

Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath

Premios Nobel de Química 2009:

"por sus estudios sobre la estructura y función del Ribosoma"

Bárbara M. Calisto, Ignacio Fita

Resumen: El premio Nobel de Química del 2009 ha sido concedido a Venkatraman Ramakrishnan (nacido en Tamil Nadu –India– en 1952) actualmente en el MRC Laboratory of Molecular Biology de Cambridge (Reino Unido), a Thomas A. Steitz (nacido en Milwaukee –WI, USA– en 1940) Sterling Professor en Yale University y a Ada E. Yonath (nacida en Jerusalén –Israel– en 1939) del Weizmann Institute of Science, por sus investigaciones sobre la estructura y función del ribosoma. Los ribosomas son partículas celulares complejas en las que tiene lugar la decodificación de la información genética y la síntesis de proteínas y juegan, por consiguiente, un papel central en la biología de todos los seres vivos.

Palabras clave: Premio Nobel de Química, ribosoma, cristalografía de rayos-X, síntesis de proteínas, código genético.

Abstract: The Nobel Prize in Chemistry 2009 has been awarded to Venkatraman Ramakrishnan (born in Tamil Nadu –India– in 1952) presently at the MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge (United Kingdom), to Thomas A. Steitz (born in Milwaukee –WI, USA– in 1940) Sterling Professor at Yale University and to Ada E. Yonath (born in Jerusalem –Israel– in 1939) at the Weizmann Institute of Science, for their investigations on the structure and functioning of the ribosome. The ribosomes are complex cellular particles where takes place the decoding of the genetic information and the synthesis of proteins and, consequently, play a central role in the biology of all living organisms.

Keywords: Chemistry Nobel Prize, ribosome, X-ray Crystallography, protein synthesis, genetic code.

Introducción

La Real Academia de Ciencias de Suecia ha distinguido con el premio Nobel de Química los trabajos de Venkatraman Ramakrishnan, Ada E. Yonath y Thomas A. Steitz (Figura 1), quienes determinaron las primeras estructuras con resolución atómica de las dos subunidades que componen los ribosomas. Para conseguirlo los tres galardonados han utilizado principalmente la técnica de cristalografía de rayos-X, a menudo de forma innovadora.



Figura 1. V. Ramakrishnan, A. Yonath y T. Steitz comparten el premio Nobel de Química 2009.

El ribosoma es la partícula, biológicamente esencial, que cataliza la síntesis de proteínas en todos los organismos. Este proceso de síntesis se denomina **traducción (translation)**



B. M. Calisto

I. Fita

Departamento de Biología Estructural, IBMB-CSIC;
IRB Barcelona
C/ Baldiri i Reixac, 10 - 08028 Barcelona
C-e: ifrcr@ibmb.csic.es
Recibido: 13/10/2009. Aceptado: 16/11/2009.

porque implica la conversión de la información genética codificada en el lenguaje de los ácidos nucleicos, que se expresa en el alfabeto de cuatro letras de los nucleótidos, al lenguaje de las proteínas, que se expresa en el alfabeto de veinte letras de los aminoácidos (Figura 2). Para ello el ribosoma es capaz de catalizar la formación del enlace peptídico, pero también decodifica la información genética interviniendo en los procesos de reconocimiento específico, entre las moléculas de RNA (en sus siglas inglesas) mensajeros (mRNAs) y de transferencias (tRNAs), de los cuales depende la fidelidad de la traducción.

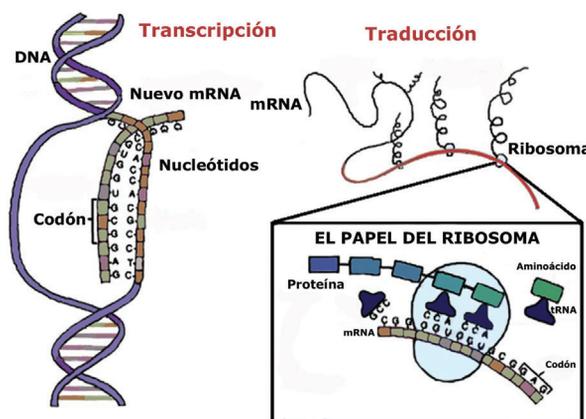


Figura 2. La información genética fluye desde el DNA (en sus siglas inglesas) hasta las proteínas a través de los procesos primero de **transcripción**, en el que se generan las moléculas de mRNA, y después de **traducción**, en el que se produce la decodificación de los mRNAs en términos de una secuencia de aminoácidos.

