

# 30

## CAPÍTULO

### Traducción

La traducción constituye la etapa crucial en el mecanismo de expresión de la información genética. Es en este proceso donde tiene lugar la síntesis de la proteína específica que ha de cumplir una función determinada en la célula o el organismo, con lo cual la información contenida en los genes quedará totalmente expresada. En la traducción se realiza el tránsito del genotipo al fenotipo.

La explicación de la biosíntesis de proteínas en términos moleculares constituye por tanto un problema central de la biología molecular. En 1961 es que se obtuvieron los primeros progresos significativos en el estudio de este proceso, a partir de extractos bacterianos que sintetizaban proteínas activamente. Estudios más recientes en eucariontes permiten afirmar que, en líneas generales, el proceso ocurre de forma similar en todos los organismos vivos y que las mayores diferencias radican en sus mecanismos de control.

El estudio de la traducción incluye 3 grandes aspectos: el informacional o del código, que ya fue estudiado en el capítulo 28; el topográfico o de la estructuración del sistema sintetizador de proteínas, visto en el capítulo 29, y el químico, o sea, el problema concreto de la síntesis de las proteínas, es decir, la iniciación de la síntesis, la unión de los aminoácidos en el orden correcto, la liberación de la cadena polipeptídica neoformada, la adquisición de su conformación y, en ocasiones, las modificaciones que ocurren simultánea o posteriormente a la síntesis. A este último aspecto está dedicado el contenido del presente capítulo.

Como se hizo en los casos anteriores este proceso se estudiará en primer lugar cómo ocurre en procariontes, especialmente en la *E. coli* como punto de referencia para el estudio en eucariontes, basado en el sistema de reticulocitos de conejos que es el que ha sido estudiado de forma más completa.

### Primeros aportes

A mediados de la década de los 50 Crick propuso la hipótesis de que no existía una interacción directa entre los aminoácidos y los ácidos nucleicos que los codificaba y que era necesaria una molécula adaptadora sin poder precisar nada sobre ella. Esta idea se vio corroborada pocos años después cuando en 1957, Hoagland descubrió un tipo de ARN capaz de unirse específicamente con aminoácidos y que se denominó soluble, pero que más tarde se nombró de transferencia (ARNt).

Un aspecto interesante del problema fue resuelto en una elegante experiencia realizada por Howard Dintzis, quien determinó la dirección en que se produce la síntesis. Para ello se utilizaron reticulocitos que sintetizaban hemoglobina activamente. Las células se exponían a aminoácidos marcados con  $^3\text{H}$  durante diferentes períodos, que siempre eran

menores que el requerido para la síntesis de la proteína. La hemoglobina se extraía y se separaban las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que eran entonces tratadas con tripsina. A los péptidos resultantes se les medía la radiactividad y se comprobaba que ésta era mayor hacia el extremo carboxílico. De hecho había un gradiente de incremento de radiactividad desde el extremo N terminal hacia el C terminal, por lo tanto, esa era la dirección de la síntesis. Los experimentos para dilucidar el código genético ya habían mostrado que el ARNm se leía en el sentido 5'  $\rightarrow$  3'. A esta relación entre la dirección de lectura del ARNm y la de síntesis de la cadena polipeptídica se le denomina colinealidad.

Otro hecho sobresaliente fue puesto al descubierto en el laboratorio de *Frederick Sanger*, quien dejó establecido que existe un codon específico para la iniciación y que éste es leído por un ARNt específico que difiere estructuralmente del resto de las moléculas del mismo tipo.

*Sanger* también pudo determinar que este ARNt era cargado con la metionina y que a ésta se unía un grupo formilo, formando la formilmetionina, primer aminoácido que era incorporado a la síntesis de proteínas.

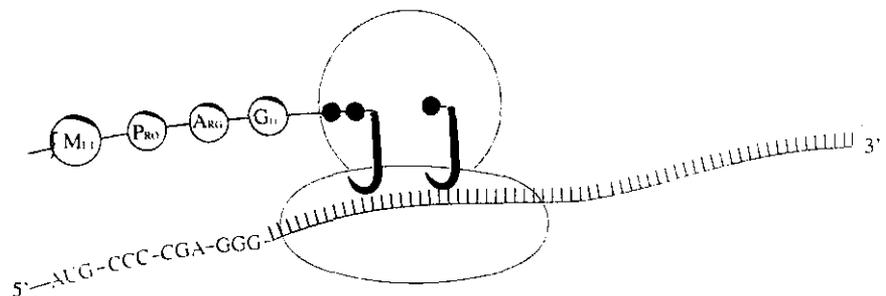
El interés por los mecanismos de síntesis de proteínas es tal, que son muchos los hombres y los laboratorios que han realizado aportes al esclarecimiento del proceso hasta el nivel en que se encuentra en nuestros días.

