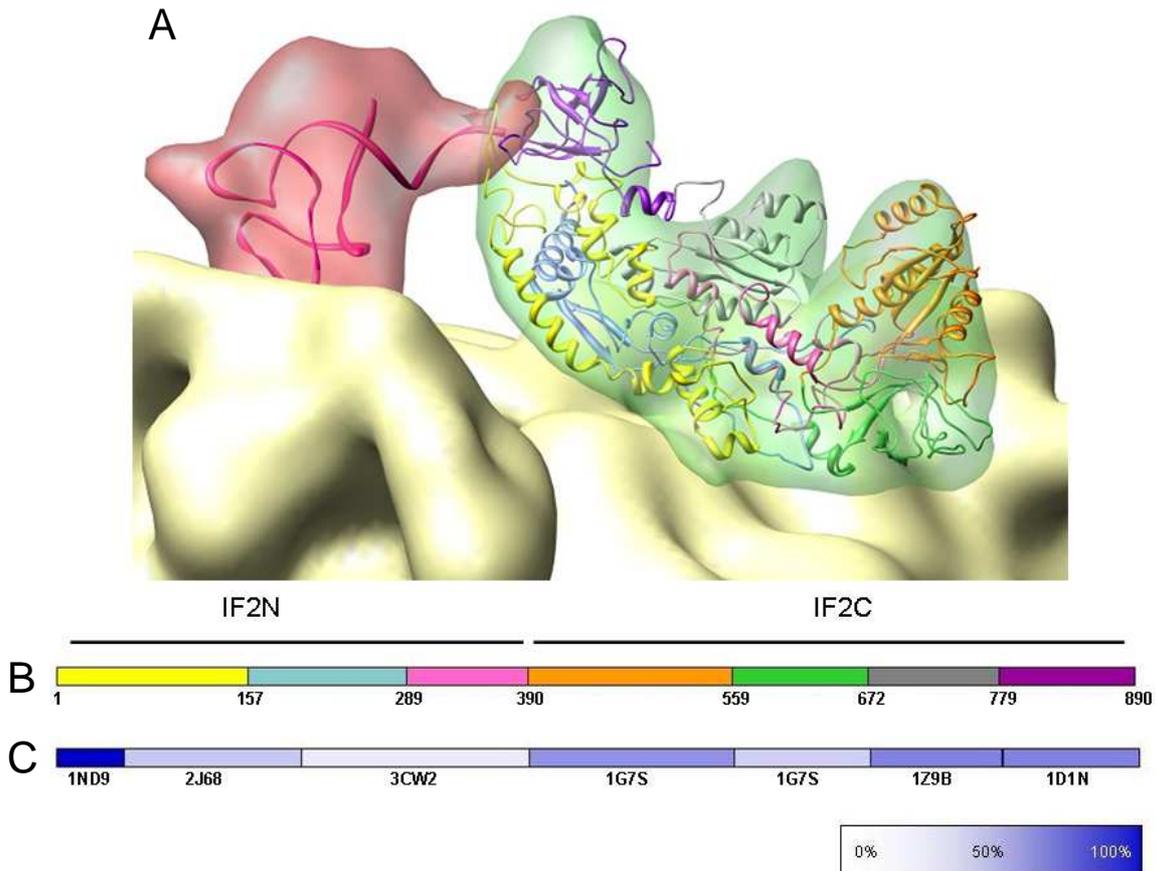


Figura 3.5. Modelado de IF2 y similitud con la secuencia. (A) El modelo generado de IF2 se ajustó a su correspondiente densidad en el 30SIC y se coloreó por dominios. Dominio I (amarillo), Dominio II (azul), Dominio III (rosa), Dominio IV (naranja), Dominio V (verde), Dominio VI-1 (gris) y Dominio VI-2 (violeta). **(B)** Representación de la secuencia de IF2 con los dominios coloreados según el modelo en la figura A. **(C)** Similitud entre la secuencia de IF2 y la secuencia de las estructuras utilizadas para realizar el modelo.

El modelo resultante muestra una estructura alargada que recuerda a su homólogo aIF5B de *M. thermoautotrophicum* en su región C-terminal. Sin embargo, el aspecto general es claramente distinto debido sobre todo a la extensión de la región N-terminal que tiene un contenido

significativo de segmentos helicoidales, hecho que es consistente con anteriores estudios realizados sobre esta región de la proteína (Laursen et al., 2004).

La unión de IF1 sobre la subunidad 30S ha sido estudiada en profundidad mediante diferentes metodologías. IF1 se une a la 30S en una hendidura entre el loop 530, la hélice 44 del 16S rRNA y la proteína ribosomas S12, en las proximidades del sitio A (Carter et al., 2001). La presencia de IF1 en nuestro mapa no es obvia, debido a que su posición en el mapa esta cubierta por la densidad de IF2. Sin embargo, cuando se ajusta la estructura cristalográfica de la subunidad 30S unida a IF1 (Carter et al., 2001) se demuestra que hay sitio para IF1 en nuestro mapa. Además, estudios del 30SIC mediante FRET mostraron que IF1 se encuentra presente en el complejo de iniciación hasta después de la unión de la subunidad 50S, cuando se produce la liberación de los factores (Milon et al., 2007).

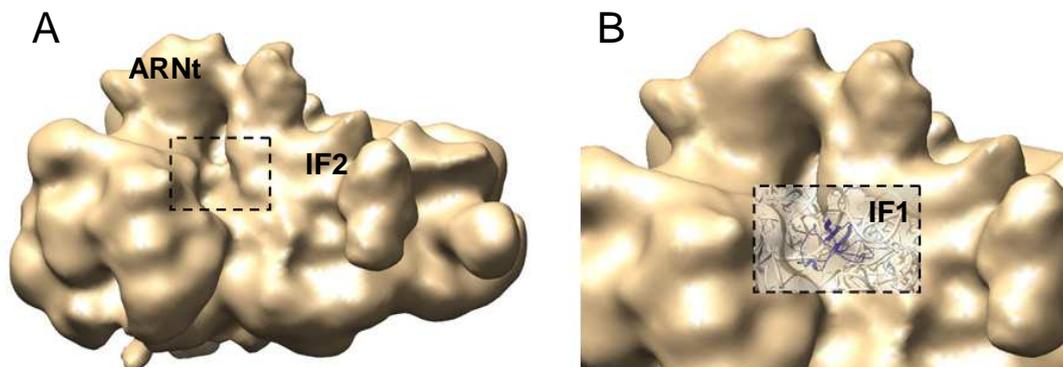


Figura 3.6. Posición de IF1 en el 30SIC. La estructura cristalográfica de la subunidad 30S-IF1 de *T. thermophilus* ajustada a nuestro mapa 30SIC. La posición de IF1 esta representada en semitransparente para visualizar la estructura de IF1 (coloreada en azul) en el interior de nuestro mapa.

Por lo tanto, consideramos que IF1 está presente en nuestro mapa de 30SIC pero con la resolución que hemos alcanzado no puede ser identificado debido a que su posición está cubierta por IF2 y sumergido en la densidad de la subunidad 30S.

En lo referente a la conformación del ARNt iniciador en el 30SIC, éste ya ha sido previamente visualizado en anteriores estudios de crio-ME (Allen et al., 2005; Simonetti et al., 2008). En nuestro complejo, el extremo terminal CCA del ARNt iniciador esta orientado hacia el β -barrel formado por el dominio VI-2 de IF2, el que se ha sugerido que contiene el sitio de unión íntegro para el ARNt iniciador (Spurio et al., 2000). Para analizar la conformación del ARNt de iniciación, ajustamos la estructura cristalográfica del ARNt de iniciación (2FMT.pdb) a nuestro

mapa y a la vez ajustamos la estructura cristalográfica de la subunidad 30S del organismo *T. thermophilus* con los ARNts A, P y E (1JGO.pdb). Al comparar nuestro ARNt iniciador con respecto a los ARNts A, P y E, se observa que el extremo del anticodón se encuentra posicionado en el sitio P, sin embargo, el ARNt está ligeramente inclinado hacia el sitio E (*Figura 3.7.A*). Esta posición del ARNt de iniciador, denominada P/I, fue descrita en anteriores complejos de iniciación (Allen et al., 2005; Simonetti et al., 2008). Sin embargo, y al contrario de lo que se observaba en los estudios previos de complejos de iniciación, el extremo terminal CCA está orientado hacia el sitio A, tal y como se puede visualizar desde una vista superior del complejo (*Figura 3.7.B*). Esta orientación del extremo CCA del ARNt está definida por la interacción con IF2, y más concretamente, con el dominio VI-2 de IF2. La diferente orientación de los extremos terminales CCA observado en ambos mapas puede deberse a que IF3, presente únicamente en nuestro complejo, favorece el posicionamiento del ARNt para que interactúe de manera correcta con IF2, orientando su extremo CCA hacia el factor.

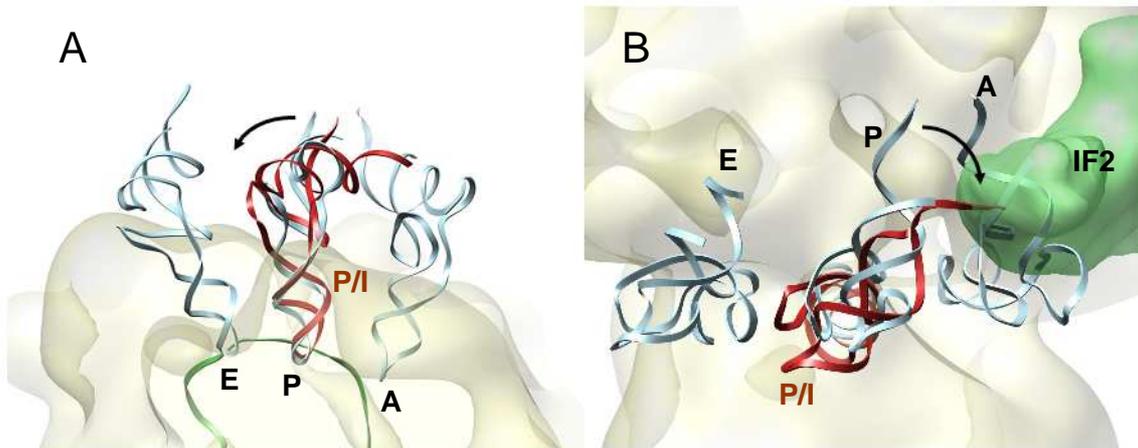


Figura 3.7. Conformación del ARNt iniciador en el 30SIC. La estructura de la subunidad 30S con los ARNts A, P y E (1JGO.pdb) se ajustó al mapa y sólo los ARNts son visualizados en azul claro. Por otra parte, la estructura cristalográfica del ARNt de iniciación (2FMT.pdb) se ajustó al mapa del ARNt y se visualiza en rojo. (A) Desde la vista frontal del complejo se observa una pequeña inclinación del ARNt de iniciación con respecto al ARNt P (flecha). (B) Desde la vista superior se observa una desviación del extremo CCA del ARNt de iniciación hacia el sitio A para interactuar con IF2 (en verde semitransparente).

Para estudiar las interacciones que mantiene IF2 sobre la subunidad se ajustó la estructura cristalográfica de 30S unida al factor IF1 (Carter et al., 2001) a nuestro mapa y por otro lado se ajustó el modelo de IF2 a su densidad correspondiente. La posición de IF2 sobre la subunidad 30S genera extensas conexiones con el 16S rRNA, ya que la superficie de la subunidad 30S está dominada principalmente por rRNA. (*Figura 3.8*). Los dominios IV y V de IF2 se encuentran próximos a las hélices 5 y 14 del 16S rRNA. En el estudio anterior del 30SIC (Simonetti et al.,

2008) estas dos hélices eran los únicos puntos de anclaje de IF2 en la subunidad. También en los complejos de iniciación 70S (Myasnikov et al., 2005) se observaban estas conexiones, y además con las hélices 17, 8, 6 del 16S rRNA y con la proteína ribosomal S12. Según el modelo que hemos generado para IF2, la región de IF2 que conecta con la superficie de la subunidad es la N-terminal, y más específicamente los dominios I y II. Este hecho es consistente con estudios de ensayos de unión IF2 con la subunidad 30S *in vitro* en los que se mostró que la región N-terminal de la proteína aislada tiene afinidad *per se* para unirse a la subunidad 30S, mientras que la región C-terminal carece de ésta. Además el dominio II estaba directamente involucrado en esta interacción (Moreno et al., 1998).

Otros puntos de interacción de IF2 en el 30SIC son IF1 y la proteína S12. En cuanto a la interacción entre IF2 e IF1, estudios previos del 30SIC y del 70SIC han tratado la cuestión de si estos dos factores interactúan entre sí en el ribosoma, un aspecto que tiene que ver con la estabilización de IF2 por IF1 y en el incremento en la afinidad de IF2 sobre la 30S también como resultado de la acción de IF1 (Stringer et al., 1977; Celano et al., 1988; Caserta et al., 2006). Además la interacción IF1-IF2 podría ser la base de cómo IF2 está involucrada en la liberación de IF1 en el 30SIC. Por otro lado, el incremento en la estabilidad termodinámica del complejo 30S·IF2 en presencia de IF1 y su reducción tras la disociación de IF1, durante la formación del 70SIC, podría afectar también al reciclaje del ribosoma 70S (Gualerzi et al., 2001).

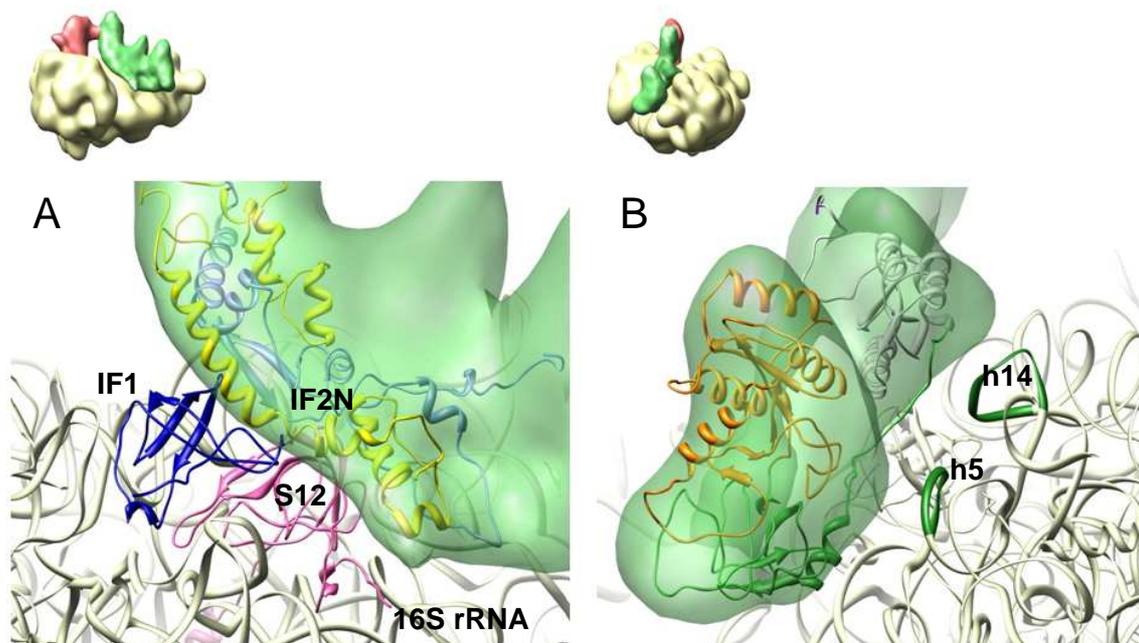


Figura 3.8. Puntos de anclaje y de interacción de IF2 en el complejo. (A) La región N-terminal de IF2 (IF2N) mantiene interacción con el 16S rRNA, IF1 y la proteína ribosomal S12. (B) Los dominios IV (naranja) y V (verde) se encuentran en las proximidades de las hélices 5 y 14 del 16S rRNA.

3.1.4. Localización de IF3 en el 30SIC

El sitio de unión de IF3 en la 30S ha sido un tema muy controvertido, ya que diferentes estudios posicionaban los dominios de IF3 en diferentes regiones de la subunidad. Además, no se ha podido obtener un mapa del complejo 30SIC con IF3 y el resto de los factores de iniciación unido al ribosoma. Gran parte de esta controversia se debe a la ambigüedad en la asignación de los dominios en los mapas de microscopía debido a su similar tamaño. Las densidades que nosotros observamos correspondientes a los dominios de IF3 están suficientemente definidas y permiten una clara de asignación de los dominios N- y C-terminal en el mapa. De hecho, las estructuras cristalográficas de IF3C e IF3N encajan muy bien en las densidades (*Figura 3.9.A*).