Todos los ribosomas están constituidos por dos subunidades denominadas pequeña y grande, que en procariontes se indican respectivamente como 30S y 50S de acuerdo con su comportamiento en sedimentación (Figura 3). En ambas subunidades unos dos tercios del peso corresponden a ARN ribosómico (rRNA) y el resto a diversas proteínas. La arquitectura y los aspectos esenciales del *modus operandi* de los

ribosomas se han conservado a lo largo de la evolución, aunque los ribosomas eucariotas son sensiblemente mayores, contienen más componentes y presentan un funcionamiento más complejo, en particular en lo concerniente a la interacción con membranas celulares.

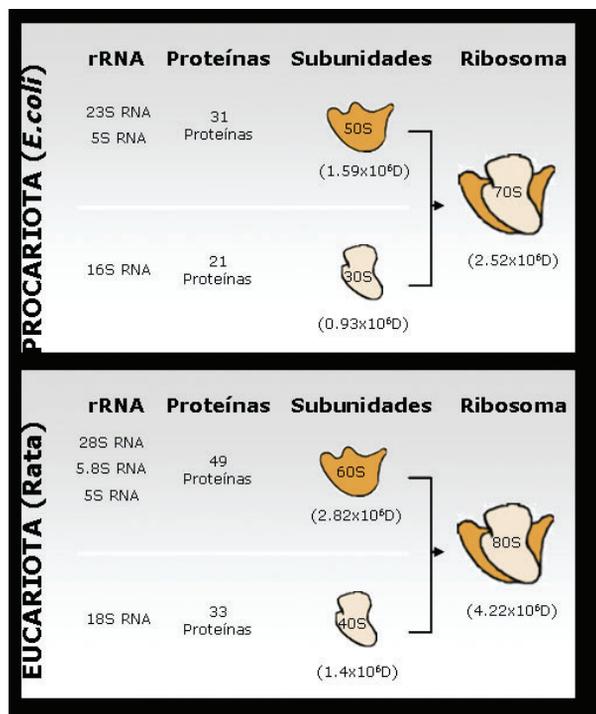


Figura 3. Composición de los ribosomas procariota y eucariota.

Dada su importancia biológica y como diana de una gran variedad de antibióticos de uso clínico, el ribosoma ha sido objeto de intensas y continuadas investigaciones desde que a mediados de los años 60 se dilucidó el código genético. Estas investigaciones, en las que se han utilizado prácticamente todas las técnicas bioquímicas y biofísicas imaginables, condujeron, y en buena parte culminaron, en el 2000 (*annus mirabilis* para el mundo del ribosoma) con la presentación primero de la estructura de la subunidad 50S de *Haloarcula marismortui* a 2.4 Å de resolución (Figura 4)^[1] y, unas pocas semanas después, de la subunidad 30S de *Thermus thermophilus* a 3,3 y 3,0 Å de resolución (Figura 5),^[2,3] por los grupos que dirigían los galardonados con el premio Nobel de Química de este año.

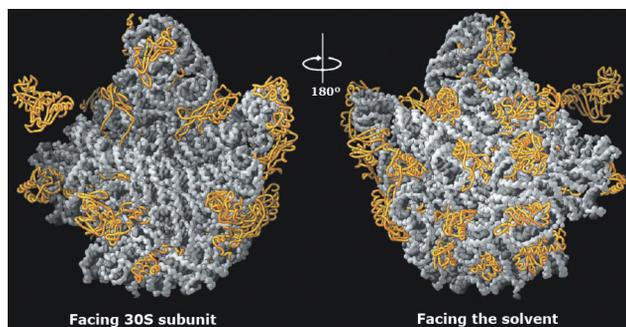


Figura 4. Estructura de la subunidad ribosomal 30S de *Haloarcula marismortui* (adaptado del trabajo de Steitz y colaboradores (1)). En gris se representa el rRNA y en amarillo las distintas proteínas asociadas.