### Características generales

La traducción tiene lugar en un organelo citoplasmático específico (los ribosomas) y se produce forma unidireccional desde el extremo N terminal hacia el C terminal, colinealmente a la lectura del ARNm (Fig. 30.1). Tiene carácter gradual y repetitivo, pues los aminoácidos van incorporándose uno a uno mediante el mismo mecanismo. También posee carácter acoplado, pues la energía necesaria para el proceso proviene de la hidrólisis de nucleósidos trifosfatados. Tiene carácter dirigido, pues el orden que los aminoácidos ocupan en la cadena polipeptídica está determinado por el orden de los codones en el ARNm.

Para la realización de la traducción se requiere de más de 200 macromoléculas y transcurre a una velocidad promedio de unos 10 aminoácidos incorporados por segundo.

Fig. 30.1. Colinealidad ARNm proteína. A medida que el ARNm se va leyendo en el sentido 5'  $\rightarrow$  3', la cadena polipeptídica se va sintetizando desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal; de esta forma la posición de los aminoácidos en la cadena polipeptídica queda determinada por la posición de los codones correspondientes en el ARNm.



En el estudio de la traducción se considerarán de manera secuencial las mismas etapas que en los procesos anteriores, o sea, los eventos previos a la iniciación, la iniciación, la elongación, la terminación y los eventos posteriores a la terminación.

### Eventos previos a la iniciación

Se tomará como evento previo a la iniciación el proceso mediante el cual los aminoácidos son unidos enzimáticamente a su ARNt específico y que recibe el nombre de activación de aminoácidos.

La formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro es termodinámicamente desfavorable. Además, los aminoácidos por sí no pueden reconocer los codones sobre el ARNm y ordenarse en la forma adecuada, estos 2 obstáculos son salvados por la reacción de activación.

La enzima que cataliza esta reacción fue aislada por primera vez a finales de la década de los 50 a partir de extractos de hígado de rata, y ha ido recibiendo diferentes nombres hasta la actualidad en que se conoce con el nombre genérico de aminoacil-ARNt sintetasa.

Esta enzima constituye hasta el 10 % de las proteínas celulares, lo que equivale de unas 1 000 a 5 000 moléculas por célula con sus variaciones de acuerdo con el estado de la actividad celular.

Hasta el momento se conoce que en las bacterias existe una enzima para cada uno de los 20 aminoácidos. Cualquier modificación del aminoácido ocurre con posterioridad a la acción de la enzima. Como un aminoácido puede ser unido a más de un ARNt (especies isoceptoras) debe existir en ellos alguna analogía estructural que le permita ser reconocidos por la misma enzima.

Las aminoacil-ARNt sintetetas constituyen una familia de enzimas que estructuralmente pueden clasificarse en 3 grupos: tipo I, consisten en enzimas monoméricas formadas por una sola cadena polipeptídica de 110 a 120 kD, como las activantes de valina e isoleucina de la *E. coli*; tipo II, formadas por 2 subunidades idénticas de 100 a 180 kD, como las de prolina, triptófano y metionina de la *E. coli*, y tipo III, formadas por 4 subunidades iguales 2 a 2 de aproximadamente 280 kD, como de la fenilalanina de la *E. coli*.

Todas ellas catalizan la esterificación de un aminoácido al ARNt correspondiente, lo cual se conoce generalmente como «cargar» el ARNt. Para simbolizar al ARNt específico para un aminoácido, por ejemplo para la alanina, se escribe ARNt<sup>Ala</sup> y para señalar con cuál aminoácido está cargado se escribirá Ala-ARNt, por lo que la escritura completa sería Ala-ARNt<sup>Ala</sup>. Es importante recordar esta notación pues en ocasiones, se utilizan con fines experimentales ARNt cargados con un aminoácido diferente al que le corresponde y la notación ayudará a distinguir de qué se trata en cada caso.

Los estudios sobre el mecanismo de reacción hacen posible su separación en 2 etapas, la primera, llamada de activación propiamente dicha, y la segunda, de transferencia; ambas etapas son reversibles (Fig. 30.2).