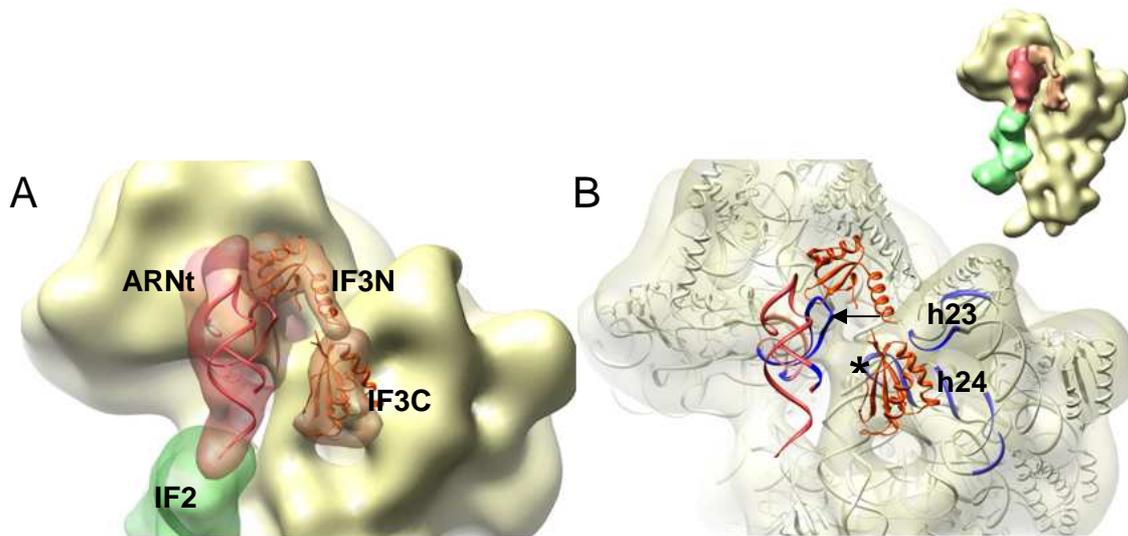


Figura 3.9. IF3 en el 30SIC (A) Coordenadas atómicas de IF3 (código PDB de IF3N 1TIF, Biou et al., 1995; código PDB de IF3C 2IFE, García et al., 1995) en naranja y del ARNt iniciador en rojo ajustadas a las densidades correspondientes en el mapa del 30SIC representadas en semitransparente. En la región superior de las figuras se representa en miniatura la orientación de las vistas. **(B)** En la misma orientación que en A se representa la subunidad 30S en semitransparente con las regiones del ARNr 16S próximas a IF3 según estudios de marcaje químico (Dallas & Noller., 2001) representadas en azul. El asterisco señala la posición del loop alrededor del nucleótido 790 del ARNr 16S.

El dominio C-terminal (IF3C) está localizado en la región de la plataforma de la subunidad 30S, próximo a la hélice 24 del 16S rRNA, hecho que concuerda con la localización de IF3C en estudios de marcaje químico (hidroxyl radical footprinting) en los que los puntos de interacción con IF3C se concentraban en las hélices 23 y 24 del ARNr 16S (*Figura 3.9.B*) (Dallas &

Noller., 2001). Además, la región donde se encontró una huella más intensa fue en el loop 790, que se corresponde precisamente con la localización de IF3C en nuestro complejo. En lo referente al dominio N-terminal (IF3N), existe información contradictoria ya que no existe una estructura de alta resolución del dominio sobre la subunidad 30S y los estudios bioquímicos la posicionan en diferentes regiones. En el mapa de 30SIC que presentamos aquí, localizamos IF3N en una región entre el ARNt iniciador y la plataforma, de manera que la región globular mantiene una interacción directa con el loop D del ARNt. De nuevo, este posicionamiento de IF3N es consistente con el estudio de crosslinking en el que se encontraron residuos de IF3N que interactuaban con los nucleótidos 13-14 del loop D del ARNt (flecha). (Dallas & Noller., 2001).

Por otro lado, la densidad de IF3 en nuestro mapa se puede visualizar completamente a un valor de 1.0 sigma, mientras que ARNt e IF2 pueden ser visualizados a un valor de 1.6 sigma (*Figura 3.10*). Este hecho nos está indicando un nivel de ocupación menor para IF3 en el complejo de iniciación.

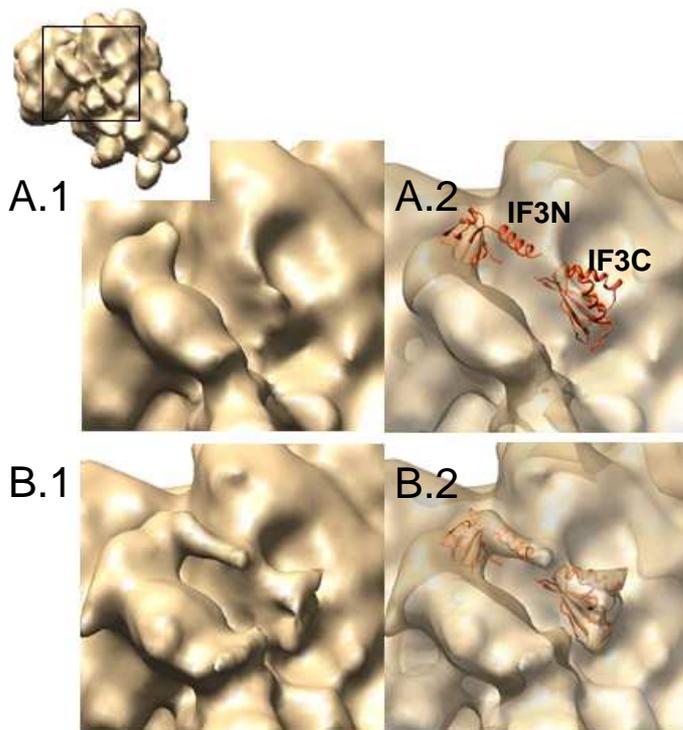


Figura 3.10. Posición y ocupación de IF3 en el 30SIC. Ocupación de IF3 (A). Mapa 30SIC a un valor de sigma de 1.6 representado en sólido (A.1) y en semitransparente con las coordenadas atómicas de los dominios de IF3 (A.2). Mapa 30SIC a un valor de sigma de 1.0 representado en sólido (A.3) y en semitransparente con las coordenadas atómicas (A.4).

3.2 DISCUSIÓN

En este estudio, presentamos la estructura completa del 30SIC del organismo *E. coli* mediante crio-ME y procesamiento de partículas individuales. Además se han aplicado técnicas de clasificación tridimensional para separar el set de datos que presentaban diferencias en cuanto a su estructura.

Durante los pasados años se han caracterizado estructuralmente varios complejos de iniciación 70S y pseudo-complejos de iniciación 30S mediante estas mismas técnicas. Estos estudios comprenden el 70SIC con IF1, IF2 e IF3 (Allen et al., 2005); 70SIC con IF2 con los nucleótidos GMPPCP y GDP (Myasnikov et al., 2005); y más recientemente, el 30SIC con IF1 e IF2 (Simonetti et al., 2008); todos ellos con un ARNm cognato y ARNt de iniciación. Sin embargo, la estructura de un complejo de iniciación 30S completo, con los tres factores de iniciación se ha mantenido esquiva. El anterior estudio sobre el 30SIC (Simonetti et al., 2008) obvió la presencia de IF3 con el fin de evitar heterogeneidad en la muestra. Sin embargo, la presencia de todos los participantes de la iniciación en la muestra nos ofrece una visión más realista de los que está ocurriendo durante este proceso, ya que los tres factores son necesarios en la traducción procariota.

Por otra parte, la mayor parte de la información genética y bioquímica que tenemos es relativa al organismo *E. coli*. Por tanto obtener una estructura del 30SIC de este organismo (el anterior 30SIC fue del organismo *T. thermophilus*) nos aportará mayor confianza a la hora de relacionar la información bioquímica con nuestros datos estructurales.

Dos cuestiones relevantes acerca de los mecanismos de iniciación de la síntesis proteica en procariotas, y más concretamente en *E. coli*, pueden ser discutidas tras la obtención de este mapa completo del 30SIC. Una de ellas hace referencia a la estructura de IF2 y a las interacciones que el factor mantiene con el resto de los componentes del complejo. La otra cuestión hace referencia a las implicaciones que tiene la conformación del 30SIC en la formación del 70SIC que proseguirá con el comienzo de la etapa de elongación.

3.2.1 Interacciones de IF2 sobre la subunidad ribosomal

De entre los tres factores de iniciación que gobiernan cinéticamente la iniciación de la traducción, IF2 es el que contribuye en el proceso a través de más pasos. IF2 se une a la subunidad 30S y promueve la primera unión codon-independiente y después codon-dependiente del ARNt iniciador (La Teana et al., 1996). Anteriormente se pensaba que el ARNt iniciador se unía al ribosoma en la forma de un complejo ternario junto con IF2, al igual que ocurre con su homólogo en eucariotas. Sin embargo, hoy se sabe que IF2 unido a la 30S promueve la incorporación del ARNt de iniciación al complejo proporcionándole puntos de anclaje o induciendo una conformación en la 30S favorable para su unión (Milon et al., 2010). Tras la formación del 30SIC, IF2 estimula la asociación de la subunidad 50S al complejo y posiblemente la liberación de IF1 e IF3 del complejo (Myasnikov et al., 2009). Finalmente permite el ajuste del ARNt de iniciación en el sitio P, donde puede formar el primer enlace peptídico con el aminoacil-ARNt unido al segundo codón que ha sido trasladado al ribosoma a través del complejo ternario EF-Tu·GTP·aa-ARNt.

La disponibilidad de estructuras de alta resolución del ribosoma o factores ribosomales mediante cristalografía o NMR es decisiva para una interpretación detallada de los mapas de crio-ME ya que el ajuste de estas estructuras en el mapa permite el análisis con una mayor precisión que la resolución nominal obtenida en los mapas. Debido a que la estructura cristalográfica de IF2 no está disponible (intentos de cristalizarla no han dado resultado), previas interpretaciones de mapas del 30SIC de *T. thermophilus* y 70SIC de *E. coli* han utilizado la estructura cristalográfica del factor aIF5B perteneciente a la arquea *M. thermoautotrophicum* (Roll-Mecak et al., 2000) o modelos de homología derivados de él a pesar de que aIF5B carece de la región N-terminal de la proteína. Por ello, cabe preguntarse hasta que punto los modelos creados por homología de la estructura aIF5B son fiables a la hora de interpretar mapas de *E. coli* o *T. thermophilus*. Además las estructuras resueltas mediante NMR del extremo (51 aminoácidos) N-terminal de IF2 en *E. coli* (Laursen et al., 2003), así como del dominio C-terminal de IF2 en *B. stearothermophilus* (Wienk et al., 2005) han sido caracterizadas permitiendo la descripción de características específicas del IF2 bacteriano.

Consideramos que el modelo de IF2 que se ha generado en este estudio es más realista que los anteriores en los que han utilizado la estructura de aIF5B ya que considera la longitud total de la secuencia de la proteína. Además se ajusta perfectamente a su correspondiente densidad en el mapa del 30SIC, al que consideramos igualmente una estructura realista del complejo debido a que todos sus componentes están presentes.

En cuanto a la interacción entre IF1 e IF2, estudios iniciales entre factores de iniciación en *E. coli* (Boileau et al., 1983) mostraron cross-linking entre los factores IF1 e IF2 y entre los factores IF2 e IF3. Además también se identificó una interacción entre IF2 y S12. Estos resultados son consistentes con nuestro mapa y modelo de IF2. Por otro lado, estudios de mutagénesis dirigida (Kapralou et al., 2008) pusieron de manifiesto que en los organismos termófilos *T. thermophilus* y *B. stearothermophilus*, IF1 no promovía la unión de la región N-terminal de IF2 a la subunidad 30S. Además, en un estudio previo del 30SIC en *T. thermophilus* (Simmonetti et al., 2008), no mostraba una interacción IF1-IF2, de hecho, estas dos proteínas tenían situaciones muy distantes en el complejo ribosomal. Esta discrepancia en los resultados puede ser consecuencia de las diferencias de la región N-terminal de IF2 en los distintos organismos de estudio, ya que esta región es la que mantiene la interacción con la 30S en el complejo. IF2N en *E. coli* cuenta con 390 aminoácidos mientras que en *T. thermophilus* cuenta con 71 aminoácidos. La interacción IF1-IF2 podría ser una característica no conservada en todas las especies, como consecuencia de la no conservación de la región N-terminal de IF2. En este sentido, resulta interesante el hecho de que el factor IF2 mitocondrial contiene una secuencia de inserción que corresponde a una función parcial de IF1 (Gaur et al., 2008), ejemplo en el que la funcionalidad de ambos factores está unida. Además, los homólogos eucariotas de IF1 e IF2, eIF1A y eIF5B, interactúan en el complejo ribosomal 43S (Marintchev et al., 2003).

Los resultados que hemos obtenido en este estudio sugieren que, al menos en *E. coli*, IF2 e IF1 interactúan en el 30SIC. Por lo tanto, una posible explicación para el incremento de la afinidad de IF2 hacia el complejo por IF1 podría deberse a un contacto directo entre ambos factores. En el estudio previo del 30SIC, donde no observaban conexión entre factores, argumentaban que la estimulación de la función de IF2 por IF1 podría deberse a los cambios conformacionales que se producían en la 30S tras la unión de IF1 (Carter et al., 2001), de manera que estos efectos indirectos no requieren de interacción entre factores. La justificación es razonable, sin embargo, el mecanismo no puede explicar la disociación de IF1 del complejo mediante IF2. En nuestra estructura, IF2, o más bien, un cambio conformacional en IF2 tras la unión de la 50S, podría desestabilizar la unión de IF1 por la subunidad, provocando la liberación de IF1 del complejo mediante un mecanismo de contacto directo.

3.2.2 Implicaciones del 30SIC en la formación del 70SIC

La iniciación de la síntesis proteica en bacterias implica varios acontecimientos que dan como resultado un ribosoma 70S con el ARNt iniciador y el ARNm unido a él para formar un complejo funcional preparado para iniciar la fase de elongación de la traducción (Tomsic et al., 2000). Durante la transición del 30SIC al 70SIC y el siguiente paso de iniciación a elongación, los factores IF1 e IF3 son liberados del complejo, IF2 hidroliza el nucleótido GTP al que está unido y también se libera del complejo, el extremo aceptor del ARNt de iniciación se convierte en un sustrato para el centro de la peptidil-transferasa en la subunidad 50S y se forma el primer enlace peptídico tras la incorporación de un nuevo ARNt a través del complejo ternario EF-tu-GDP-ARNt (Gualerzi & Pon., 1990). Con el propósito de investigar las implicaciones de la estructura obtenida del 30SIC en el ensamblaje de la subunidad 50S y formación del 70SIC, ajustamos a nuestro mapa la subunidad ribosomal 50S utilizando como guía para el alineamiento entre las subunidades el mapa obtenido por crio-ME del 70SIC (Allen et al., 2005).

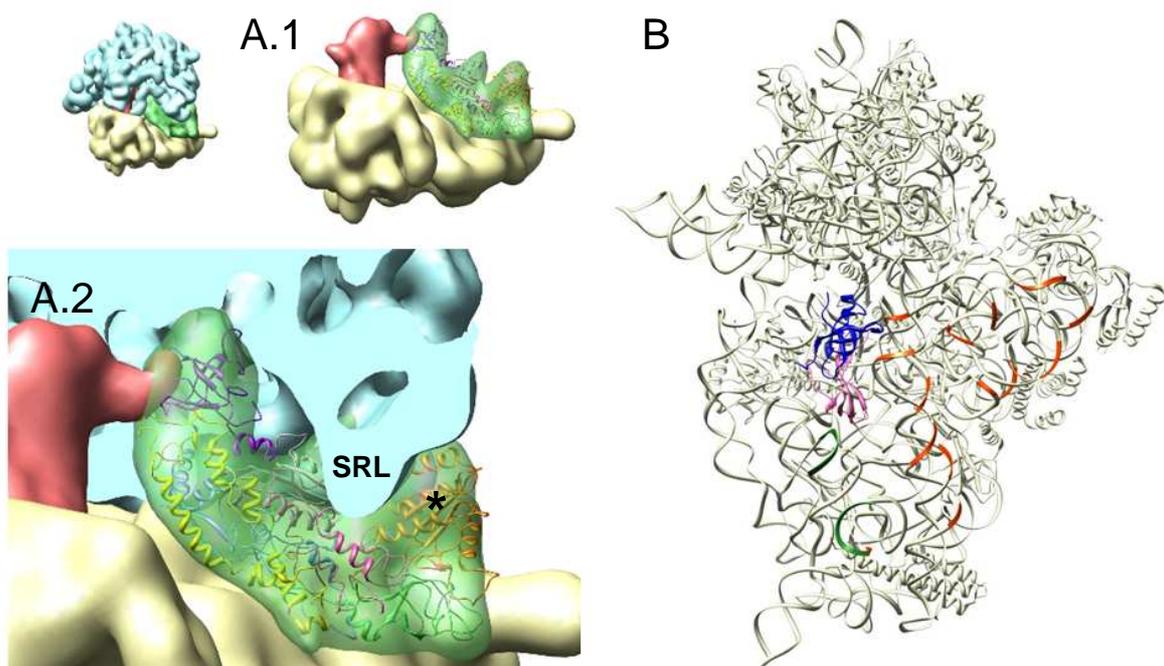


Figura 3.11. Ensamblaje de la subunidad 50S en el 30SIC. (A.1) Mapa del 30SIC con el modelo de IF1 ajustado a su densidad. (A.2) La subunidad ribosomal 50S se ajustó al mapa del 30SIC y la superficie de interacción entre 50S e IF2 se visualiza mostrando el molde de IF2 en la región del Sarcin Ricin Loop (SRL) y su conexión con la región C-terminal de la proteína y, mas específicamente, con el dominio *GTPasa* (dominio V) coloreado en naranja (asterisco). (B) Estructura de la subunidad 30S donde se representan los puntos de interacción con IF2; IF1 (azul), S12 (rosa) y h5 y h14 (verde) y los puentes entre subunidades (naranja).

El contacto más importante, o al menos el más extenso en el ribosoma 70S tras la incorporación de la subunidad 50S a nuestro complejo, es el formado por el complejo ARNt-IF2. Anteriormente se ha revelado que el complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet} favorece la unión del 50S al crear una mayor superficie de contacto entre subunidades (Carter et al., 2005). El mapa del complejo IF2·fMet-ARNt^{fMet} que presentamos en este estudio no sólo incrementa la superficie de contacto con la 50S, sino que sirve de molde para éste. En la *figura 3.11.A* se muestra el perfecto ensamblaje que se da entre la superficie de la 50S e IF2. Este hecho es más evidente en la región del Sarcin Ricin Loop (SRL) del 23S rRNA de la subunidad 50S. La región del SRL es el sitio de unión a factores ribosomales y es esencial para la consecución de los pasos en la traducción que requieren la hidrólisis de GTP unida a los factores. Esto es consistente con el hecho de que en nuestro ajuste la región SRL se encuentra en contacto con el dominio GTPasa de IF2 (dominio V). El ajuste tan riguroso entre el volumen de IF2 y la subunidad 50S sugiere un mecanismo físico implicado en el ensamblaje entre subunidades. Además, los puentes entre subunidades generados tras el ensamblaje del ribosoma 70S no se ven afectados con la unión de IF2 a la subunidad 30S (*Figura 3.11.B*).