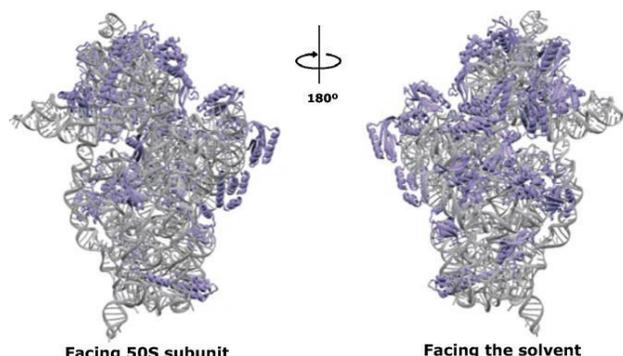


Figura 5. Estructura de la subunidad ribosomal 50S de *Thermus thermophilus* (adaptado del trabajo de Ramakrishnan y colaboradores (3)). En gris se representa el rRNA y en azul las distintas proteínas asociadas.

La carrera hacia la alta resolución

La técnica de cristalografía de rayos-X que, como se indica en el comunicado de la Academia de Ciencias de Suecia, han utilizado intensamente los tres galardonados, permite en principio alcanzar resoluciones atómicas o cuasi-atómicas (más altas, mejores, que 3,5 Å) de una determinada estructura molecular sólo si se logran superar dos requisitos indispensables: disponer de cristales adecuados (Figura 6) y resolver *el problema de la fase* para esos cristales. Dada la complejidad bioquímica y estructural de los ribosomas la superación de esos dos requisitos se ha prolongado durante varias décadas en una esforzada carrera entre diversos grupos de investigación jalonada de progresos metodológicos y logros científicos.



Figura 6. Cristales de las partículas ribosomales 30S, 50S y 70S.

En 1980, Yonath, Wittmann y colaboradores publicaron los primeros cristales de la subunidad grande (50S) del ribosoma de *Bacillus stearothermophilus*.^[4] Cinco años más tarde de nuevo Yonath y Wittmann, después de numerosos intentos para mejorar la calidad y la estabilidad, obtuvieron cristales de la subunidad ribosomal 50S de *Haloarcula marismortui*, un microorganismo originario de los ambientes salinos extremos del Mar Muerto.^[5] Variantes de estos cristales fueron los que finalmente han proporcionado la estructura a resolución atómica presentada en agosto del 2000 por el grupo de Steitz.^[1] Se da la paradoja que el grupo de Yonath, que tuvo el acierto incuestionable de obtener los cristales adecuados de las partículas 50S a partir de *H. marismortui*, no aparece en las publicaciones sobre la resolución de la estructura de esas partículas, que fue llevada a cabo íntegramente en el laboratorio de Steitz.

Los precursores de los cristales de la subunidad 30S de *Thermus thermophilus*, que finalmente permitieron a los galardonados Yonath y Ramakrishnan la determinación de la estructura de esta subunidad a resolución atómica,^[2,3] fueron producidos por primera vez en la U.S.S.R. por Trakhanov, Yusupov y colaboradores en 1987.^[6] Poco tiempo después,