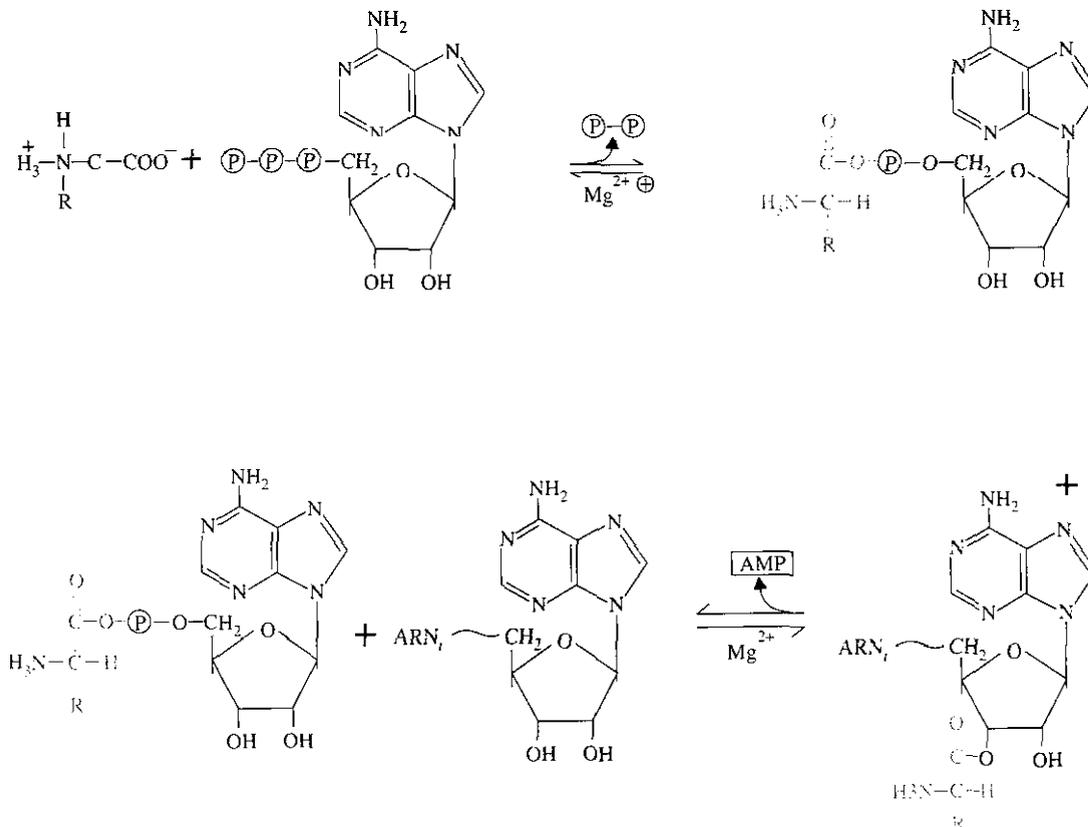


Fig. 30.2. Activación de los aminoácidos. Los aminoácidos son unidos en una primera etapa al fosfato a del ATP, formando un aminoaciladenilato que en una segunda etapa reacciona con el ARNt correspondiente, transfiriéndole su grupo aminoacilo; ambas etapas de la reacción son reversibles y catalizadas por las aminoacil-ARNt-sintetasas.

En la primera etapa la enzima en presencia de iones  $Mg^{2+}$  transfiere el aminoácido por su grupo carboxilo al fosfato más interno del ATP, formándose un enlace anhídrido mixto de alta energía. Esto da lugar a la formación de pirofosfato que abandona la enzima y un aminoaciladenilato que permanece unido al centro activo de la sintetasa. La hidrólisis del pirofosfato favorece el sentido de la reacción.

En la etapa de transferencia el grupo aminoacilo del aminoaciladenilato se transfiere al resto de ribosa del extremo 3' -OH del ARNt correspondiente, formándose el aminoacil-ARNt y AMP. Existen 2 familias de enzimas que se diferencian en que una de ellas transfiere el aminoácido hacia el 3' -OH y la otra hacia el 2' -OH, lo cual depende de la forma en que se produce la unión enzima sustrato. De todas formas el grupo aminoacilo puede migrar del 3' al 2', y viceversa, unas 10 000 veces por segundo. Como ya fue expresado, la reacción general es reversible y presenta una constante de equilibrio que varía entre 0,3 y 0,7, dependiendo del aminoácido, de lo que se deduce que el enlace éster del aminoacil-ARNt tiene un contenido energético comparable con el del enlace anhídrido de ácido del ATP.

Del mecanismo expuesto se infiere que las sintetetas poseen una doble especificidad, pues por una parte deben reconocer al aminoácido específico y por otra al ARNt que le corresponde. La traducción correcta del mensaje genético depende en elevado grado de la especificidad de esta reacción, pues no se conoce un mecanismo de rectificación como el de la replicación. De las 2 etapas, la de mayor especificidad es la segunda. Esto se pudo comprobar cuando se utilizó la sintetasa específica para la isoleucina, e incubándola con valina se logró la formación del valil-AMP, pero al añadir el ARNt<sup>Val</sup> en vez de producirse la transferencia del grupo valilo al ARNt, se estimuló la hidrólisis del valil-AMP.

Casi todos los aminoácidos una vez unidos a su ARNt correspondiente están en condiciones de unirse a los ribosomas para la síntesis de proteínas, no obstante, existe una notable excepción. Se trata de aquél que va a servir para la iniciación.