Por lo tanto, con respecto a IF2 en el 30SIC, su conformación y posicionamiento favorece la unión de la subunidad 50S al complejo posibilitando la creación de puentes entre subunidades, que implican principalmente regiones del rRNA, y estableciendo nuevos puntos de interacción entre IF2 y la subunidad 50S.

Por otro lado, al ajustar la estructura de la subunidad 50S sobre nuestro mapa, la densidad correspondiente a IF3C se superpone a una región de contacto entre subunidades, el puente B2b, que en la subunidad 50S consiste en las posiciones 1836,1837,1922,1919,1920 y 1932 del 23S rRNA (*Figura 3.12*). A pesar de que la densidad de IF3C es pequeña en relación con la masa de la subunidad 50S, la localización de IF3C en el complejo previene el acceso de la 50S a una amplia área que comprende los puentes entre subunidades B2b, B2c, y B7a (Yusupov et al., 2001). Además la posición de IF3C coincide con aquella de la hélice 69 del 23S rRNA, el principal componente del puente B2b en la subunidad 50S. La localización de IF3C en nuestro mapa ofrece una explicación a la función disociativa de IF3 en la iniciación a la traducción. El mecanismo disociativo directo que proponemos para IF3 coincide con el que Dallas & Noller, mediante ensayos bioquímicos, propusieron en su momento (Dallas & Noller., 2001), y contrasta con aquél que propusieron Pioletti et al., en el que la acción disociativa de IF3 se le atribuía a un mecanismo indirecto a través de la subunidad 30S (Pioletti et al., 2001).

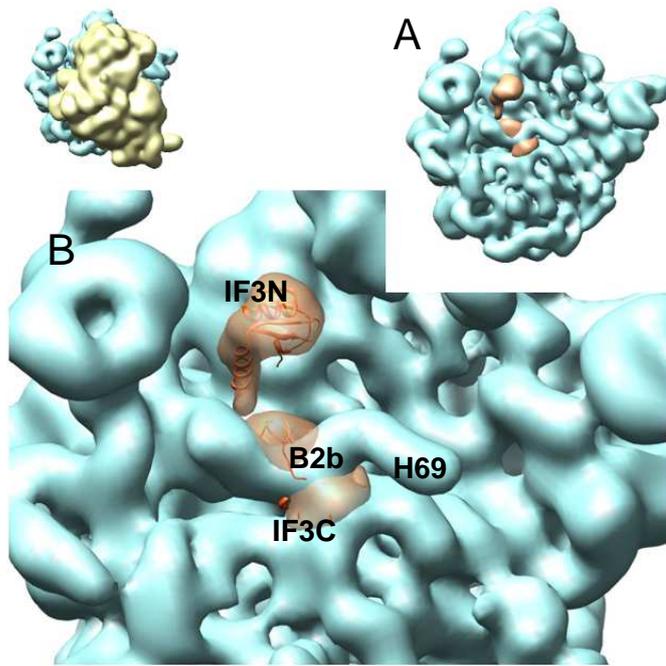


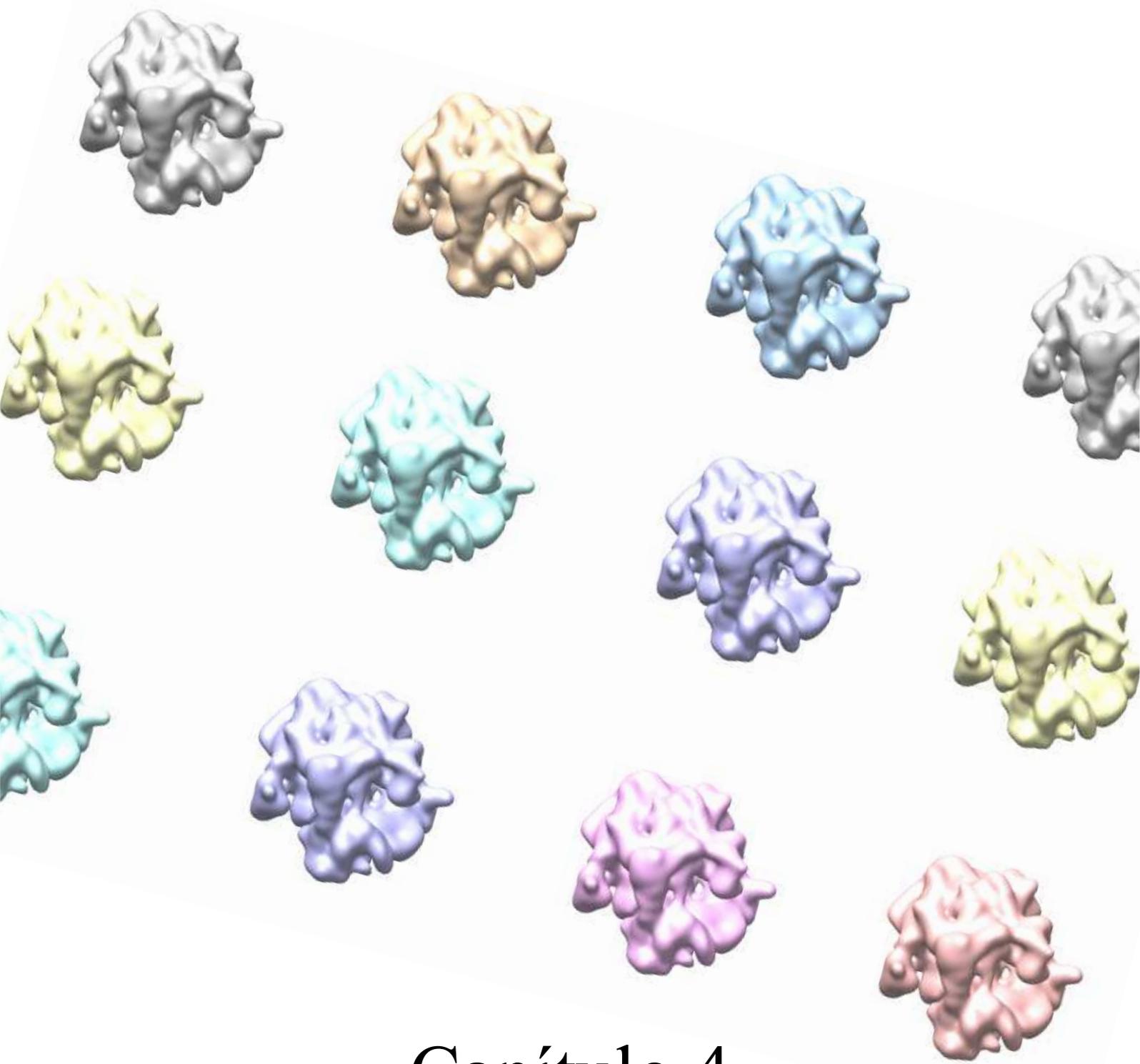
Figura 3.12. Implicación de la localización de IF3 en el ensamblaje de la 50S al complejo. (A) Posición de IF3 (naranja) con respecto a la subunidad 50S. (B) Las coordenadas atómicas de IF3 están ajustadas a sus correspondientes densidades en el mapa. El dominio C terminal de IF3 (IF3C) se encuentra en una posición que se superpone a la hélice 69 en la subunidad 50S (H69) bloqueando el puente B2b que se forma entre ambas subunidades.

Por otro lado, la localización de IF3 en nuestro estudio, también ofrece un posible mecanismo por el que este factor se encuentra involucrado en la selección del correcto ARNt de iniciación (Hartz et al., 1989). Se ha demostrado que la principal característica discriminadora del ARNt de iniciación con respecto al resto de los ARNts son una serie de tres pares de bases G-C adyacentes a la región anticodón (Mangroo et al., 1995). De acuerdo con nuestro mapa, IF3 se encontraría fuera del alcance de esta región del ARNt, lo que sugiere que el mecanismo mediante el cual selecciona al correcto ARNt es indirecto. En la estructura cristalográfica del ribosoma 70S unido al ARNt de iniciación, los nucleótidos G1338 y A1339 de la cabeza de la subunidad 30S se yuxtaponen en el surco menor en la región del anticodón del ARNt de iniciación (Yusupov et al., 2001). Un posible mecanismo que explique la acción de IF3 es que éste factor promueva la rotación de la cabeza de la 30S de manera que las dos bases del 16S rRNA anteriormente mencionadas entren en contacto con la región anticodón del ARNt, donde ejecutarán la comprobación de la identidad del ARNt. Este mecanismo sería análogo al propuesto para la discriminación del aminoacil-ARNt, que involucra reconocimiento en el surco menor de la hélice codon-anticodón en el sitio A (Ogle et al., 2001).

Como ya se ha mencionado en el capítulo de introducción, la naturaleza de la región de iniciación de la traducción (TIR; translation initiation region) influye de una manera importante en el ensamblaje de la subunidad 50S y a la liberación de IF3 del complejo (Milon et al., 2007). Específicamente, el ARNm utilizado en este estudio (m002), contiene un TIR desfavorable, con 9 nucleótidos en la secuencia Shine-Dalgarno y 5 nucleótidos de espaciado entre la secuencia

SD y el codón de iniciación, que provoca una conformación en el complejo de iniciación que no permite la rápida asociación de la subunidad 50S cuando se compara con los complejos formados por un ARNm con TIR favorable (Milon et al., 2007). Este hecho es consistente con la conformación del 30SIC ya que IF3 está situado en una posición que no facilita el ensamblaje de la subunidad 50S.

El complejo de iniciación 30S que presentamos en este estudio podría tratarse de un complejo intermediario en el que la subunidad, ARNt e IF2 están dispuestos de manera que favorecen la conversión del 30SIC al 70SIC, siendo el único impedimento el bloqueo que realiza IF3C en la unión de la subunidad 50S. El último paso en el 30SIC, previo a la unión de la subunidad 50S, implicaría un cambio en la situación de IF3 o la liberación del mismo. Sin embargo, en el estudio de crio-ME del 70SIC (Allen et al., 2005), mostraron densidades atribuibles a los dos dominios de IF3, por lo que lo más probable sea que IF3 sufra un cambio de posición de manera que no bloquee la unión de la subunidad 50S. De hecho, el estudio del 70SIC, muestra el IF3N en una posición similar a la que mostramos en el 30SIC, sin embargo, IF3C se situó en un espacio entre la hélice 69 de la subunidad 50S y el ARNt iniciador. Esta posición podría indicar un lugar de unión secundario previo a la unión del 50S. De hecho, en nuestro mapa, se muestra una ocupación menor con respecto a IF3C, lo que podría indicar que una fracción de complejos de iniciación que tenemos en nuestro estudio asumen una posición del IF3C similar a la observada en el 70SIC de manera que el complejo puede continuar el proceso de traducción a través de la formación de un complejo de iniciación 70S estable. Este hecho podría explicar porque en los complejos ribosomales 30S que poseen el ARNm 002, se observa un lento ensamblaje de la subunidad 50S y una lenta liberación de IF3, que no se produce hasta la unión de la 50S.



Capítulo 4

Complejos ribosomales de pre-translocación

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Reconstrucción y clasificación del complejo ribosomal de pre-translocación

En este estudio se analizó la estructura tridimensional de los complejos ribosomales de pre-translocación mediante crio-ME. Inicialmente, se caracterizó el complejo ribosomal de pre-translocación de *E. coli* con ARNm y un ARNt^{Met} deacilado en el sitio P y un fMetLeu-ARNt^{Leu} en el sitio A.

La reconstrucción tridimensional del complejo se llevó a cabo, al igual que con el complejo de iniciación 30S, con el software de procesamiento SPIRE/SPIDER.

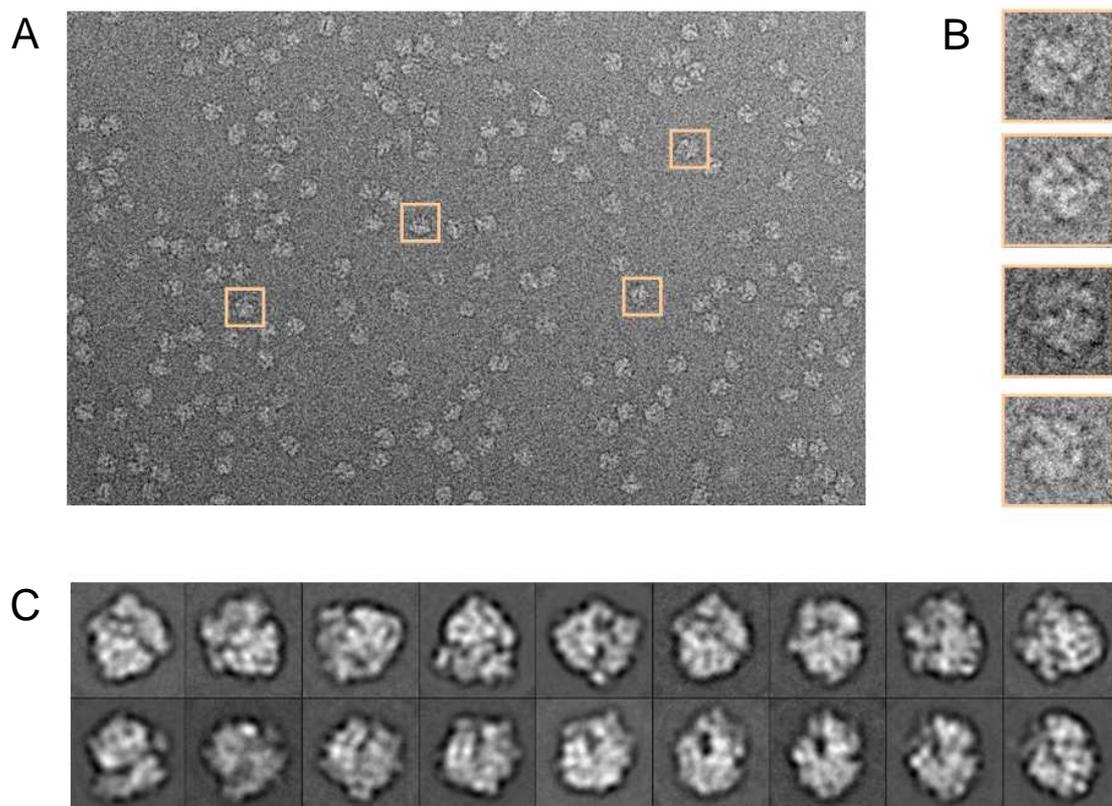


Figura 4.1. Microscopía electrónica de los complejos de pre-translocación. (A) Micrografía de la muestra mediante crio-ME. (B) Galería de imágenes que muestran diferentes partículas individuales extraídas de la micrografía. (C) Galería de imágenes que muestran las medias de las partículas clasificadas por proyecciones.

Se reconstruyó un primer mapa con un set inicial de 18.387 partículas que mostraba un ribosoma con densidad electrónica dispersa entre los sitios ribosomales P y E (*Figura 4.2.A*). Esto sugería la presencia de diferentes estados estructurales dentro del conjunto de partículas por lo que se aplicó un método de clasificación no supervisada basado en procedimientos estadísticos de máxima verosimilitud (Scheres et al., 2007). Esta clasificación generó dos grupos que correspondían a dos estados estructurales diferenciados. El primer grupo con 4.576 partículas, representa un ribosoma sin rotación relativa entre subunidades y con un ARNt en el estado clásico P (*Figura 4.2.B*), mientras que el segundo grupo con 7.879 partículas mostraba un ribosoma con rotación entre subunidades, desplazamiento de la proteína ribosomal L1 hacia el sitio E del ribosoma (flecha) y un ARNt híbrido con una conformación P/E (*Figura 4.2.C*). Las 5.932 partículas restantes se agruparon en una tercera clase que representaba un ribosoma con señales de mezcla entre estos dos estados estructurales.

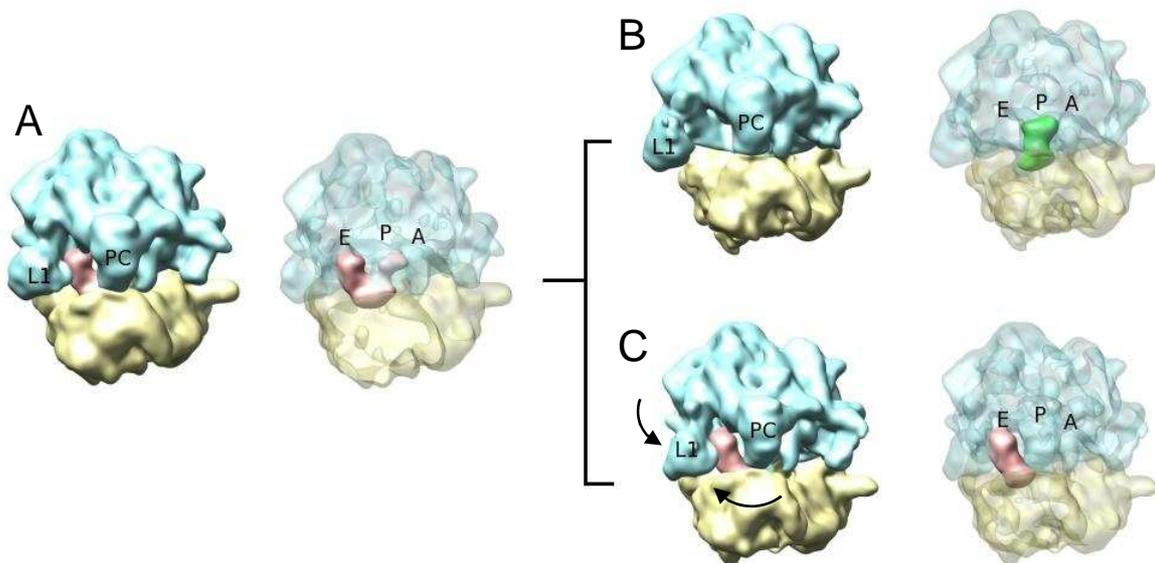


Figura 4.2. Mapas de densidad de los complejos ribosomales de pre-translocación mediante crío-EM y clasificación. Se muestran los mapas segmentados y a su derecha con las subunidades representadas en modo semitransparente para visualizar las densidades de los ARNts en el interior del ribosoma. (A) Mapa de densidad electrónica correspondiente al total de partículas (18.387) con una resolución nominal de 19 Å aplicando un cutoff de 0,5. (B y C) Este conjunto inicial de partículas se clasificó (ML3D) en dos grupos diferentes, cuyas correspondientes mapas aparecen representados en la figura. (B) Mapa de densidad electrónica correspondiente a la clase 1 (4.576 partículas) que representa un ribosoma en estado clásico con un ARNt en la posición P (resolución nominal de 21 Å). (C) Mapa de densidad electrónica correspondiente a la clase 2 (7.879 partículas) que representa un ribosoma es estado híbrido con un ARNt en posición P/E (resolución nominal de 20 Å). Referencias: L1, proteína ribosomal L1; PC, protuberancia central.