crisales similares y del mismo organismo termófilico, fueron también publicados por Yonath.^[7] En ambas publicaciones se presentaban además crisales de los ribosomas completos, las partículas 70S, formados por la interacción de las subunidades 30S y 50S. Los crisales de las partículas 70S han permitido al laboratorio del Dr. H.F. Noller (U.S.A.), en colaboración con Yusupov, la determinación, a unos 5 Å de resolución, de las estructuras de ribosomas completos y formando diversos complejos con moléculas de tRNA y de mRNA (Figura 7).^[8,9] Es difícil evitar la polémica sobre la importancia y los méritos de las distintas aportaciones de los científicos implicados, tanto en lo que respecta a los crisales de las subunidades 30S como a los de las partículas 70S. De nuevo se produce una situación que a primera vista parece sorprendente con dos de los grupos galardonados, Yonath y Ramakrishnan, resolviendo de forma totalmente independiente y casi simultáneamente la subunidad 30S del mismo microorganismo *T. thermophilus*. Lo sorprendente de la situación se acentúa al considerar que los trabajos sobre la estructura de la partícula ribosomal completa (70S), también de *T. thermophilus*, de mayor complejidad que las subunidades por separado y con una importancia funcional y biológica evidentes, no han sido reconocidos en los premios Nobel de este año, probablemente por no haber logrado una resolución que pueda considerarse auténticamente (cuasi)-atómica. De ser así, y reconociendo que la diferencia en resolución entre 3,5 y 5 Å es crítica para obtener interpretaciones estructurales a nivel atómico, se podría ironizar que el trabajo de Noller y Yusupov se ha quedado a menos de 2 Å del preciado galardón.

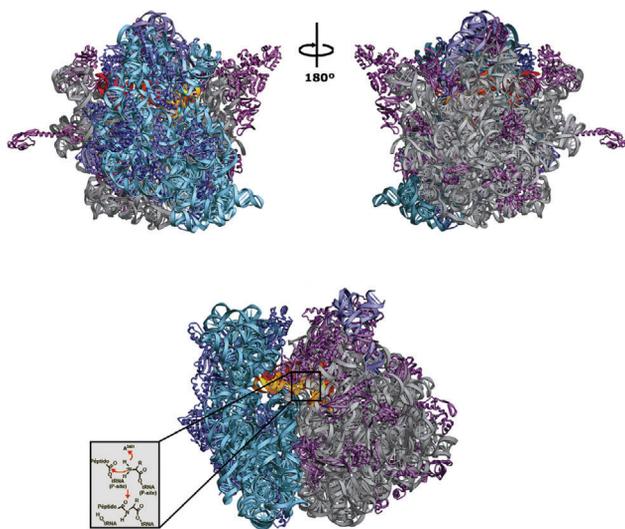


Figura 7. Estructura del ribosoma completo (partícula 70S) en complejo con tres moléculas de tRNA representadas en tonalidades que van desde el rojo al amarillo (adaptado del trabajo de Noller y colaboradores (9)). La subunidad 30S se representa en azul claro para el rRNA y en azul oscuro para las proteínas asociadas. La subunidad 50S se representa en gris para el rRNA y violeta para las proteínas asociadas. El centro catalítico, donde tiene lugar la formación del enlace peptídico, está conformado exclusivamente por el rRNA y se indica en el recuadro adjunto.

La primera evidencia convincente de que *el problema de la fase* podía ser resuelto en los crisales de las subunidades ribosomales no llegó hasta 1998 cuando Frank, Moore, Steitz y colaboradores obtuvieron un mapa de la densidad electrónica de los crisales de la subunidad 50S de *H. marismortui* en el que, a 9 Å de resolución, se podían reconocer fragmentos de las

dobles hélices dextrógiras del rRNA.^[10] En este trabajo fue decisiva la información de criomicroscopía electrónica proporcionada por el laboratorio del Dr. J. Frank, coautor del trabajo.