Como ya se estudió en el capítulo 28, el codon de iniciación es el AUG (y en algunos organismos el GUG), que además codifica la metionina. Sanger descubrió que existen 2 tipos de ARNt<sup>Met</sup>, uno que se emplea en la iniciación, el ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>, y otro para las posiciones interiores, el ARNt<sub>m</sub><sup>Met</sup>. La misma sintetasa cataliza la unión de los 2 ARNt a la metionina, pero el Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> es posteriormente modificado por la acción de una transformilasa específica que utiliza como donante activado de formilo el N<sup>10</sup>formiltetrahidrofolato (FH<sub>4</sub>), como aparece representado en la figura 30.3. El producto de la reacción se denomina N-formilmetionil-ARNt (fmet-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>). Esta enzima sólo reconoce al ARNt<sub>i</sub> y no al ARNt<sub>m</sub>, lo cual hace suponer la existencia de diferencias estructurales entre los 2 ARNt<sup>Met</sup>. La formilación de la metionina en el ARNt<sub>i</sub> es esencial para la iniciación de la síntesis de proteínas. La traducción de ARNm virales añadidos a extractos bacterianos es bloqueada por la adición de trimetiprina, un potente inhibidor de la dihidrofolato reductasa, sin embargo, la inhibición es suprimida por la adición de N<sup>10</sup>formil-FH<sub>4</sub> o de fmet-ARNt<sub>i</sub>.

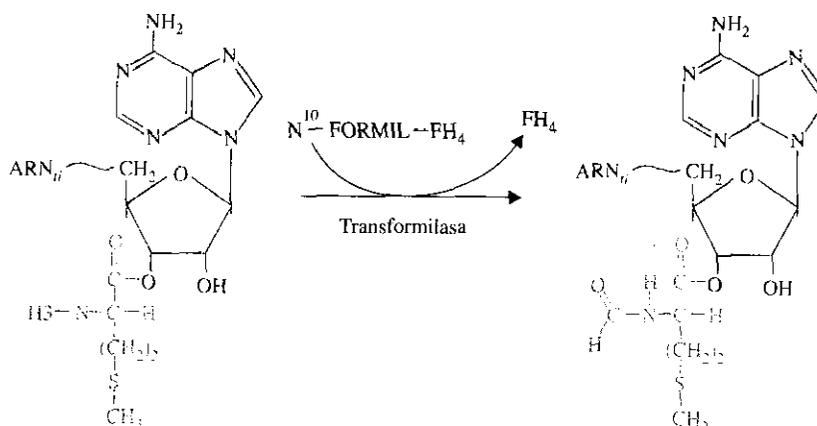


Fig. 30.3. Reacción de formilación del metionil ARNt iniciador. Una enzima transformilasa, que utiliza como donante de formilo al N<sup>10</sup>formil-tetrahidrofolato, modifica el grupo amino de la metionina unida al ARNt<sub>i</sub>. Esta reacción es indispensable para la iniciación de la traducción en procariontes.

## Iniciación

La traducción comienza con la formación de un complejo de iniciación 70 S. Los componentes que interactúan son las 2 subunidades del ribosoma, ARNm, fmet-ARN<sub>t</sub><sup>Met</sup> y GTP; se requiere además la participación de 3 proteínas llamadas factores de iniciación e identificadas simbólicamente como FI-1, FI-2 y FI-3. Los FI-1 y FI-3 son proteínas básicas, relativamente estables al calor y formadas por una sola cadena polipeptídica; el FI-1 con un peso de 8,9 a 9,4 kD y de 21 a 23,5 kD, el FI-3. Por otra parte el FI-2 es una proteína ácida y termolábil con un peso de 90 a 118 kD.

A continuación se describe la secuencia de eventos que llevan a la formación de este complejo. Para lograr una mejor comprensión se ha dividido en 4 fases (Fig. 30.4).