En pruebas que se realizaron tras la preparación de los complejos, se cuantificó la unión de ARNt en los sitios ribosomales A y P mediante filtración en nitrocelulosa y contaje radiactivo. El porcentaje de unión del ARNt en el sitio P fue de más del 90% mientras que la unión del ARNt en el sitio A fue del 75%. Sin embargo, en ninguno de los mapas de crio-ME que obtuvimos observamos señal de ARNt en el sitio A. Se consideró que la afinidad del ARNt en sitio A por el ribosoma era baja debido al tipo de tampón utilizado, ya que se ha demostrado que diferentes condiciones de tampón pueden influir considerablemente en la estabilidad de los complejos ribosomales y en la unión de los ARNts a ribosomas (Agrawal et al., 1999). Más específicamente, el uso de un tampón de poliaminas aumenta en aproximadamente un 50% la unión del ARNt por el sitio ribosomal A y aumenta la estabilidad del complejo ARNt-ribosoma (Semenkiov et al., 2000). Por lo tanto, con el fin de resolver el problema de la ausencia de ARNt en sitio ribosomal A, en un experimento posterior se añadió el compuesto espermina al tampón de dilución a una concentración de 2mM.

En este siguiente experimento, un set inicial de 63.539 partículas dio como resultado un mapa de densidad electrónica que no mostraba signos de rotación y con una señal fuerte para el ARNt en el sitio P. Sin embargo, la presencia de densidad electrónica débil y aislada en los sitios A y E sugería nuevamente la presencia de una mezcla de distintos estados estructurales dentro de la misma muestra (*Figura 4.3.A*) por lo que se aplicó un método de clasificación no supervisada (Scheres et al., 2007) para separar el set de datos. Esta clasificación generó 2 grupos que correspondían nuevamente a dos estados estructurales diferenciados. El primero con los ARNts en las posiciones A y P (en ambas subunidades), y al que nombraremos estado o conformación clásica (*Figura 4.3.B*); y el segundo con los ARNts en posiciones intermedias A/P y P/E (A y P en la subunidad 30S; P y E en la subunidad 50S respectivamente) y rotación relativa entre subunidades, al que nombraremos estado o conformación híbrida (*Figura 4.3.C*).

Desde un principio, y para no eludir posibles estados intermedios entre el estado clásico y el híbrido o estados estructurales distintos, en la clasificación se generaron 4 grupos dentro de los cuales se podían distribuir las partículas. Tres de las cuatro clases mostraban una estructura idéntica de un ribosoma en estado clásico, mientras que la clase restante representaba un ribosoma en estado híbrido. Las partículas pertenecientes a las tres clases con similar conformación se juntaron en una única clase que de ahí en adelante se denomina clase 1. La restante clase pasó a denominarse clase 2. De esta manera, a pesar de que se considera la posibilidad de que más de dos conformaciones diferentes estén presentes en la muestra, el proceso de clasificación únicamente determina dos estados estructurales. Este hecho no implica la inexistencia de conformaciones intermedias entre estos dos estados ya que éstas pueden darse

en poblaciones de partículas no lo suficientemente grandes como para ser perceptibles en la clasificación. De hecho, Munro y cols. (2007), utilizando estudios de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), mostraron que además de los establecidos estados clásicos e híbridos, existe una configuración previamente no caracterizada de ARNts, en la que únicamente el ARNt deacilado adopta el estado híbrido (A/A, P/E).

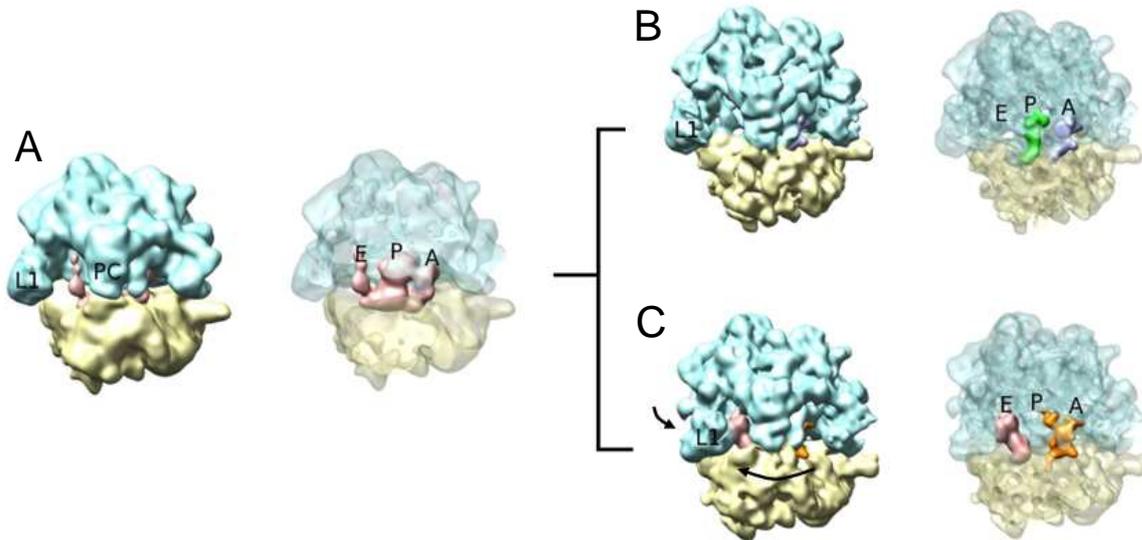


Figura 4.3. Mapas de densidad de los complejos ribosomales de pre-translocación mediante criomicroscopía electrónica y clasificación. Se muestran los mapas segmentados y a su derecha representados en modo semitransparente para visualizar las densidades de los ARNts en el espacio entre subunidades. (A) Mapa correspondiente al conjunto total de partículas (63.539) (resolución nominal aproximada de 16Å aplicando un cutoff de 0,5). Las partículas se clasificaron (MI3d) en dos grupos diferentes, cuyos correspondientes mapas están representados. (B) La clase mayoritaria con 47.520 partículas (resolución aproximada de 17 Å) dio como resultado un mapa de un ribosoma con los ARNts en estado clásico. (C) La clase minoritaria con 12.590 partículas (resolución aproximada de 20 Å) resultó en un ribosoma con los ARNts en estado híbrido y relativa rotación entre subunidades. Referencias: L1, proteína ribosomal L1; PC, protuberancia central.

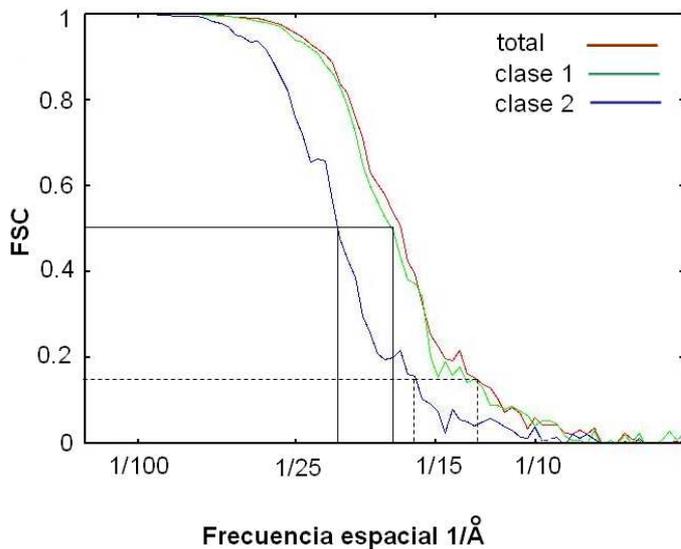


Figura 4.4. Resoluciones obtenidas para los mapas. La resolución se determina midiendo la correlación por capas en Fourier (FSC) de dos reconstrucciones 3D independientes (van Heel & Harauz, 1988). La FSC mide el coeficiente de correlación cruzado (CCF) normalizado entre dos volúmenes 3D en función de la frecuencia espacial. La resolución puede determinarse como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación se iguala a 0,5 (criterio FSC=0.5), (representado en la figura por una línea continua).

La primera clase representa aproximadamente el 80% del total de partículas y se corresponde, como ya se ha mencionado, con un mapa de densidad electrónica que muestra un ribosoma en estado clásico, sin rotación entre subunidades y ARNts en los sitios A y P (*Figura 4.5.A*). Sin embargo, la densidad en el sitio A es más débil que la correspondiente al sitio P, hecho que concuerda con el porcentaje de unión de ARNts que se observó previamente. Resulta interesante resaltar que no existe señal de ARNt en el sitio E del ribosoma, hecho que contrasta con un estudio anterior de crio-ME con complejos de pre-translocación (Valle et al., 2003) y que es consistente con el hecho de que en el presente estudio se utilizó un Leu-ARNt^{Leu} purificado mediante HPLC y desprovisto de ARNt deacilados contaminantes que tienden a entrar en el sitio E. Además, adicionalmente, los complejos de pre-translocación fueron purificados mediante ultracentrifugación.

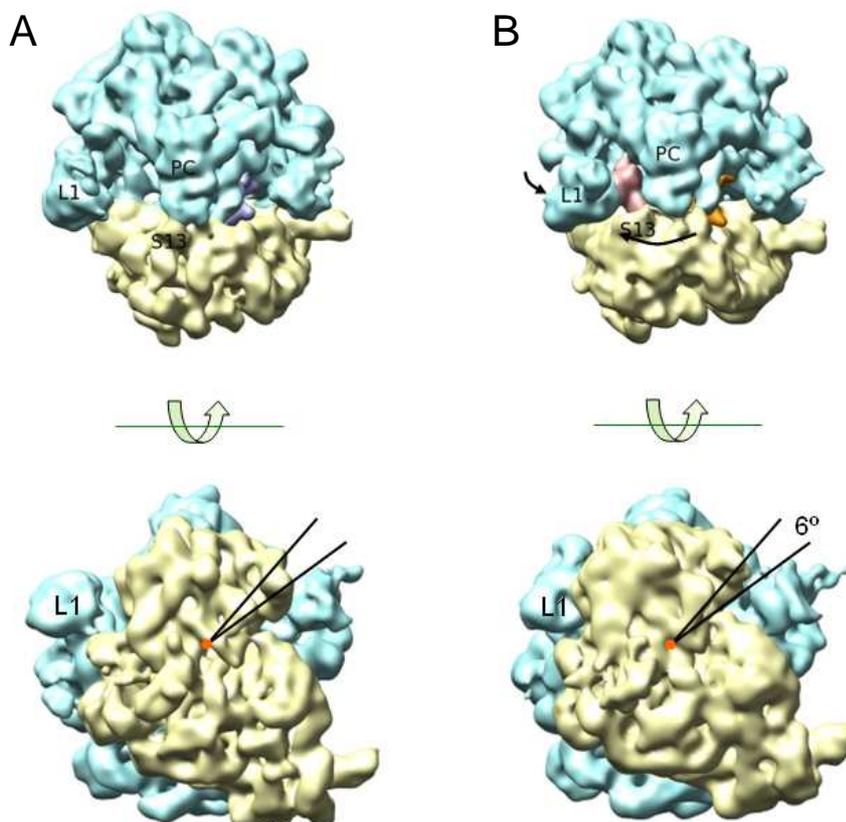


Figura 4.5. Mapas de densidad electrónica de los complejos ribosomales de pre-translocación en estado clásico (A) y estado híbrido (B). De la comparación de ambas estructuras observamos una rotación en la cabeza de la subunidad 30S (B. flecha grande) que se evidencia claramente por el desplazamiento de la proteína S13. También se muestra el desplazamiento de L1 hacia el sitio E ribosomal (B. flecha corta). En la parte inferior de la figura se observa los dos estados con una vista desde la subunidad 30S. Se evidencia la rotación de la cabeza de la subunidad 30S de aproximadamente 6° en el estado híbrido. Referencias: L1, proteína ribosomal L1; PC, protuberancia central; S13, proteína ribosomal S13.

El segundo grupo representa el restante 20% de las partículas (12.590) y su mapa correspondiente a la figura 4.5.B muestra visiblemente un ribosoma en un estado conformacional con rotación relativa entre subunidades que se puede apreciar por el movimiento de la proteína S13 en la cabeza de la subunidad 30S (flecha). Otro rasgo importante en la conformación híbrida es el desplazamiento de la proteína L1 de la subunidad 50S hacia el sitio E (flecha pequeña).

En lo referente a la conformación que adoptan los ARNts, ésta se puede apreciar mejor en la Figura 4.6, donde se compara su posición con la de los ARNts A, P y E. El ARNt deacilado se encontró en el estado híbrido P/E que enlaza el sitio P de la subunidad 30S con el sitio E de la subunidad 50S, mientras que el peptidil ARNt se sitúa en el sitio A de la subunidad 30S y en las inmediaciones del sitio P en la subunidad 50S, revelando una conformación híbrida A/P. Aparentemente los dos ARNts se han desplazado siguiendo la rotación de la subunidad 30S en una distancia similar a los 8Å de desplazamiento de la subunidad 30S que se dan al nivel del ARNm (Valle et al., 2003). De esta manera, ambos ARNts están colocados en los sitios A y P en la subunidad 30S pero están desplazados hacia los sitios P y E en la subunidad 50S.

Con respecto a los cambios conformacionales que muestra el complejo de pre-translocación (rotación relativa y el cambio de las conexiones entre subunidades, el movimiento del tallo L1, y el desplazamiento de la cabeza de la 30S siguiendo el curso del ARNm), éstas son características previamente descritos en ribosomas unidos al factor de elongación G (EF-G) a mayor resolución (Valle et al., 2003). Sin embargo en este estudio presentamos la estructura de los ARNts en conformación híbrida asociadas a los cambios conformacionales intrínsecos al ribosoma y en ausencia del factor de elongación. Además por primera vez se visualiza el ARNt híbrido en la posición A/P.

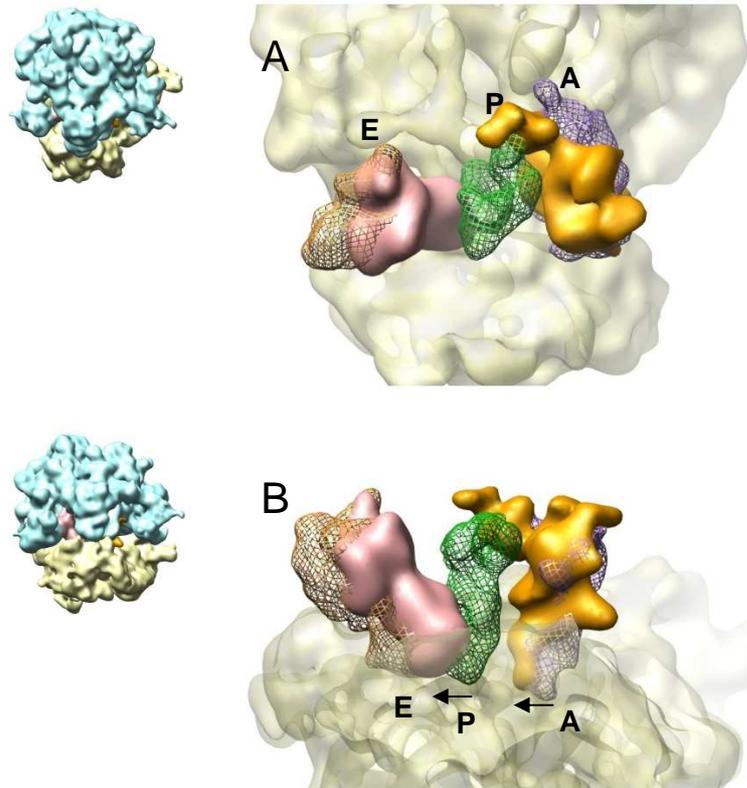


Figura 4.6. Estados híbridos de los ARNts. La subunidad 30S y los ARNts del mapa de la figura 4.5 (con el mismo código de color) están representados en un plano más cercano. Como referencia se han utilizado los ARNts en estados clásicos obtenidos del mapa de crio-ME del ribosoma 70S·ARNm·ARNt^{fMet}-fMetPhe-ARNt^{Phe} (Valle et al., 2003) tras ser alineados con respecto a la subunidad 50S y representados en forma de malla (A, en violeta; P, en verde; E, en ocre). A la izquierda, los ribosomas 70S representan la orientación de las figuras. (A) La vista desde la 50S muestra como el extremo aceptor de los ARNts híbridos alcanzan las posiciones P y E en la subunidad 50S. (B) La vista sobre la región anticodón de los ARNts revela el movimiento de los ARNts junto con el de la subunidad 30S (flechas).