Hasta ese momento la técnica de microscopía electrónica había realizado las aportaciones más relevantes al estudio de la estructura de los ribosomas principalmente gracias a los progresos metodológicos y a los resultados de los laboratorios de los Drs. Frank y van Heel en los EE UU y Europa, respectivamente. Para estructuras moleculares con los tamaños de las subunidades del ribosoma (o mayores) sólo la técnica de criomicroscopía electrónica puede proporcionar información estructural de alta resolución equiparable a la obtenida mediante cristalografía de rayos-X. En realidad la microscopía electrónica tiene dos grandes ventajas y, en la práctica, una importante limitación con respecto a la cristalografía de rayos-X. Las dos grandes ventajas soslayan los más difíciles requisitos de la cristalografía de rayos-X ya que en microscopía no se necesitan crisales y *el problema de la fase* queda resuelto experimentalmente gracias a la existencia de lentes electromagnéticas. La importante limitación de los estudios de microscopía electrónica se debe a que sólo se logra alcanzar resoluciones (cuasi)-atómicas en casos especialmente favorables, nunca de momento en estudios sobre el ribosoma donde las mejores resultados de microscopía están todavía alrededor de los 7 Å. Estas peculiaridades parecen explicar que en los estudios estructurales sobre el ribosoma la microscopía electrónica, a pesar de sus importantes contribuciones y de ser más versátil en la elección de muestras y más rápida en el análisis que la cristalografía de rayos-X, perdiera paulatinamente protagonismo ante la prioridad de obtener información con detalle atómico.

Otras estrategias que, en etapas posteriores, también contribuyeron a la resolución *del problema de la fase* en los crisales de las subunidades ribosomales ha consistido en extensiones de técnicas clásicas en cristalografía de proteínas, en particular el reemplazo isomorfo y la difracción anómala, a la problemática específica del ribosoma. Estas extensiones se han basado principalmente en el uso de compuestos de clústeres de átomos pesados, tales como el $Ta_6Br_{12}^{2+}$, y en la utilización de la fuerte difracción anómala de los iones de lantánidos así como del Osmio, el Iridio y otros elementos. En este tema los tres galardonados, y especialmente Ramakrishnan, han realizado aportaciones muy importantes.

Los crisales de ribosoma planteaban una serie de dificultades en recolección de datos y de computación que no podían abordarse con la metodología disponible en 1980. No obstante, a mediados de los 90 los progresos tecnológicos en detectores bidimensionales y la existencia de ordenadores y sistemas gráficos mucho más capaces y de programas cristalográficos más elaborados habían abierto la puerta a la resolución de estructuras de la complejidad del ribosoma. Otros avances metodológicos importantes, en buena parte promovidos por las necesidades de la cristalografía de ribosomas, fueron el desarrollo de las fuentes de luz de sincrotrón con longitudes de onda ajustables y la crio-cristalografía, de la cual Yonath fue uno de los pioneros más significados.

El ribosoma a resolución atómica

La enorme cantidad de información proporcionada por las estructuras determinadas por los galardonados admite análisis muy variados con implicaciones conceptuales y aplicadas de

gran trascendencia. Nos limitaremos aquí a sólo unas breves consideraciones relativas al mundo de la estructura y la bioquímica del RNA. La cantidad de estructuras de RNA conocidas a nivel atómico se multiplicaron aproximadamente por un factor de 10, cuando se publicaron las estructuras del ribosoma. Una expansión similar se produjo en el aumento de la información sobre los complejos y las interacciones RNA-proteína. El centro activo de los ribosomas en los que tiene lugar la formación del enlace peptídico, denominado el centro peptidil transferasa, se encuentra en una región altamente conservada en todos los ribosomas y formada exclusivamente por el RNA ribosómico. En ese centro catalítico el ribosoma actuaría por consiguiente como un ribozima: un enzima de RNA. Las proteínas, responsables de la práctica totalidad de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en los seres vivos, dependerían de un catalizador de RNA para su propia síntesis. La universalidad de la organización del centro peptidil transferasa en ribosomas implica su existencia independientemente de las condiciones ambientales y, por consiguiente, parece corresponder a los restos de una maquinaria de síntesis primitiva, un proto-ribosoma, probablemente capaz de producir oligopéptidos no codificados. Esta organización ancestral evoca la existencia de un "mundo de RNA" durante las primeras fases de la evolución de la vida.