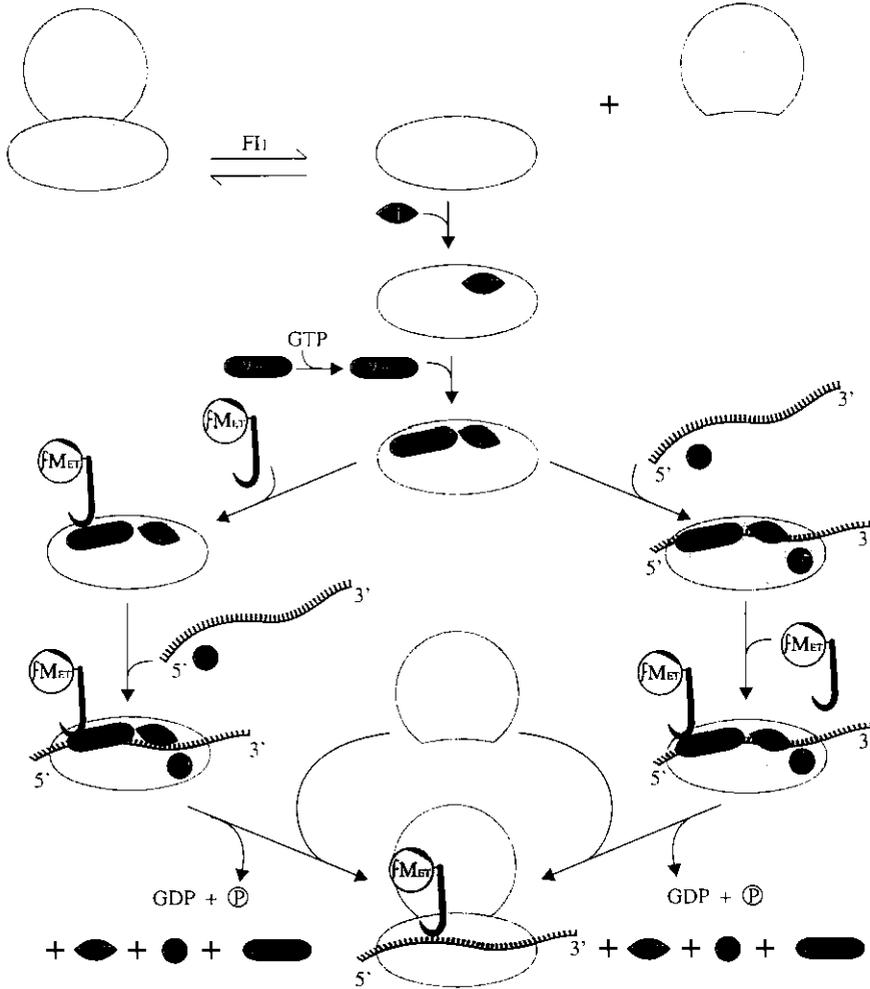


Fig. 30.4. Etapa de iniciación. Al disociarse los ribosomas estimulados por FI-1, éste se une a la subunidad menor e impide su reasociación con la mayor. El resto de los factores quedan también incorporados a la subunidad menor; entonces puede ocurrir que el IF-GTP incorpore al fmet-ARN<sub>t</sub> o que el FI-3 incorpore al ARNm. El paso siguiente completa la incorporación de todos los componentes y la fase se completa al reincorporarse la subunidad mayor.

### Formación del complejo de preiniciación

En el citoplasma celular los ribosomas se encuentran asociados como partículas 70 S y disociados en un equilibrio dinámico. En concentraciones fisiológicas de Mg<sup>2+</sup> casi todos están asociados. La disociación de los ribosomas se produce por la acción combinada de FI-1 y FI-3. El FI-1 aumenta la velocidad de disociación de los ribosomas, con lo cual se incrementa el número de subunidades 30 S libres a las cuales se une entonces el FI-3 impidiendo su reasociación con las subunidades mayores. Como el complejo 30 S:FI-3 es incapaz de unirse a la 50 S, de hecho desplaza el equilibrio hacia la disociación, permitiendo la unión de más FI-3. El FI-2 ligado a GTP se une entonces,

en una unión que es altamente estabilizada por FI-1 y FI-3. Por su parte la unión del FI-1 es estabilizada por FI-2 y FI-3. En experimentos *in vitro* se ha comprobado que cada factor por separado puede unirse a la 30 S, pero la presencia de los 2 restantes estabiliza la unión.

Los 3 factores se unen contiguamente y muy cerca del extremo 3'-OH del ARNr de 16 S y adyacentes a la zona de unión de la 50 S. A la estructura así formada se le denomina complejo de preiniciación.

### **Incorporación del fmet-ARN<sub>t</sub>**

El factor directamente involucrado en la incorporación del fmet-ARN<sub>t</sub> es el FI-2, lo cual se comprobó en experiencias *in vitro* donde era el único capaz de lograr la incorporación del ARN<sub>t</sub> a los ribosomas, utilizando el trinucleótido AUG como ARNm. El FI-2 es incapaz de unirse a formilmetionina libre o unida a polinucleótidos, pero lo hace fuertemente a cualquier ARN<sub>t</sub> cargado con metionina que tenga bloqueado el grupo amino. Parece ser que el fmet-ARN<sub>t</sub> se une sólo al ribosoma de forma muy débil y el complejo FI-2:GTP estabiliza la unión. La incorporación del fmet-ARN<sub>t</sub> determina la salida del FI-3 del complejo. Este evento puede ocurrir antes o después del que se describirá a continuación.

### **Incorporación del ARNm**

La incorporación del ARNm se produce por la intervención del FI-3. El ARNm tiene un sitio de unión al ribosoma determinado por la secuencia 5'---AGGAGGU---3' o parecida (secuencia de Shine y Dalgarno) en una posición similar hacia el lado 5'-P del codón de iniciación; ésta se aparea con una zona rica en pirimidinas del extremo 3'-OH del ARNr de 16 S la 5'---GAUACCUCUA---3'. Este apareamiento posiciona el codón AUG de forma que pueda aparearse con el anticodón del fmet-ARN<sub>t</sub>. El estudio de varias secuencias ha demostrado que la longitud de esta secuencia del ARNm es variable y que el número de pares de bases entre ellas varía de 3 a 9; mientras más pares de bases se formen más eficiente es la unión y menos dependencia existe de la presencia del FI-3. La zona de unión al ribosoma está compuesta por las proteínas S7, S1, S11, S12, S18 y S21.