4.1.2 El ARNt híbrido A/P

Uno de los resultados más novedosos que proporciona este estudio es la conformación del ARNt A/P. En el mapa de la Figura 4.6, el estado híbrido P/E del ARNt deacilado resulta obvio, ya que la distancia entre los extremos aceptores de los ARNts de los sitios P y E en la subunidad 50S es amplia. A pesar de que la distancia entre los extremos aceptores de los ARNts A y P en la subunidad 50S es más pequeña, el brazo aceptor del peptidil-ARNt se desvía de la trayectoria de su clásico sitio A hacia el sitio P en la subunidad 50S (*Figura 4.6.A*), tal y como se puede apreciar desde la vista superior del complejo.

El subconjunto de partículas que representan un complejo de pre-translocación ribosomal (20%) muestra de manera simultánea rotación relativa entre subunidades y formación de ARNts híbridos. La homogeneidad conformacional del subconjunto y con esto, la calidad de la clasificación se puede valorar por la similitud entre la densidad electrónica correspondiente al ARNt^{Leu} y sus coordenadas atómicas. En la figura 4.7 se muestra la estructura atómica del ARNt^{Leu} (Fukunaga & Yokoyama, 2005) ajustada dentro de la densidad correspondiente al fMetLeu- ARNt^{Leu} en el sitio A/P. La calidad del ajuste resulta evidente, ya que el mapa de densidad explica todo el ARNt , incluyendo el característico brazo extendido que posee. Pequeñas diferencias entre el mapa y la estructura atómica se restringen a la región del brazo aceptor. Esta característica podría indicar que el extremo aceptor del peptidil- ARNt se desplaza de manera pasiva hacia el sitio P del 50S como consecuencia de la rotación de la subunidad 30S, implicando ligeros cambios en la configuración de su extremo aceptor. Este razonamiento es consistente con el hecho de que la interrupción de interacciones entre el extremo aceptor del ARNt y residuos del 23S rRNA inhiben la formación del estado híbrido A/P durante la translocación (Sharma et al., 2004).

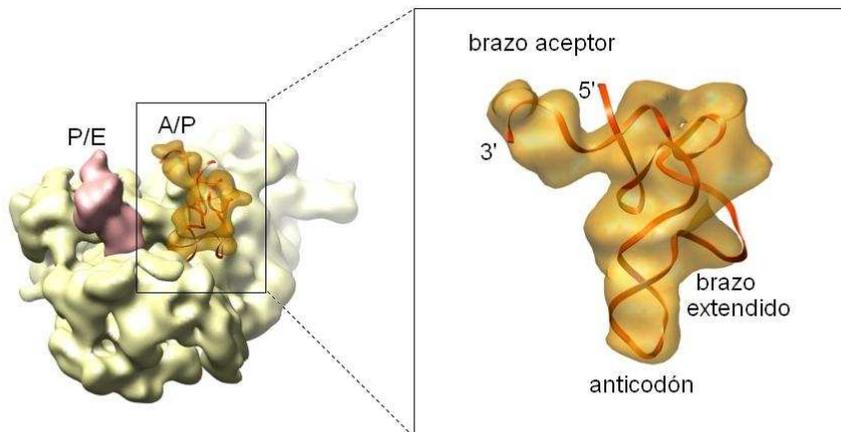


Figura 4.7. Peptidil- ARNt^{Leu} en la posición A/P. La estructura atómica del ARNt^{Leu} (en rojo) del organismo *Pyrococcus horikoshii* [Código PDB (Protein Data Bank) 1WZ2 (Fukunaga et al., 2005)] está ajustada a la densidad electrónica correspondiente al ARNt^{Leu} .

4.2 DISCUSION

Durante la etapa de elongación en la traducción ribosomal, el complejo formado por ARNts y ARNm es translocado de manera que permite la lectura del siguiente codón del ARNm. La translocación es promovida por EF-G y se acompaña de la hidrólisis de GTP. Durante la translocación, el ribosoma cambia de su estado de pre-translocación con un ARNt deacilado en el sitio P y un peptidil ARNt en el sitio A hacia un estado de post-translocación donde los ARNts de los sitios A y P se han movido a los sitio P y E respectivamente. El diseño universal de los ribosomas, compuestos por dos subunidades, inspiraron hipótesis tempranas de que la translocación podría implicar el movimiento relativo entre subunidades (Bretscher, 1968). Estos modelos sugerían la existencia de estados intermedios de los ARNts diferentes de los estados A, P y E. Experimentos de muestreo químico con ribosomas de pre-translocación indicaban que tras la transferencia peptídica, el extremo aceptor de los ARNts se mueve espontáneamente en la subunidad 50S hacia sus posiciones de post-translocación (Moazed & Noller, 1989), de manera que el peptidil-ARNt y aminoacil-ARNt entran en sus estados híbridos A/P y P/E respectivamente. Posteriores estudios de FRET mostraron fluctuaciones en las posiciones de los ARNts en los ribosomas de pre-translocación entre los estados clásicos y estados híbridos (Blanchard et al., 2004). Otros estudios cinéticos también revelaron que la translocación conducida por EF-G es más eficiente cuando los ARNts se encuentran en la conformación híbrida (Dorner et al., 2006). A pesar de la evidencia bioquímica de los estados ribosomales híbridos, la caracterización estructural de este complejo no ha sido mostrada hasta la publicación de estos resultados. El presente estudio aporta datos importantes a la hora de comprender la formación de los estados híbridos durante la translocación.

4.2.1 ARNts híbridos asociados a cambios conformacionales en el ribosoma

A pesar de que la tasa de translocación se ve incrementada por la acción de EF-G, estos resultados indican que el ribosoma en estado de pre-translocación, por sí solo, puede asumir tanto la conformación clásica sin rotación relativa entre subunidades y con los ARNts en estados clásicos como la conformación con rotación entre subunidades y ARNts en estados híbridos. Estos resultados son consistentes con estudios de FRET que mostraban ribosomas de pre-translocación que experimentaban de manera espontánea una rotación relativa entre subunidades en ausencia de EF-G, fluctuando entre dos estados conformacionales que se correspondían al estado clásico e híbrido (Cornish et al., 2008). Es por ello que se ha considerado esta característica como intrínseca del ribosoma (Agirrezabala et al., 2009). De hecho, esta propiedad se observa en otros estados que experimenta el ribosoma a lo largo del proceso de traducción como en la unión al factor de liberación 3 (Gao et al., 2007) o la unión al factor de reciclaje (Gao et al., 2005). Anteriormente fueron descritas las características estructurales que le otorgan al ribosoma la preferencia por este tipo de movimientos de rotación. La concentración de uniones rRNA-rRNA entre subunidades más fuertes en el centro del ribosoma frente a las uniones más flexibles que se dan en la periferia, favorece el modo de rotación sobre el eje perpendicular al plano de separación entre subunidades, tal y como sucede en realidad (Frank et al., 2007).

Además de la rotación relativa entre subunidades o “ratcheting” que se observa en el complejo de pre-translocación, otro rasgo distintivo es el movimiento de la proteína L1 hacia el espacio entre subunidades. Esta nueva posición le confiere a L1 una conexión con el estado híbrido P/E. De hecho, esta interacción favorece la transición entre el estado rotado y no rotado. Se ha evidenciado el papel esencial que ejerce la proteína L1 al promover la configuración híbrida P/E del ARNt, ya que la supresión de la proteína L1 estabiliza el estado clásico en el ribosoma (Munro et al., 2007). Más recientemente, unos estudios de FRET utilizando fluoróforos unidos a L1 y L33 han permitido identificar tres posiciones de L1, abierta, medio cerrada y completamente cerrada con respecto a la subunidad 50S (Cornish et al., 2009). Por tanto, es probable que se den diferentes conformaciones en el tallo L1 durante la transición del ARNt del sitio P al E (Agirrezabala & Frank, 2009). Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente, en este estudio únicamente se ha mostrado la conformación abierta y completamente cerrada de la proteína L1.

4.2.2 Equilibrio entre estados clásicos e híbridos

Por otra parte, se conoce bien que el ribosoma es muy sensible a las condiciones del tampón, especialmente a la concentración de Mg^{2+} (Agrawal et al., 1999), ya que su alta carga negativa hace que su conformación sea especialmente dependiente de las condiciones iónicas (Draper et al., 2005). Otro factor importante, como hemos podido comprobar en estudio, es la presencia de poliaminas en el tampón. En nuestro estudio, la proporción observada entre los subgrupos que representan los estados clásico e híbrido es la misma que la estimada mediante métodos basados en tiempos de vida de los respectivos estados a elevadas concentraciones de magnesio (Kim et al., 2007). Por otra parte, a bajas concentraciones de magnesio (3.5 mM) se ve favorecida la formación del estado híbrido, lo que también está apoyado por un estudio de crio-ME con complejos de translocación con bajas concentraciones de magnesio presentes en el tampón (Agirrezabala et al., 2008). De esta manera, queda reafirmado mediante estudios de crio-ME y clasificación, que la concentración de magnesio afecta al equilibrio entre los estados clásicos e híbridos en el complejo ribosomal de pre-translocación (*Figura 4.8*). Esto es debido a que muchos de los puentes RNA-RNA establecidos entre las subunidades ribosomales están estabilizados por estos iones de magnesio, y para que se de la conformación de los ARNts híbridos con rotación relativa entre subunidades es necesario que las conexiones entre subunidades sean más laxas, condición que se da a bajas concentraciones de magnesio.

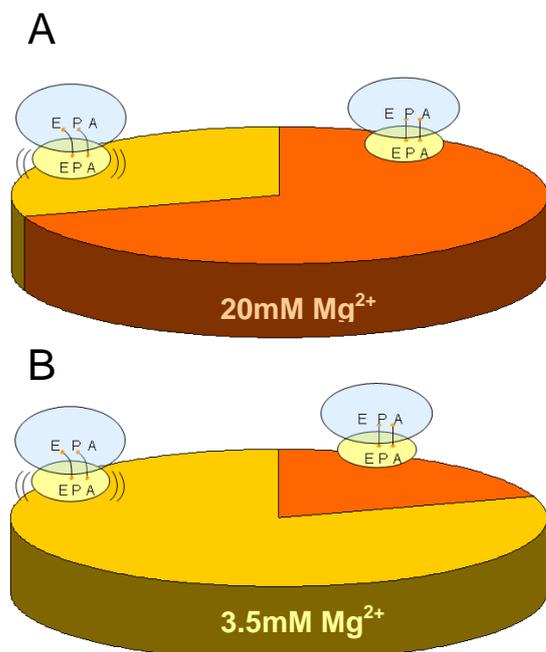


Figura 4.8. Representación gráfica de la proporción de partículas que se corresponden con las conformaciones clásicas e híbridas con relación a la concentración de magnesio utilizada en el experimento. (A) Con 20mM de Mg^{2+} en el tampón, se obtuvo un aproximadamente un 75% de ribosomas en conformación clásica y el restante 25% en conformación híbrida. (B) En condiciones de baja concentración de magnesio, la relación es inversa.

4.2.3 Conformación híbrida intermediaria en la translocación

La rotación entre subunidades y la habilidad del ARNt en el sitio P para interactuar con el sitio E en la subunidad 50S son esenciales para la translocación promovida por EF-G (Lill et al., 1989; Horan et al., 2007), lo que nos sugiere que la conformación rotada-híbrida es un intermediario temprano en la translocación. Por otro lado, la formación espontánea de este estado no es suficiente para trasladar el extremo aceptor del peptidil ARNt hasta la posición correcta de post-translocación, así como se indica por la baja reactividad con la puomicina (Sharma et al., 2004; Semenov et al., 1992). De esta manera, postulamos que la conformación híbrida-rotada es el sustrato natural para el EF-G, y el EF-G podría tanto unirse de manera preferencial a este estado o desplazar el ribosoma hacia ese estado antes del movimiento de ARNts sobre la subunidad 30S. La translocación se completa entonces coordinando los cambios conformacionales que se producen en el factor con las reorganizaciones que se suceden en el ribosoma, resultando en el movimiento de los ARNts y en la rotación inversa de la subunidad 30S. (Figura 4.9).

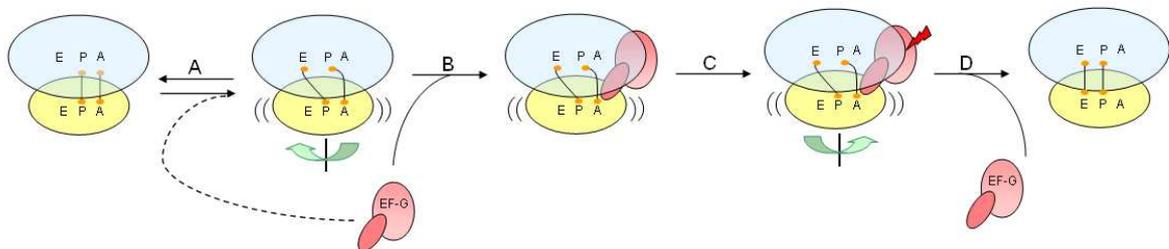
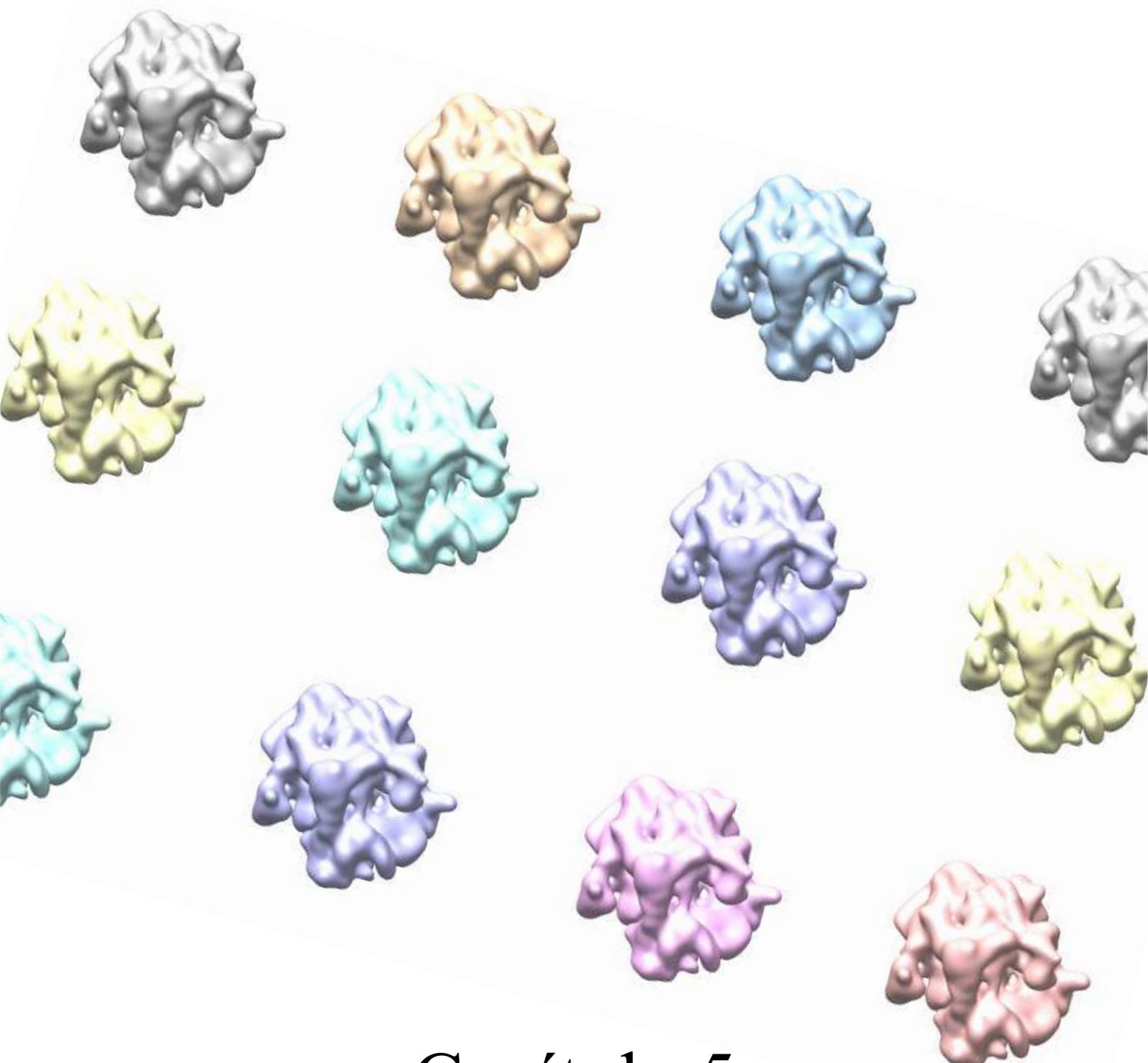


Figura 4.9. Esquema del proceso de translocación. (A) Partimos de un complejo ribosomal de pre-translocación en equilibrio entre el estado clásico, sin rotación entre subunidades y ARNts en los sitios A y P; y el estado híbrido, con rotación relativa entre subunidades y ARNts en los sitio A/P y P/E. Este equilibrio se ve afectado por múltiples variables, como los aminoácidos presentes en los ARNts, la concentración de magnesio y otros factores ambientales (Munro et al., 2009). Es probable que el mismo EF-G desvíe el equilibrio hacia la conformación híbrida. (B) El EF-G*GTP se une al ribosoma en su estado híbrido estabilizando dicha conformación. (C) Se produce la hidrólisis de la molécula de GTP unida al EF-G y se produce la rotación contraria de la cabeza de la 30S para volver a la conformación anterior. (D) Tras la liberación del EF-G, el ribosoma se encuentra en un estado de post-translocación, con los ARNts en los sitios P y E y el sitio A disponible para aceptar un nuevo ARNt.