Durante los últimos años los tres galardonados, y también otros investigadores, han continuado obteniendo de forma acelerada importantes resultados mediante la cristalografía de rayos-X de diversos complejos y variantes ribosomales. No obstante, y a pesar de la ingente cantidad de información que esas estructuras, interpretadas ahora a resolución atómica, proporcionan, no lo revelan todo sobre el funcionamiento del ribosoma. Durante la síntesis de proteínas el ribosoma realiza procesos complejos en los cuales se desplaza a lo largo de la molécula de mRNA y utiliza los aminoácidos que le llegan con los correspondientes tRNAs para forjar la cadena polipeptídica que está siendo sintetizada (Figura 2). Además de esta actividad "normal" de síntesis, el ribosoma tiene también que ser capaz de enfrentarse a toda una serie de eventualidades (corrección de errores, interacción con diversos factores de regulación, control del plegamiento y de las interacciones de las proteínas que están siendo sintetizadas). Para visualizar el funcionamiento completo del ribosoma a lo largo de todos esos procesos se necesitaría una película que describiera cada una de las conformaciones e interacciones que el ribosoma adopta. En este sentido el limitado número de "fotos fijas" que proporcionan las estructuras determinadas por cristalografía resultan claramente insuficientes. Además producir cristales adecuados para estudios de alta resolución de todos los estados por los que atraviesa el ribosoma resulta extremadamente difícil o directamente imposible. La microscopía electrónica, recuperando protagonismo en los estudios estructurales sobre el ribosoma gracias a sus enormes posibilidades experimentales y utilizando la información a nivel atómico ahora disponible, está permitiendo grandes avances en esta visión integrada sobre el funcionamiento del ribosoma. En realidad, la combinación de cristalografía de rayos-X

y microscopía electrónica se presenta ahora como la forma más fructífera de abordar el estudio de los grandes complejos macromoleculares y, en particular, del ribosoma.

Conclusiones

Los resultados alcanzados por los tres galardonados están resultando decisivos en la comprensión del funcionamiento del ribosoma a nivel atómico. No obstante, probablemente se necesitarán todavía años de trabajos para poder responder a las muchas incógnitas que continúan existiendo. Entre esos retos ocuparía un lugar destacado los estudios estructurales de alta resolución sobre el ribosoma eucariota.

Aunque son incuestionables la importancia y la singularidad de las contribuciones de Steitz, Yonath y Ramakrishnan, así como la trascendencia de los resultados alcanzados, no se puede olvidar a los muchos científicos cuyas investigaciones han creado el marco adecuado con aportaciones que, en originalidad e importancia, parecen en algunos casos concretos (Frank, Noller, Yusupov, Moore,...) equiparables a las de los tres galardonados este año.

El premio Nobel de Química del 2009 a Steitz, Yonath y Ramakrishnan por sus estudios sobre la estructura y función del ribosoma aumenta la ya larga lista de galardones concedidos a la investigación química asociada a determinados sistemas biológicos. En su conjunto todos estos premios presentan a la biología como fuente de inspiración de una química extrema en cuanto a versatilidad, complejidad y posibilidades.

Bibliografía

- [1] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905–920.
- [2] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2000**, *102*, 615–623.
- [3] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. J. Clemons, R. Morgan-Warren, C. von Rhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature*, **2000**, *407*, 327–339.
- [4] A. Yonath, J. Mussig, B. Tesche, S. Lorenz, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, *Biochem. Int.* **1980**, *1*, 428–435.
- [5] A. Shevack, H.S. Gewitz, B. Hennemann, A. Yonath, H. G. Wittmann. *FEBS Lett.* **1985**, *184*, 68–71.
- [6] S. D. Trakhanov, M. M. Yusupov, S. C. Agalarov, M. B. Garber, S. N. Ryazantsev, S. V. Tischenko, V. A. Shirokov, *FEBS Lett.* **1987**, *220*, 319–322.
- [7] C. Glotz, J. Mussing, H.S. Gewitz, I. Makowski, T. Aradm, A. Yonath, H. G. Wittmann. *Biochem. Int.* **1987**, *15*, 953–60.
- [8] J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, *Science* **1999**, *285*, 2095–2104.
- [9] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, *292*, 883–896.
- [10] N. Ban, B. Freeborn, P. Nissen, P. Penczek, R. A. Grassucci, R. Sweet, J. Frank, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **1998**, *93*, 1105–1115.