Normalmente la zona del extremo 3'-OH del ARNr de 16 S está en forma de una horquilla determinada por el apareamiento intracatenario de las bases que no permiten la unión con el ARNm. La acción combinada del FI-3 y de la proteína S1 logran separar las bandas de la horquilla y permiten la interacción por apareamiento de bases entre el ARNm y el ARNr de 16 S.

### **Formación del complejo de iniciación 70 S**

La subunidad 50 S se une ahora y provoca la hidrólisis del GTP unido al FI-2, con lo cual FI-1, FI-2, FI-3, GDP y Pi abandonan el ribosoma y el fmet-ARN<sub>t</sub> deviene activo para la formación del enlace peptídico.

El GTP actúa como un modulador alostérico. Si se emplea GDPCP (Fig. 30.5) éste se une al FI-2 y el complejo FI-2:GDPCP se une al ribosoma, pero no se separa de él al incorporarse la 50 S. Si previamente se remueve el GDPCP, se forma una 70 S totalmente funcional, o sea, la hidrólisis del GTP no es imprescindible para la ubicación del fmet-ARN<sub>t</sub>, sólo para cambiar el efector de GTP a GDP y con ello variar la conformación del FI-2. Se ha postulado que esto produce a su vez una transconformación del fmet-ARN<sub>t</sub> que le permite interactuar con la peptidil transferasa. Este paso se ha denominado acomodación.

Para liberar al FI-2 se requiere la participación del FI-1 en cuya ausencia ni la hidrólisis del GTP permite la liberación del FI-2 ni la incorporación de la 70 S. Parece ser que al hidrolizarse el GTP, el FI-2 queda unido al GDP que debe intercambiar con el FI-1 para abandonar el ribosoma.

Las proteínas L11 y la L7/L12 están involucradas en la hidrólisis del GTP. El contacto entre FI-2:GTP y la prominencia L7/L12 produce en esta última una transconformación que activa la GTPasa unida al ribosoma.

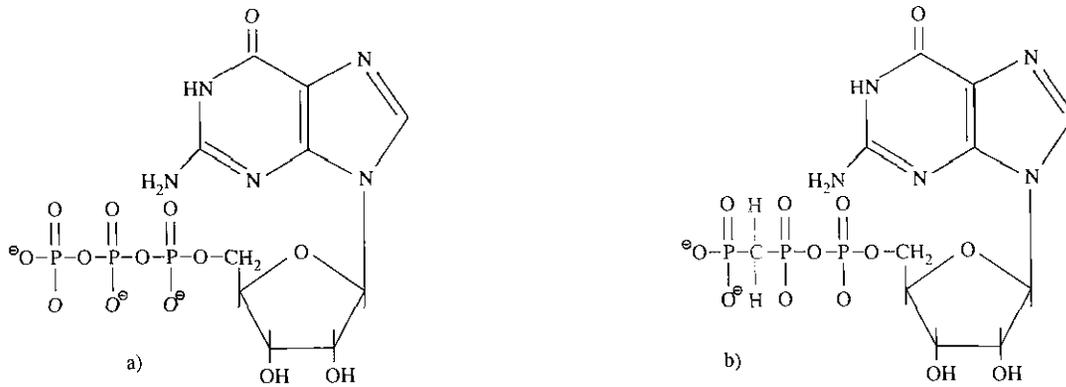


Fig. 30.5. Estructura del GDPCP. La figura muestra las estructuras del GTP y del GDPCP que presenta cómo, en éste último, el grupo fosfato más externo está unido al resto de la molécula por un grupo metileno, por lo cual este compuesto no es hidrolizable como el GTP y resulta de gran utilidad como su análogo.

La etapa de iniciación es la más compleja de todas pero téngase presente que de la adecuada ubicación del codon de iniciación depende que el resto del proceso se lleve a cabo con la fidelidad requerida.

## Elongación

Una vez que se ha formado el complejo de iniciación de 70 S al nivel del codon de iniciación, comienza un proceso de carácter cíclico, en el que cada aminoacil-ARNt se incorpora al sitio A del ribosoma, cuyo sitio P está ocupado por la fmet-ARNt; se produce la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos activados y el movimiento del ribosoma hacia un nuevo codon del ARNm con lo cual vuelve a iniciarse el ciclo, ésta es la etapa de elongación. También en la elongación se requiere la participación de proteínas específicas no ribosomales, que se conocen como factores de elongación y se simbolizan como FE-Tu, FE-Ts y FE-G. Su estudio se realizará por fases como en el caso anterior (Fig. 30.6).