Capítulo 5

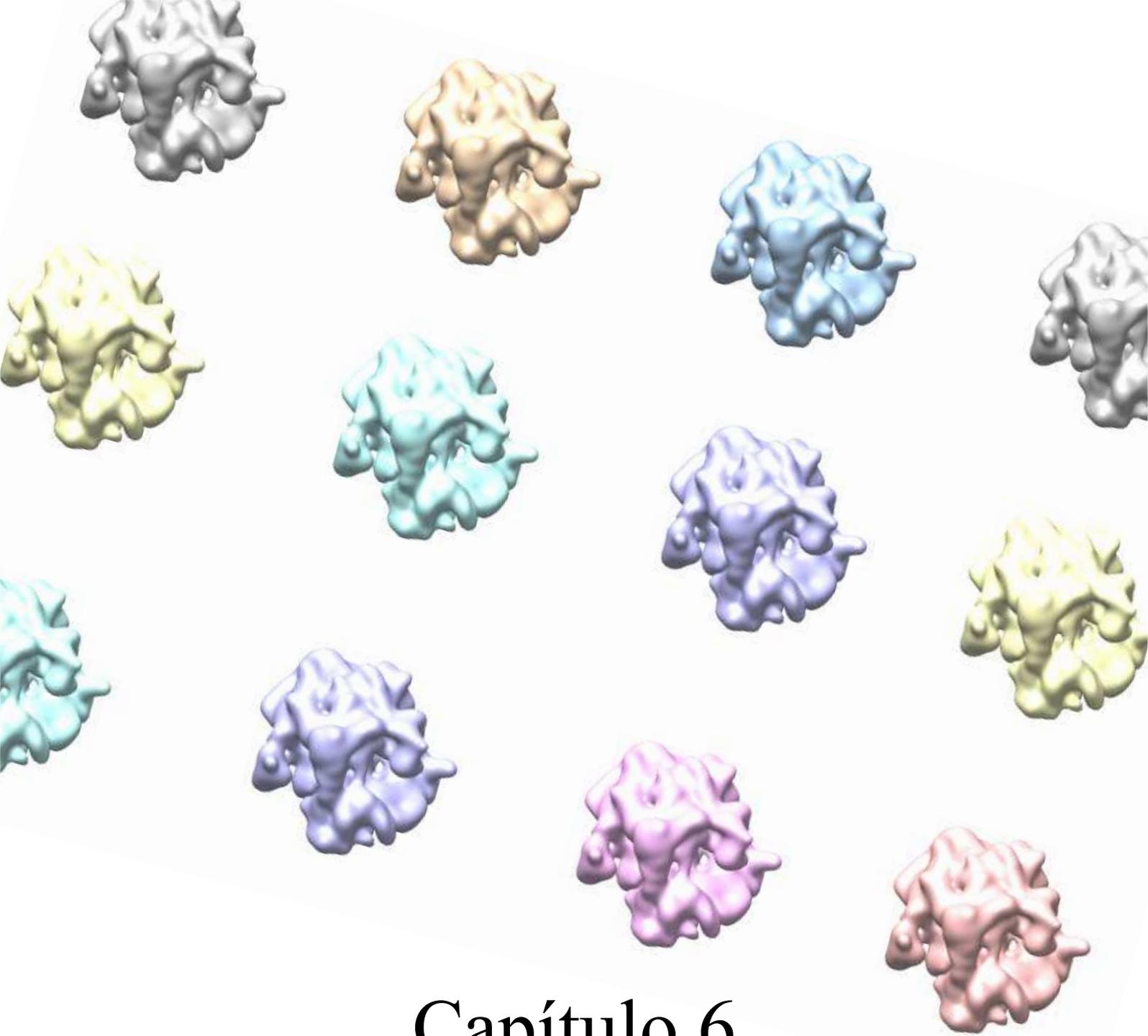
Conclusiones

5.1 COMPLEJO DE INICIACIÓN 30S

- Se muestra por primera vez la estructura completa del complejo de iniciación 30S, un intermediario crucial en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas.
- En la etapa de iniciación se observan diferentes conformaciones en la subunidad 30S que implican la rotación de la cabeza, un movimiento intrínseco del ribosoma.
- En la estructura del 30SIC, IF2 se ajusta perfectamente y sirve como molde para la unión con la subunidad 50S, lo que sugiere un mecanismo físico implicado en el ensamblaje de subunidades.
- Por el contrario, IF3 en el 30SIC se encuentra bloqueando uno de los principales puentes que se establecen entre las subunidades, hecho que puede explicar la baja tasa de asociación entre subunidades que se da en los complejos ribosomales formados por el mensajero 002, como es el del presente estudio.

5.2 COMPLEJO DE PRE-TRANSLOCACION

- Se muestra por primera vez la estructura del complejo de pretranslocación.
- La estructura de este complejo muestra un movimiento relativo entre subunidades o “ratcheting” que es simultáneo con la formación de los ARNts en estados híbridos A/P y P/E.
- Esta conformación, que promueve y precede la translocación de los ARNts de manera rápida y coordinada en la subunidad 30S, se forma de manera espontánea sin la ayuda del factor de elongación G.
- La presencia del factor de elongación G puede favorecer el equilibrio hacia la conformación híbrida.



Capítulo 6

Anexo: Purificación y preparación de los complejos

6.1 COMPLEJO DE INICIACIÓN

6.1.1 Tapones generales

Tampón A: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 70 mM NH₄Cl, 30 mM KCl, 7 mM MgCl₂.

Tampón B: 20 mM Tris-HCl (pH 7,1), 1 mM EDTA, 10% glicerol, 6 mM 2-mercaptoetanol. PMSF y benzamidina que se añadieron antes de usar el tampón.

6.1.2 Purificación de ribosomas 70S y subunidades 30S

Tampón de lisis celular (tampón 1, 200 ml para 50 gramos de células): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM NH₄Cl, 10 mM acetato de magnesio, 3 mM 2-mercaptoetanol.

Colchón de sacarosa (tampón 2, 200 ml): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 500 mM NH₄Cl, 10 mM acetato de magnesio, 1,1M sacarosa, 3 mM 2-mercaptoetanol.

Tampón de lavado (tampón 3, 500 ml): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 500 mM NH₄Cl, 10 mM acetato de magnesio, 7 mM 2-mercaptoetanol.

Tampón zonal (tampón 4, 1 l): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM NH₄Cl, 1.5 mM acetato de magnesio, 3 mM 2-mercaptoetanol.

Tampón zonal, 10% sacarosa (tampón 5, 750 ml): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM NH₄Cl, 1.5 mM acetato de magnesio, 10% sacarosa, mM 2-mercaptoetanol.

Tampón zonal, 40% sacarosa (tampón 6, 1,5 l): 20 mM Tris-HCl (pH 7,1), 60 mM NH₄Cl, 1.5 mM acetato de magnesio, 40% sacarosa, 3mM 2-mercaptoetanol.

Tampón 50% sacarosa (tampón 7, 1,5 l): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM NH₄Cl, 1.5 mM acetato de magnesio, 50% sacarosa, 3mM 2-mercaptoetanol.

Tampón de disociación (tampón 8): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM NH₄Cl, 1.5 mM acetato de magnesio, 3 mM 2-mercaptoetanol.

Todos los tampones fueron filtrados, esterilizados (0,2 µm) y enfriados a 4 °C antes de su uso.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. 50 g de células congeladas (*E. coli* MRE600) se trituraron durante 30 minutos en un mortero con 100 g de alúmina en la cámara fría. Se añadió DNAsa I y se trituró otros 10 minutos. Seguidamente se añadió el tampón de lisis celular (tampón 1). Para eliminar la alúmina y restos celulares, se centrifugó durante 30 minutos a 9000 rpm y 4°C (rotor Beckman JA-14). El sobrenadante fue

cuidadosamente retirado y centrifugado durante 30 minutos a 16000 rpm y 4°C (rotor Beckman 50.2 Ti). Del sobrenadante resultante (fracción S30), 14 ml fueron depositados sobre colchones de sacarosa de 9 ml (tampón 2) y centrifugados durante 16 horas a 33000 rpm y 4°C (rotor Beckman 50.2 Ti). Tras la centrifugación, el sobrenadante fue desechado, y los pellets fueron lavados rápidamente con el tampón de lavado (tampón 3). Los pellets fueron disueltos en el tampón de lavado agitando suavemente con una mosca magnetica durante 30 minutos en hielo. Los ribosomas fueron disueltos y el volumen total se ajustó a 92 ml con el tampón 3. 23 ml de la solución se depositó sobre 1 ml de colchón de sacarosa (tampón 2) y se centrifugó durante 6 horas a 50000 rpm y 4°C (rotor Beckman 50.2 Ti). Los pellets fueron nuevamente resuspendidos en tampón de lavado durante 30 minutos en hielo. El volumen de la solución se ajustó a 90 ml y porciones de 30 ml se depositaron en tres colchones de sacarosa de 1,5 ml que se centrifugaron durante 13 horas a 28000 rpm y 4°C (rotor Beckman SW28). Los pellets de ribosomas resultantes se resuspendieron en 50 ml de tampón zonal (tampón 4). La concentración de ribosomas se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. En este punto, los ribosomas 70S purificados pueden ser alicuoteados y congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C.

Para la purificación de las subunidades ribosomales se llevo a cabo una centrifugación zonal de la solución de ribosomas 70S pero antes ésta se dializó frente el tampón de disociación (tampón 8) durante 5 horas a 4°C. La centrifugación zonal se realizó en un rotor Beckman Ti-15 con un volumen de 1675 ml. Primero se cargaron 400 ml del tampón zonal (tampón 4). Seguidamente se cargaron 25 ml de la solución de ribosomas. Después 1370 ml del gradiente de sacarosa de 10% a 40% (tampones 5 y 6 respectivamente). Finalmente, se cargaron 150 ml del tampón con sacarosa al 50% (tampón 7). Se centrifugaron durante 19 horas a 28.000 rpm y 4°C. Se recogieron fracciones de 50 ml. Se midió la absorbancia a 260 nm para identificar las fracciones que contenían los ribosomas 70S y las subunidades ribosomales 30S y 50S. Las fracciones de subunidades 30S y 50S se alicuotearon y congelaron a -80 °C.

Antes de utilizar las subunidades ribosomales 30S para la formación del complejo de iniciación, éstas fueron activadas mediante una incubación con el tampón A con 20 mM de MgCl₂ durante una hora a 37°C.

6.1.3 Purificación de los factores de iniciación

i. Expresión de IF1, IF2 e IF3 y preparación de los lisados celulares

Tampón de lisis (tampón 9): 10 mM Tris-HCl (pH 7.7), 60 mM NH₄Cl, 10 mM acetato de magnesio.

Los factores fueron sobreexpresados en *E. coli* UT5600 (*ompT*⁻) que contienen dos plásmidos: pCI857 que codifica para el represor λ termosensitivo *ci857* y para la resistencia a la kanamicina, y pPLC2883, que confiere resistencia a la ampicilina y en el que el gen que codifica para IF1, IF2 e IF3 se posiciona bajo el control del promotor lambda PL. Los respectivos constructos son pXR201 *infA** (Calogero et al., 1987), pXP101 *infB* o pIM302 *infC* (Brombach & Pon, 1987). Debería tenerse en cuenta que el uso de la cepa *ompT*⁻ para la producción de factores de iniciación es muy importante debido a que esta cepa carece de proteasas de membrana externa que durante la purificación pueda degradar las regiones N-terminal de las proteínas IF2 e IF3. Los tres genes de los factores de iniciación fueron diseñados para que su expresión sea más fiable y eficiente. Los genes *infB* e *infC* (Brombach & Pon, 1987) fueron separados de genes adyacentes en sus unidades transcripcionales que reprimen la expresión del factor. El triplete AUU de *infC*, que se autoreprime en la traducción, fue sustituido por el triplete canónico AUG (Brombach & Pon, 1987). Finalmente, *infA** es un gen sintético que codifica para la misma secuencia aminoacídica que IF1 pero tiene un uso optimizado de codones sinónimos que se traduce en niveles más altos de expresión de la proteína (Calogero et al., 1987).

Las células se crecieron en un fermentador de 5 litros en medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina y 25 μ g/ml de kanamicina a 30°C y la sobreexpresión de los factores se indujo a la mitad de la fase logarítmica aumentando la temperatura a 42°C. Después de 30 minutos de inducción, la temperatura de incubación se descendió a 37°C y se permitió crecer a las células durante otras 2 horas. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm con un rotor Beckman JA-10, y se lavaron dos veces resuspendiendo y centrifugando en tampón de lisis (tampón 9). La suspensión celular final (~ 2ml de tampón de lisis/g células) se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

Se añadieron 6 mM 2-mercaptoetanol, 0.2 mM PMSF y 0.2 mM benzamidina a la suspensión descongelada de células. Las células se lisaron en un sonicador (Misonix 3000, Misonix, Inc.) aplicando 15 ciclos (30 segundos de sonicación, 30 segundos de pausa) a 6 W. El lisado fue centrifugado en un rotor Sorvall SA-600 durante 1 hora a 15000 rpm. Para disociar

los factores de iniciación de los ribosomas, la concentración de NH_4Cl en el sobrenadante (fracción S-30) se ajustó 1 M. Las subunidades ribosomales fueron peleteadas mediante centrifugación del sobrenadante en un rotor Beckman 45 Ti a durante 16 horas a 35000 rpm, dejando en el sobrenadante el contenido de factores de iniciación (fracción S-150).

ii. Purificación de IF1 e IF3

Tampón 10: Tampón B sin NH_4Cl

Tampón 11: Tampón B con 0.1 M NH_4Cl

Tampón 12: Tampón B con 0.7 M NH_4Cl

Tampón 13: Tampón B con 0.05 M NH_4Cl y 6 M urea

Tampón 14: Tampón B con 0.4 M NH_4Cl y 6 M urea

Tampón 15: Tampón B con 1 M NH_4Cl

El extracto S-150, que contiene la sobreexpresión de IF1 se diluyó 9 veces en el tampón 15 hasta una concentración final de NH_4Cl de 0.1 M. Seguidamente se cargó en una columna Whatman P11 de fosfocelulosa (PC) (30 mg de proteína/g de resina) equilibrada en el tampón 11. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna con tampón 11, se eluyó IF1 con un gradiente lineal de 0.1 a 0.7 M NH_4Cl en el tampón B (tampones 11 y 12). Las fracciones que contenían IF1 se identificaron mediante un gel SDS-PAGE, se juntaron, se dializaron frente al tampón 13 y se cargaron en una columna PC equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó con el mismo tampón y IF1 se eluyó mediante un gradiente de 0.05 M a 0.4M NH_4Cl en 6 M de urea en el tampón B (tampones 13 y 14). Las fracciones que contenían IF1 se juntaron, diluyeron con tampón 10 hasta una concentración final de NH_4Cl de 0.05 M y se cargaron en una pequeña columna PC (1 ml) para su concentración. La proteína se eluyó con tampón 15 y se purificó mediante columna Superdex 75 FPLC de filtración en gel (Pharmacia; HiLoad 26/60). IF1 purificado se almacenó en tampón B con 200 mM NH_4Cl a -80°C .

IF3 se purificó básicamente como se ha descrito para IF1, exceptuando el diferente gradiente de elución de 0.1 a 1 M NH_4Cl en el tampón B (tampones 11 y 15) que se utilizó en el primer paso de la purificación en la columna PC. El paso de la filtración en gel en la columna Superdex 75 (Pharmacia; HiLoad 26/60) se realizó únicamente cuando la pureza de IF3 tras la segunda columna PC era por debajo de 95%. La concentración de proteína se determinó por la absorbancia a 280 nm.

iii. Purificación de IF2

Tampón 16: Tampón B con 0.6 M NH_4Cl

Tampón 17: 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 6 mM 2-mercaptoetanol, 0.2 mM PMSF y 0.2 mM benzamidina

Tampón 18: 20 mM fosfato sódico (pH 7.1)

Tampón 19: 350 mM fosfato sódico (pH 7.1)

El extracto S-150 que contenía la sobreexpresión de IF2 se diluyó 9 veces con el tampón 10 hasta obtener una concentración final de NH_4Cl de 0.1 M. Después se cargó en una columna PC equilibrada con el tampón 11. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna con el tampón 11, se eluyó IF2 con un gradiente desde 0.1 M a 0.6 M de NH_4Cl en el tampón B (tampones 11 y 16). Las fracciones que contenían IF2 se juntaron y dializaron frente al tampón 22 y se cargaron en una columna de celulosa DEAE preequilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó y la proteína se eluyó como se describe previamente. Las fracciones que contenían IF2 se juntaron y dializaron frente al tampón 18 y se cargaron en una columna de hidroxiapatita (160 ml de volumen). Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna con el mismo tampón, la proteína se eluyó con un gradiente lineal de 20 a 350 mM de tampón fosfato (pH 7.1) (tampones 18 y 19). Se recogieron las fracciones que contenían IF2, se dializaron frente el tampón B con 200 mM de NH_4Cl , y se almacenó a -80°C . La concentración de proteína se determinó por la absorbancia a 280 nm.

iv. Purificación de $\text{fMet-ARNt}^{\text{fMet}}$

Aquí se describe el procedimiento de purificación basado en el uso de columnas de FPLC Phenyl Superose y MonoQ, que dura alrededor de 2 horas y permite la purificación de 2 a 3 gr de $\text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$.

El $\text{fMet-ARNt}^{\text{fMet}}$ fue purificado como se describe en Walker & RajBhandary (1972). En la preparación, ambos isoaceptores del $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ iniciador, fMet1 ($\text{m}^7\text{G46}$) y fMet3 (A46) estaban presentes. La metionil-tRNA sintetasa fue purificada de una sobreproducción de *Escherichia coli* (Mellot et al., 1989); la fracción S200, utilizada como fuente de N^{10} -formiltetrahidrofolato:Met-tRNA fue obtenida como se describe en Kemkhadze et al. (1981). N^{10} -formiltetrahidrofolato fue preparado de ácido folínico (Merck) según el procedimiento publicado (Dubnoff & Maitra, 1971).