## Incorporación del aminoacil-ARNt

Al producirse el complejo de iniciación de 70 S, un segmento de aproximadamente 30 nucleótidos del ARNm queda cubierto por el ribosoma, pero sólo 2 moléculas de aminoacil-ARNt pueden estar en contacto con el ribosoma al mismo tiempo, de ahí que en la síntesis de proteínas sólo intervienen simultáneamente 2 de los 10 codones cubiertos por los ribosomas; cada uno de los aminoacil-ARNt ocupan sitios diferentes en el ribosoma. El único sitio que puede ser ocupado por el aminoacil-ARNt entrante es el sitio A (de aminoacil) o de entrada. Previo a la entrada del aminoacil-ARNt, el sitio expone el codon que corresponde al siguiente aminoácido que debe ser incorporado a la cadena polipeptídica.

El codon que representa el último aminoácido que ha sido añadido a la cadena ocupa el sitio P (de peptidil) o donador, donde se localiza el polipéptido que ha sido sintetizado hasta ese momento, o el fmet-ARNt, al inicio del proceso.

El factor que interviene en la incorporación del aminoacil-ARNt al sitio A se obtuvo originalmente como una fracción única, a partir de extractos de la *E. coli* y se le llamó factor T, que más tarde fue separado en 2 componentes, uno que era estable al calor y por ello se le llamó FE-Ts (la s por *stable*) y otro que era inestable y se nombró FE-Tu (la u por *unstable*).

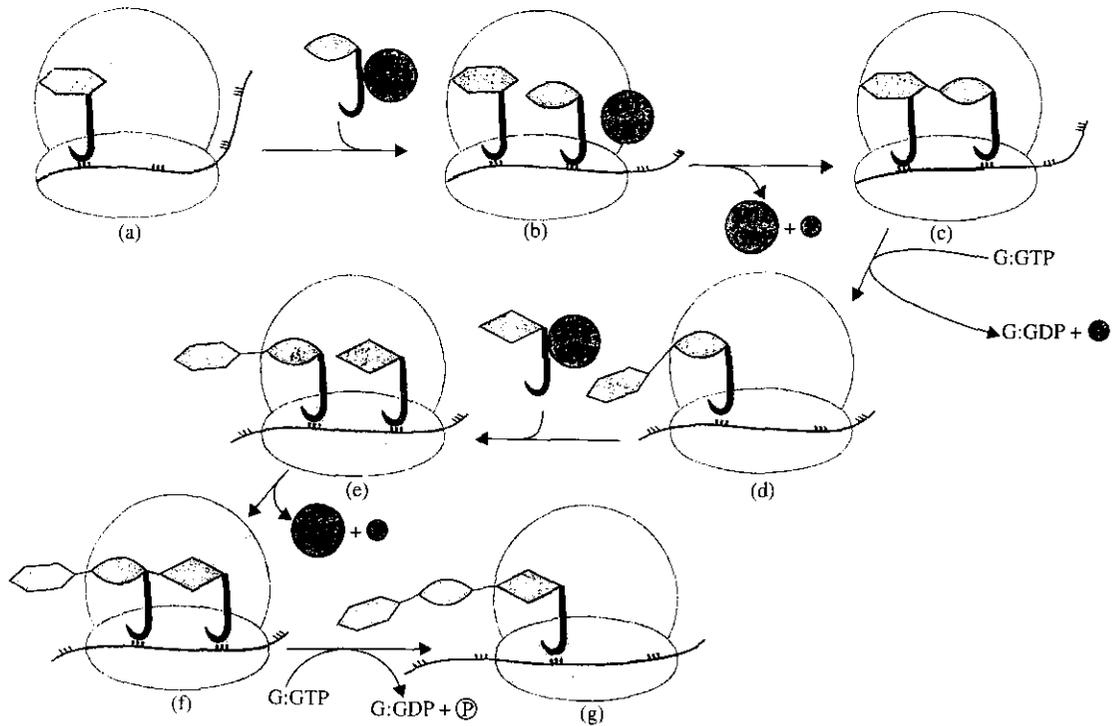


Fig. 30.6. Elongación. Las 3 etapas fundamentales de la elongación se repiten de manera continua tantas veces como aminoácidos tiene la proteína, por eso esta etapa tiene carácter reiterativo. (a) El complejo como queda al final de la iniciación. (b) Se ha incorporado el aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma, que en el paso siguiente (c) queda unido al aminoacil que ocupaba el sitio P. Se produce la translocación (d) y comienza un nuevo ciclo de elongación.

La forma activa del FE-Tu es un complejo binario con el GTP, que entonces puede unirse al aminoacil-ARNt formando un complejo ternario, por lo que es probable que la función del nucleótido de guanina sea la de garantizar la conformación adecuada del factor. Como sucede en la iniciación, la hidrólisis del GTP constituye el mecanismo de variar el efector y con ello su conformación.