Para la preparación y formilación del tRNA^{fMet}, se utilizó el siguiente protocolo: 30 unidades A₂₆₀ de tRNA^{fMet}, 70 µM [³H] metionina, 0,3 mM N¹⁰-formiltetrahidrofolato y 640 µg de extracto de la fracción S-200 de *E. coli* con 4 µg adicionales de metionil-tRNA sintetasa se incubaron durante 30 minutos a 30°C en 2 ml de tampón que contenía 25 mM Tris-acetato (pH 7.5), 8 mM acetato de magnesio, 3 mM ATP, 100 mM NH₄Cl, 30 mM KCl y 1 mM DTT. Tras la incubación, se añadió acetato de potasio (pH 5.0) a una concentración 0.3 M. Después, la muestra fué extraída con un volumen equivalente de fenol, agitándolo en hielo durante 15 minutos. La fase acuosa fue retraída tras la centrifugación y el tRNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol frío. El tRNA fué reprecipitado dos veces con 0.3 M de acetato de potasio y etanol. Este procedimiento es suficiente para purificar el tRNA del exceso de aminoácidos y proteínas. Para controlar el nivel de carga, una alícuota (10 µl) de la mezcla de aminoacilación fue precipitada por la adición de 200 µl de 10% TCA frío y se filtró mediante un filtro GF/C (Whatman), seguido de un extenso lavado con 5% TCA frío (40 ml) y etanol al 70% (5 ml). Para determinar la cantidad de formilación, una alícuota (10 µl) tras la última precipitación con etanol se incubó durante 30 minutos a 37°C con KOH 0.5 mM con el fin de hidrolizar el enlace ester. Los resultantes f[³H]Met y [³H]Met se analizaron mediante HPLC utilizando un gradiente convexo de 0 a 40% de acetonitrilo en TFA 0.1%. En este sistema, el [³H]Met eluye al minuto 5.2 y el f[³H]Met al minuto 8.6. Las cantidades relativas de ambos se determinaron con contaje de radioactividad de las fracciones correspondientes.

Para la purificación, la preparación de fMet-tRNA^{fMet} se disolvió en el tampón A (50 mM fosfato potásico pH 7.0 y 1.7 M sulfato amónico) y se cargó en una columna Phenyl Superose (Pharmacia, HR 5/5) equilibrada con el mismo tampón. La elución (0.5 ml/min) se realizó mediante un gradiente del tampón A al 37% del tampón B (20 mM Mops a pH 8,0). El fMet-tRNA^{fMet} se separó bien de los deacilado tRNA^{fMet} y de los Met-tRNA^{fMet}, así como de componentes adicionales contaminantes en la muestra.

Para eliminar el sulfato de amonio se juntaron las fracciones que contenían fMet-tRNA^{fMet}, se diluyeron 3 veces con 50 mM de acetato de sodio pH 5.0 y se cargaron a una columna MonoQ (Pharmacia, HR 5/5). El material se eluyó de la columna mediante un gradiente de 0 a 1 M de NaCl en 50 mM de acetato de sodio a pH 5.0. El fMet-tRNA^{fMet} se eluyó como un único pico a una concentración de NaCl de 0.8 M. La preparación final tenía 1760 pmol de [³H]Met/A₂₆₀ unidades y estaba completamente formilado.

v. Purificación del ARNm 002

Tampón 20: 20 mM Bis-Tris (pH 6.0), 300 mM NaCl

Tampón 21: 20 mM Bis-Tris (pH 6.0), 1.5 M NaCl

La reacción de transcripción del mRNA modelo m002 se obtuvo mediante transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa T7. La reacción resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap Capto DEAE y se lavó con 5 volúmenes (25 ml) de tampón 20. El mRNA se eluyó mediante un gradiente de 0% (300 mM NaCl) a 70% (1 M NaCl) del tampón 21 en 20 volúmenes de columna. El mRNA 002 eluye a una concentración de 550 mM de NaCl. Distintos mRNAs eluyen a diferente concentración de sal dependiendo de la longitud del mRNA. Se juntaron las fracciones que contenían el mRNA y se diluyeron con 50 mM Kac (pH 4.5) hasta conseguir una concentración de sal de 200 mM. Se añadieron 3 volúmenes de etanol y se mantuvo la solución de precipitación durante una hora a -20 °C. El contenido se centrifugó durante 2 horas a 4000 rpm y 4 °C. Se secaron los pellets dejándolos durante 30 minutos debajo de la campana. Después se resuspendieron los pellets en agua destilada y se calculó la concentración del mRNA midiendo la absorbancia a 260 nm.

6.2 COMPLEJO DE PRETRANSLOCACIÓN

6.2.1 Purificación de componentes del complejo

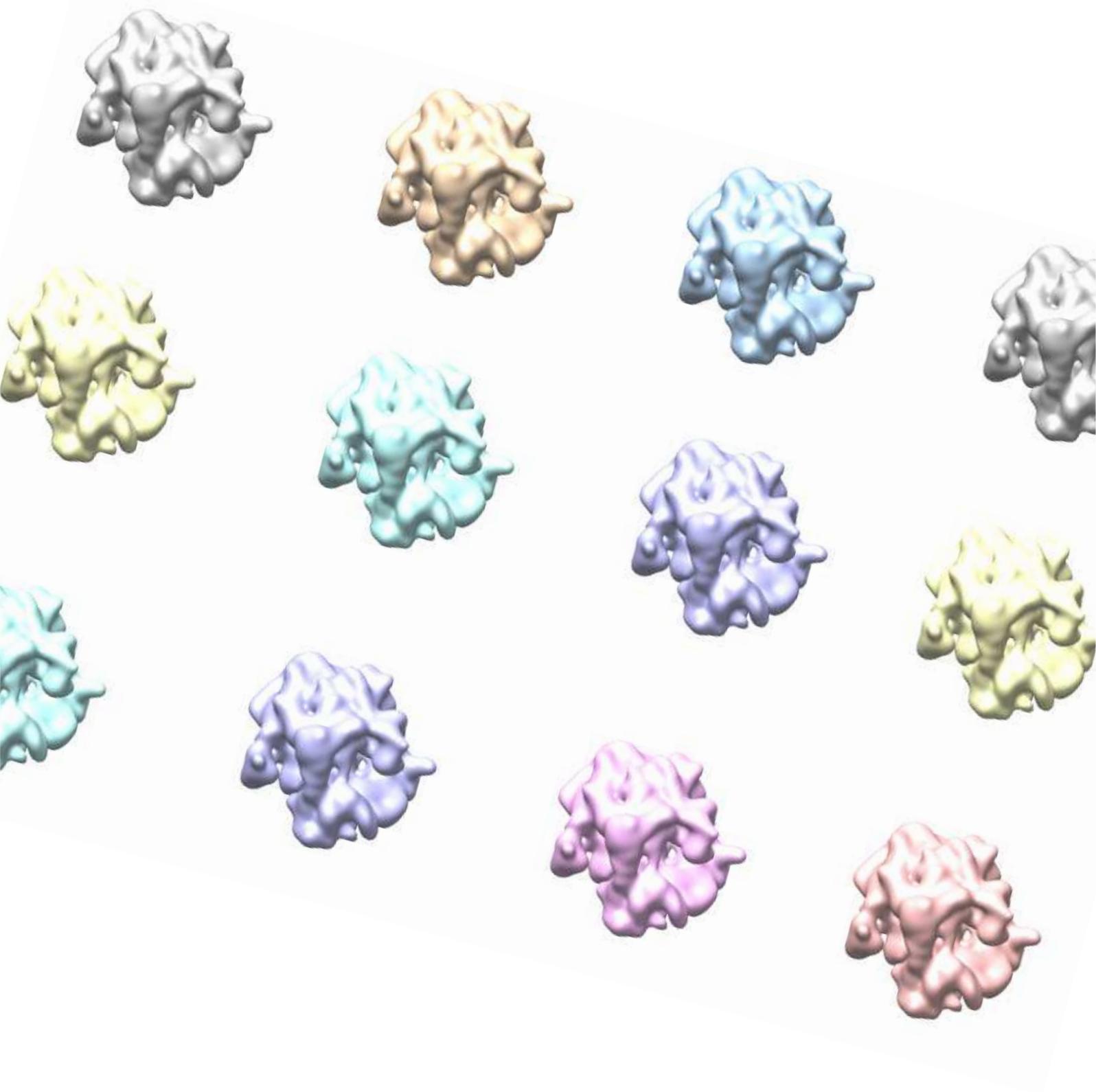
Los ribosomas 70S y los factores de iniciación se purificaron de la manera que se indica para el complejo de iniciación. El mRNA utilizado fue un derivado del m022 con una longitud de 122 nucleótidos y con la secuencia codificante AUGUUG y se purificó también de la manera que se indica para el complejo de iniciación. EF-Tu fue preparado como se describe en Rodnina et al. (1995). f [³H]Met-tRNA^{Met} y [¹⁴C]Leu-tRNA^{Leu}₅ se purificaron mediante HPLC (Milon 2007).

6.2.2 Formación del complejo

Tampón 22: 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 70mM NH₄Cl, 30mM KCl, 7mM MgCl₂

Tampón 23: 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 70mM NH₄Cl, 30mM KCl, 20mM MgCl₂

El complejo de iniciación (70S·mRNA· f [³H]Met-tRNA^{Met}) se formó incubando los ribosomas (0,5μM), mRNA (1,5μM) y f [³H]Met-tRNA^{Met} (0,75μM) con IF1, IF2 e IF3 (0,75μM cada uno) y GTP (1mM) en el tampón 22 a 37°C durante 1 hora. Por otro lado, el complejo ternario (EF-Tu·GTP·[¹⁴C]Leu-tRNA^{Leu}₅) se formó incubando EF-Tu (6μM) con GTP (1mM), fosfoenol piruvato (3mM) y piruvato quinasa (0,1 mg ml⁻¹) a 37°C durante 15 minutos, y después, se añadió el [¹⁴C]Leu-tRNA^{Leu}₅ purificado (3 μM). El complejo de pretranslocación con el tRNA^{Met} deacilado en el sitio P y el fMetLeu-tRNA^{Leu} en el sitio A se preparó mezclando los complejos de iniciación (0,5 μM) con los complejos ternarios (0,75 μM) en el tampón 22 a 37°C durante 2 minutos. Los complejos de pretranslocación fueron estabilizados incrementando la concentración de MgCl₂ hasta 21mM. De esta manera se pretende evitar la disociación del [¹⁴C]Leu-tRNA^{Leu}₅ del sitio A del complejo. Seguidamente, los complejos de pretranslocación fueron purificados por ultracentrifugación (2 horas, 259.000g en una centrífuga M120GX, Sorvall) en un colchón de 1,1M de sacarosa en el tampón 23. Los complejos ribosomales fueron disueltos en el tampón 23, alicuoteados y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. La cuantía de la unión de los tRNAs al ribosoma fue determinado mediante contaje radioactivo en filtro de nitrocelulosa y resulto ser de 90% para el f [³H]Met-tRNA^{Met} y de 73% para el fMetLeu-tRNA^{Leu}.



Bibliografía

- Agirrezabala, X., Lei, J., Brunelle, J.L., Ortiz-Meoz, R.F., Green, R. & Frank, J. (2008). Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome. *Mol Cell* 32(2), 190-7.
- Agirrezabala, X. & Frank, J. (2009). Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Q Rev Biophys* 42(3), 159-200.
- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H. & Frank, J. (1999). Effect of buffer conditions on the position of tRNA on the 70S ribosome as visualized by cryoelectron microscopy. *J Biol Chem* 274(13), 8723-9.
- Allen, G.S., Zavialov, A., Gursky, R., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2005). The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. *Cell* 121(5), 703-12.
- Allen, S.C. & Frank, J. (2007). Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol* 63(4), 941-50.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-402.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 22(2), 195-201.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289(5481), 905-20.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. & Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278(5346), 2123-6.
- Biou, V., Shu, F. & Ramakrishnan, V. (1995). X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consist of two compact alpha/beta domains linked by an alpha-helix. *EMBO J* 14(16), 4056-64.

- Blanchard, S.C., Kim, H.D., Gonzalez, R.L., Puglisi, J.D. & Chu, S. (2004). tRNA dynamics on the ribosome during translation, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(35), 12893-8.
- Boelens, R. & Gualerzi, C.O. (2002). Structure and function of bacterial initiation factors. *Curr Protein Pept Sci* 3(1), 107-19.
- Boileau, G., Butler, P., Hershey, J. & Traut, R. (1983) Direct Cross-Links between Initiation Factors 1, 2 and 3 and Ribosomal Proteins Promoted by 2-Iminothiolane. *Biochemistry* 22, 3162-3170.
- Bottcher, B., Wynne, S. A. & Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386, 88-91.
- Bretscher, M.S. (1968). Ribosomal binding of AUG by formyl-mehionyl-sRNA. *Nature* 220(5173), 1233-4.
- Brombach, M. & Pon, C.L. (1987). The unusual translational initiation codon AUU limits the expression of the *infC* (initiation factor IF3) gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 208(1-2), 94-100.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M. & Murzin, A.G. (1997). The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* 88(2), 235-42.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P. & Richarme, G. (2000). Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um (2552) 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochem Biophys Res Commun* 271(3), 714-8.
- Calogero, R.A., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (1987). Chemical synthesis and in vivo hyperexpression of a modular gene coding for *Escherichia coli* translational initiation factor IF1. *Mol Gen Genet* 208(1-2), 63-9.
- Carbon, J.A. (1964). The amino acid recognition and ribosome combining sites of *E. coli* transfer RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 15(1), 1-7.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsch, T., Wimberly, B.T. & Ramakrishnan, V. (2001) Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* 291, 498-501.
- Caserta, E., Tomsic, J., Spurio, R., La Teana, A., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O.

- (2006). Translation initiation factor IF2 interacts with the 30S ribosomal subunit via two separate binding sites. *J Mol Biol* 362(4), 787-99.
- Celano, B., Pawlik, R.T. & Gualerzi, C.O. (1988). Interaction of *Escherichia coli* translation initiation factor IF1 with ribosome. *Eur J Biochem* 178(2), 351-5.
 - Cornish, P.V., Ermolenko, D.N., Noller, H.F. & Ha, T. (2008). Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes. *Mol Cell* 30(5), 578-88.
 - Cornish, P.V., Ermolenko, D.N., Staple, D.W., Hoang, L., Hickerson, R.P., Noller, H.F. & Ha, T. (2009). Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8), 2571-6.
 - Dallas, A. & Noller, H.F. (2001) Interaction of translation initiation factor 3 with 30S ribosomal subunit. *Mol Cell* 8, 855-864.
 - de Cock, E., Springer, M. & Dardel, F. (1999). The interdomain linker of *Escherichia coli* initiator factor IF3: a possible trigger of translation initiation specificity. *Mol Microbiol* 32(1), 193-202.
 - Dell, V.A., Miller, D.L. & Johnson, A.E. (1990). Effects of nucleotide- and aurodox-induced changes in elongator factor Tu conformation upon its interactions with aminoacyl transfer RNA. A fluorescence study. *Biochemistry* 29(7), 1757-63.
 - Dorner, S., Brunelle, J.L., Sharma, D. & Green, R. (2006). The hybrid state of tRNA binding is an authentic translation elongation intermediate. *Nat Struct Mol Biol* 13(3), 234-41.
 - Draper, D.E., Grilley, D. & Soto, A.M. (2005). Ions and RNA folding, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 221-43.
 - Dubnoff, J.S. & Maitra, U. (1971). Isolation and properties of polypeptide chain initiation factor FII from *Escherichia coli*: evidence for a dual function. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(2), 318-23.
 - Fabretti, A., Pon, C.L., Hennesly, S.P., Hill, W.E., Lodmell, J.S. & Gualerzi, C.O. (2007). The real-time path of translation factor IF3 onto and off the ribosome. *Mol Cell* 25(2), 285-96.
 - Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. & Leith, A. (1996) SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron

- microscopy and related fields. *J Struct Biol* 116, 190-199.
- Frank, J. (2000). The ribosome – a macromolecular machine par excellence. *Chem Biol* 7(6), 133-41.
 - Frank, J. & Agrawal, R.K. (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406(6793), 318-22.
 - Frank, J. (2001) Ribosomal dynamics explored by cryo-electron microscopy. *Methods* 25(3), 309-15.
 - Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N. & Taylor, D.J. (2007). The process of mRNA-tRNA translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(50), 19671-8.
 - Fukunaga, R. & Yokoyama, S. (2005). Aminoacylation complex structures of leucyl-tRNA synthetase and tRNA^{Leu} reveal two modes of discriminator-base recognition. *Nat Struct Mol Biol* 12(10), 915-22.
 - Fukunaga, R., Ishitani, R., Nureki, O. & Yokoyama, S. (2005). Crystallization of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Acta Crystallogr Sect Struct Biol Cryst Commun* 61, 30.2.
 - Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Svergun, D.I., Frank, J. & Penczek, P. (2000) Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5Å resolution. *Cell* 100(5), 537-49.
 - Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chapman, M.S. & Frank, J. (2003). *Cell* 113(6), 789-801.
 - Gao, H., Valle, M., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2005). Dynamics of EF-G interaction with the ribosome explored by classification of a heterogeneous cryo-EM dataset. *J Struct Biol* 147(3), 283-90.
 - Gao, N., Zavialov, A.V., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2007). Specific interaction between EF-G and RRF and its implication for GTP-dependent ribosome splitting into subunits. *J Mol Biol* 374(5), 1345-58.
 - García, C., Fortier, P.L., Blanquet, S., Lallemand, J.Y. & Dardel, F. (1995). Solution structure of the ribosome-binding domain of *E. coli* translation initiation factor IF3. Homology with the U1A protein of the eukaryotic spliceosome. *J Mol Biol* 254(2), 247-59.

- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., Spremulli, L. & Varshney, U. (2008). A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell* 29(2), 180-90.
- Grigoriadou, C., Marzi, S., Kirillow, S., Gualerzi, C.O. & Cooperman, B.S. (2007). A qualitative kinetic scheme for 70S translation initiation complex formation. *J Mol Biol* 373(3), 562-72.
- Grill, S., Moll, I., Hasenohrl, D., Gualerzi, C.O. & Blasi, U. (2001). Modulation of ribosomal recruitment to 5'-terminal start codons by translation initiation factors IF2 and IF3. *FEBS Lett* 495(3), 167-71.
- Gualerzi, C.O., Spurio, R., La Teana, A., Calogero, R., Celano, B. & Pon, C.L. (1989). Site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* translation initiation factor IF1. Identification of the amino acid involved in its ribosomal binding and recycling. *Protein Eng* 3(2), 133-8.
- Gualerzi, C.O. & Pon, C.L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* 29(25), 5881-9.
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, C., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J. & Pon, C.L. (2001). Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 363-76.
- Gualerzi, C.O., Giuliadori, A.M. & Pon, C.L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol* 331(3), 527-39.
- Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-23.
- Hartz, D., McPheeters, D.S. & Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *E. coli* initiation factors. *Genes Dev* 3(12), 1899-912.
- Horan, L.H. & Noller, H.F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(12), 4881-5.
- Julián, P., Konevega, A.L., Scheres, S.H., Lázaro, M., Gil, D., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V. & Valle, M. (2008). Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(44), 16924-7.

- Kaminishi, T., Wilson, D.N., Takemoto, C., Harma, J.M., Kawazoe, M., Schluenzen, F., Hanawa-Suetsugu, K., Shirouzu, M., Fucini, P. & Yokoyama, S. (2007). A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA via the Shine-Dalgarno interaction. *Structure* 15(3), 289-97.
- Kapralou, S., Fabbretti, A., Garulli, C., Spurio, R., Gualerzi, C., Dahleberg, A. & Pon, C. (2008) Translation initiation factor IF1 of *Bacillus stearothermophilus* and *Thermus thermophilus* substitute for *Escherichia coli* IF1 in vivo and in vitro without a direct IF1-IF2 interaction. *Mol Microbiol* 70(6), 1368-1377.
- Kaziro, Y. (1978). The role of guanosine 5'triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim Biophys Acta* 505(1), 95-127.
- Kemkhadze, K., Odintsov, V.B., Makhno, V.I., Semenov, L.P. & Kirillov, S.V. (1981). Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Interaction of aminoacyl-tRNA with 70S ribosomes in the absence of elongation factor EF-Tu and GTP. *Mol Biol (Mosk)* 15(4), 779-89.
- Kisselev, L., Ehrenberg, M. & Frolova, L. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* 22(2), 175-82.
- Kennell, D. & Riezman, H. (1977). Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli* lac operon. *J Mol Biol* 114(1), 1-21.
- Kim, H.D., Puglisi, J.D. & Chu, S. (2007). Fluctuations of transfer RNAs between classical and hybrid states. *Biophys J* 93(10), 3575-82.
- La Teana, A., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (1996). Late events in translation initiation. Adjustment of fMet-tRNA in the ribosomal P-site. *J Mol Biol* 256(4), 667-75.
- Lake, J.A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J Mol Biol* 105(1), 131-9.
- Lancaster, L., Kiel, M.C., Kaji, A. & Noller, H.F. (2002). Orientation of ribosome recycling factor in the ribosome from directed hydroxyl radical probing. *Cell* 111(1), 129-40.
- Larigauderie, G., Laalami, S., Nyengaard, N., Grunberg-Manago M., Cenatiempo, Y., Mortensen, K. & Sperling-Petersen, H.U. (2000) Mutation of Thr445 and

- Ile500 of initiation factor 2 G-Domain affects *Escherichia coli* growth rate at low temperature. *Biochimie* 82, 1091-1098.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S. & Noller, H.F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454(7206), 852-7.
 - Laursen, B.S., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U. & Hoffman, D.W. (2003). A conserved structural motif at the N terminus of bacterial translation initiation factor IF2. *J Biol Chem* 278(18), 16320-8.
 - Laursen, B.S., Cecillie, A., Kusk, K., Hoffman, D.W. & Uffe Sperling-Petersen, H. (2004) The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker. *Protein Science* 13, 230-239.
 - Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. & Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1), 101-23.
 - Lill, R., Robertson, J.M. & Wintermeyer, W. (1989). Binding of the 3' terminus of tRNA to 23S rRNA in the ribosomal exit site actively promotes translocation. *EMBO J.* 8(12), 3933-8.
 - Low, H.H. & Lowe, J. (2006). A bacterial dynamin-like protein. *Nature* 444(7120), 766-9.
 - Mangroo, D., Wu, X.Q. & RajBhandary, U.L. (1995). *Escherichia coli* initiator tRNA: structure-function relationships and interactions with the translational machinery. *Biochem Cell Biol* 73, 1023-31.
 - Marintchev, A., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V. & Wagner, G. (2003). Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci* 100(4), 1535-40.
 - Marzi, S., Knight, W., Brandi, L., Caserta, E., Soboleva, N., Hill, W.E., Gualerzi, C.O. & Lodmell, J.S. (2003). Ribosomal localization of translation initiation factor 2. *RNA* 9(8), 958-69.
 - Marzi, S., Myasnikov, A.G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M., Klaholz, B.P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by

- binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130(6), 1019-31.
- McCarthy, J.E. & Brimacombe, R. (1994). Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet* 10(11), 402-7.
 - McCutcheon, J.P., Agrawal, R.K., Philips, S.M., Grassucci, R.A., Gerchman, S.E., Clemons, W.M. Jr., Ramakrishnan, V. & Frank, J. (1999). Location of translation initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8), 4301-6.
 - Mellot, P., Mechulam, Y., Le Corre, D., Blanquet, S. & Fayat, G. (1989). Identification of an amino acid region supporting specific methionyl-tRNA synthetase: tRNA recognition. *J Mol Biol* 208(3), 429-43.
 - Meunier, S., Spurio, R., Czisch, M., Wechselberg, R., Guenneugues, M., Gualerzi, C.O. & Boelens, R. (2000). Structure of the fMet-tRNA(fMet)-binding domain of *B. stearothermophilus* initiation factor IF2. *EMBO J* 19(8) 1918-26.
 - Milon, P., Konevega, A.L., Peske, F., Fabretti, A., Gualerzi, C.O. & Rodnina, M.V. (2007). Transient kinetics, fluorescence, and FRET in studies of initiation of translation in bacteria.
 - Milon, P., Konevega, A.L., Gualerzi, C.O. & Rodnina, M.V. (2008). Kinetic checkpoint at late step in translation initiation. *Mol Cell* 30(6), 712-20.
 - Milon, P., Carotti, M., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V. & Gualerzi, C.O. (2010). The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Rep* 11(4), 312-6.
 - Moazed, D. & Noller, H.F. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 57(4), 585-97.
 - Moazed, D., Samaha, R.R., Gualerzi, C. & Noller, H.F. (1995). Specific protection of 16S rRNA by translation initiation factors. *J Mol Biol* 248(2), 207-210.
 - Moreau, M., de Cock, E., Fortier, P.L., Garcia, C., Albaret, C., Blanquet, S., Lallemand, J.Y. & Dardel, F. (1997). Heteronuclear NMR studies of *E. coli* translation initiation factor IF3. Evidence that the inter-domain region is disordered in solution. *J Mol Biol* 266(1), 15-22.
 - Moreno, J.M., Dyrskjotersen, L., Kristensen, J., Kusk, K. & Uffe Sperling-

- Petersen, H. (1999) Characterization of the domains of *E. coli* initiation factor IF2 responsible for recognition of the ribosome. FEBS Letters 455, 130-134.
- Moreno, J.M., Kildsgaard, J., Siwanowicz, I., Kusk, K. & Uffe Sperling-Petersen, H. (1998) Binding of *Escherichia coli* Initiation Factor IF2 to 30S Ribosomal Subunits: A Functional Role for the N-terminus of the Factor. Biochemical & Biophysical research communications 252, 465-471.
 - Myasnikov, A.G., Marzi, S., Simonetti, A., Giuliadori, A.M., Gualerzi, C.O., Yusupova, G., Yusupov, M. & Klaholz, B.P. (2005). Conformational transition of initiation factor 2 from the GTP-to GDP-bound state visualized on the ribosome. Nat Struct Mol Biol 12(12), 1145-9.
 - Myasnikov, A.G., Simonetti, A., Marzi, S. & Klaholz, B.P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. Curr Opin Struct Biol 19(3), 300-9.
 - Munro, J.B., Altman, R.B., O'Connor, N. & Blanchard, S.C. (2007). Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. Mol Cell 25(4), 505-17.
 - Noller, H.F., Hoffarth, V. & Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. Science 256(5062), 1416-9.
 - Nonato, M.C., Widom, J. & Clardy, J. (2002). Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2alpha. J Biol Chem 277(19), 17057-61.
 - Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Tarry, M.J., Carter, A.P. & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. Science 292(5518), 897-902.
 - Peske, F., Rodnina, M.V. & Wintermeyer, W. (2005). Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetics analysis. Mol Cell 18(4), 403-12.
 - Pestka, S. (1968). Studies on the formation of transfer ribonucleid acid-ribosome complexes. On the function of a soluble transfer factor in protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 61(2), 726-33.
 - Petrelli, D., La Teana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (2001). Translation initiation factor IF3: two domains, five functions, one

- mechanism? EMBO J 20(16), 4560-9.
- Petrelli, D., Garofaldo, C., Lammi, M., Spurio, R., Gualerzi, C.O. & La Teana, A. (2003). Mapping the active sites of bacterial translation initiation factor IF3. J Mol Biol 331(3), 541-56.
 - Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Conrad, C., Huang, S., Couch, D.M., Greenblatt, C., Meng, C. & Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 25, 1605-1612.
 - Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath, A. & Franceschi, F. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. EMBO J 20(8), 1829-39.
 - Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (1984). Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiator factor IF1 on the initial rate of 30S initiation complex formation. FEBS Lett 175(2), 203-7.
 - Ramakrishnan, V. & Moore, P.B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. Curr Opin Struct Biol 11(2), 144-54.
 - Rao, A.R. & Varshney, U. (2001). Specific interaction between the ribosome recycling factor and the elongation factor G from *Mycobacterium tuberculosis* mediates peptidyl-tRNA release and ribosome recycling in Escherichia coli. EMBO J 20(11), 2977-86.
 - Rodnina, M.V., Fricke, R., Kuhn, L. & Wintermeyer, W. (1995). Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. EMBO J 14(11), 2613-9.
 - Rodnina, M.V., Savelsbergh, A., Katunin, V.I. & Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. Nature 385(6611), 37-41.
 - Rodnina, M.V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, H.J., Mohr, D., Matassova, N.B., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, C.O. & Wintermeyer, W. (2000). GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. Biol Chem 381(6-6), 377-87.
 - Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T.E. & Burley, S.K. (2000). X-ray structures of

- the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: Conformational changes on GDP and GTP binding. *Cell* 103, 781-792.
- Sacerdot, C., Frayat, G., Dessen, P., Springer, M., Plumbridge, J.A., Grunberg-Manago, M. & Blanquet, S. (1982). Sequence of a 1.26-kb DNA fragment containing the structural gene for *E.coli* initiation factor IF3: presence of an AUU initiation codon. *EMBO J* 1(3), 311-5.
 - Sacerdot, C., Vachon, G., Laalami, S., Morel-Deville, F., Cenatiempo, Y. & Grunberg-Manago, M. (1992). Both forms of translational initiation factor IF2 (alpha and beta) are required for maximal growth of *Escherichia coli*. Evidence for two translational initiation codons for IF2 beta. *J Mol Biol* 225(1), 67-80.
 - Schemeing, T.M. & Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461(7268), 1234-42.
 - Scheneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L. & Ehrenfeucht, A. (1986). Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* 188(3), 415-31.
 - Scheres, SH., Gao, H., Valle, M., Herman, G., Eggermont, P. Frank, J. & Carazo, JM. (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature Methods* 4, 27-29.
 - Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Guehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. & Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102, 615-623.
 - Schweisguth, F. & Moore, P.B. (1997). On the conformation of the anticodon loops of initiator and elongator methionine tRNAs. *J Mol Biol* 267(3), 505-19.
 - Semenov, Y.P., Shakina, T., Makhno, V. & Kirillov, S. (1992). Puromycin reaction for the A site-bound peptidyl-tRNA. *FEBS Lett* 296(2), 207-10.
 - Semenov, Y.P., Rodnina, M.V. & Wintermeyer, W. (2000). Energetic contribution of tRNA hybrid state formation to translocation catalysis on the ribosome. *Nat Struct Biol* 7(11), 1027-31.
 - Sette, M., Van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C.O. & Boelens, R. (1997). The structure of the translation initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J* 16(6), 1436-43.

- Sharma, D., Southworth, D.R. & Green, R. (2004). EF-G independent reactivity of a pre-translocation-state ribosome complex with the aminoacyl tRNA substrate puromycin supports an intermediate (hybrid) state of tRNA binding. *RNA* 10(1), 102-113.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.
- Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A.G., Fabbreti, A., Yusupov, M., Gualerzi, C.O. & Klaholz, B.P. (2008) Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature* 455, 416-420.
- Skorski, P., Leroy, P., Fayet, O., Dreyfus, M. & Hermann-Le Denmat, S. (2006). The highly efficient translation initiation region from the *Escherichia coli* rpsA gene lacks a shine-dalgarno element. *J Bacteriol* 188(17), 6277-85.
- Spirin, A.S. (1968). How does the ribosome work? *Curr Mod Biol* 2(3), 115-27.
- Spirin, A.S. (1969) A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 34, 197-207.
- Spurio, R., Brandi, L., Caserta, E., Pon, C.L., Gualerzi, C.O., Misselwitz, R., Kraff, C., Welfle, K. & Welfle, H. (2000). The C-terminal subdomain (IF2 C-2) contains the entire fMet-tRNA binding site of initiation factor IF2. *J Biol Chem* 275(4), 2447-54.
- Steffensen, S.A., Poulsen, A.B., Mortensen, K.K. & Uffe Sperling-Petersen, H. (1997). *E. coli* translation initiation factor IF2- An extremely conserved protein. Comparative sequence analysis of the *infB* gene in clinical isolates of *E. coli*. *FEBS Letters* 419, 281-284.
- Steitz, J.A. (1969). Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature* 224(5223), 957-64.
- Stoffler, G. & Stoffler-Meilicke, M. (1984). Immunoelectron microscopy of ribosome. *Annu Rev Biophys Bioeng* 13, 303-30.
- Stolboushkina, E., Nikonov, S., Nikulin, A., Blasi, U., Manstein, D.J., Fedorov, R., Garber, M. & Nikonov, O. (2008). Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the alpha-and beta subunits. *J Mol Biol* 382(3), 680-91.

- Stringer, E.A., Sarkar, P. & Maitra, U. (1977). Function of initiation factor 1 in the binding and release of initiation factor 2 from ribosomal initiation complexes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 252(5), 1739-44.
- Thon, F. (1966). On the defocussing dependence of phase contrast in electron microscopy images. *Z. Naturforschg* 21a, 476-478.
- Tomsic, J., Vitali, L.A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Striebeck, P., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V. & Gualerzi, C.O. (2000). *EMBO J* 19(9), 2127-36.
- Topf, M., Lasker, K., Webb, B., Wolfson, H., Chiu, W. & Sali, A.(2008). Protein structure fitting and refinement guided by cryo-EM density. *Structure* 16(2), 295-307.
- Trobro, S. & Aqvist, J. (2005). Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci* 102(35), 12395-400.
- Valle, M., Sengupta, J., Swami, N.K., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., Agrawal, R.K. & Frank, J. (2002). Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J* 21(13), 3557-67.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2003) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* 10(11), 899-906.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2003). Locking and unlocking ribosomal motions. *Cell* 114(1), 123-34.
- van Heel, M. & Harauz, G. (1988). Biological macromolecules explored by pattern recognition. *Scanning Microsc Suppl.* 2, 295-301.
- Walker, R.T. & TajBhandary, U.L. (1972). Studies on polynucleotides. *Escherichia coli* tyrosine and formylmethionine transfer ribonucleic acids: effect of chemical modification of 4-thiouridine to uridine on their biological properties. *J Biol Chem* 247(15), 4870-92.
- Weber, M.H., Beckering, C.L. & Marahiel, M-A. (2001). Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J Bacteriol* 183(24), 7381-6.

- Weixlbaumer, A., Murphy, F.V., Dziergowska, A., Malkiewicz, F.A., Agris, P.F. & Ramakrishnan, V. (2007). Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 14(8), 733-7.
- Wickstrom, E., Heus, H.A., Haasnoot, C.A. & van Knippenberg, P.H. (1986). 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. *Biochemistry* 25(10), 2770-7.
- Wienk, H., Tomaselli, S., Bernard, C., Spurio, R., Picone, D., Gualerzi, C.O. & Boelens, R. (2005). Solution structure of the C1-subdomain of *Bacillus stearothermophilus* translation initiation factor IF2. *Protein Sci* 14(9), 2461-8.
- Wimberley, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407(6802), 327-39.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K.R., Earnest, T.N., Cate, J.H. & Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-896.
- Yusupova, G., Reinbolt, J., Wakao, H., Laalami, S., Grunberg-Manago, M., Romby, P., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996) Topography of the *Escherichia coli* initiation factor 2/fMet-tRNA(f)(Met) complex as studied by cross-linking. *Biochemistry* 35, 2978-2984.
- Zamecnik, P.C., Lofffield, R.B., Stephenson, M.L., Williams, C.M. (1949) Biological synthesis of radioactive silk. *Science* 109(2843), 624-626.
- Zhang, W., Dunkle, J.A. & Cate, J.H. (2009). Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* 325(5943), 1014-7.