La forma activa del FE-Tu puede ser regenerada por EF-Ts, que reacciona con el complejo FE-Tu:GDP y desplaza al GDP al tiempo que se forma un complejo entre los 2 factores FE-Tu:FE-Ts (este fue el que inicialmente se llamó factor T); el FE-Ts es a su vez desplazado por el GTP formándose el complejo FE-Tu:GTP, que puede unirse a un nuevo aminoacil-ARNt y el FE-Ts que puede reciclarse (Fig. 30.7).

Las interacciones entre FE-Tu, FE-Ts y GTP son reversibles *in vitro*, no así la unión con el aminoacil-ARNt, esto es lo que dirige la reacción en un solo sentido.

El FE-Tu es una cadena polipeptídica única de 393 aminoácidos, con un peso molecular de 43 kD y es una de las proteínas más abundantes de la *E. coli*, pues existen unas 70 000 moléculas por célula, lo que representa el 5 % del total de proteínas celulares. Esto es suficiente para poder ligar el *pool* total de aminoacil-ARNt de la célula y aproximadamente 10 veces el número total de ribosomas. La cantidad del FE-Ts es aproximadamente igual al número de ribosomas, lo cual implica que la mayor parte del FE-Tu se encuentra en forma de complejos binarios o ternarios.

En la formación del complejo ternario con el FE-Tu:GTP, la característica estructural más importante del aminoacil-ARNt parece ser el brazo aceptor, aquel donde se une el aminoácido. Los cambios en el nucleótido final de adenina impiden el reconocimiento del aminoacil-ARNt. El único aminoacil-ARNt que no puede ser reconocido por el complejo FE-Tu:GTP es el fmet-ARNt, lo que excluye la posibilidad que la fmet pueda ser incorporada en respuesta a un codón AUG interno. Una razón de este com-

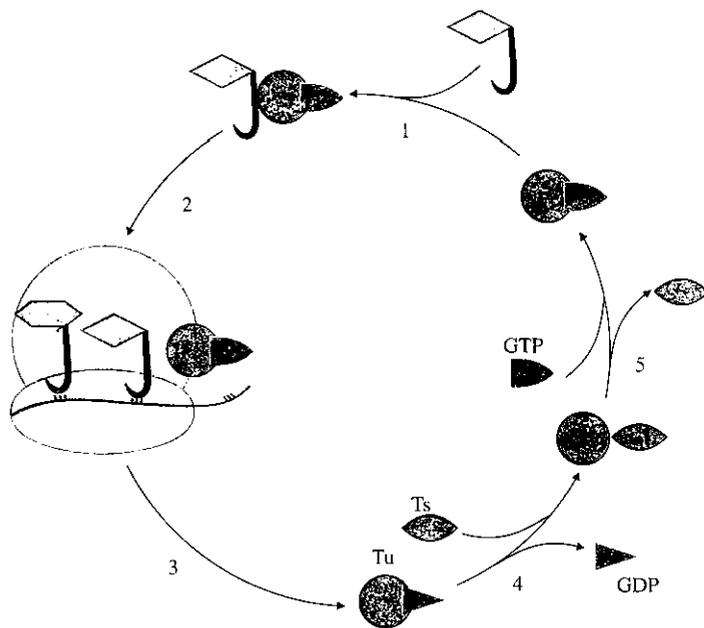


Fig. 30.7. Ciclo del factor de elongación T.  
 1. El FE-Tu (en azul) unido al GTP (en rojo) y reacciona con el aminoacil-ARNt. 2. El complejo formado se incorpora al ribosoma. 3. El GTP es hidrolizado a GDP y complejo Tu|GDP abandona el ribosoma. 4. En ese momento interviene el FE-Ts que se une al FE-Tu desplazando al GDP. 5. Con posterioridad el GTP desplaza al FE-Ts, con lo cual el factor queda en condiciones para recomenzar el ciclo.

portamiento pudiera ser la estructura del brazo aceptor del ARNt, el cual delante del ACCA-aminoacil contiene un C:A no apareado en vez del par presente en todos los demás ARNt. Otro hecho sería la presencia del grupo amino bloqueado, pues se ha comprobado que el bloqueo del grupo amino en otros aminoacil-ARNt impide su unión con el complejo FE-Tu:GTP.

Estudios con GDPCP han demostrado que la hidrólisis del GTP ocurre con posterioridad a la incorporación del complejo aminoacil-ARNt | FE-Tu | GTP al ribosoma pero, previa a la formación del enlace peptídico, se produce la hidrólisis de un GTP por cada aminoacil-ARNt que es incorporado.

### Formación del enlace peptídico

El enlace peptídico se forma en una reacción en la cual se transfiere el grupo unido al ARNt que ocupa el sitio P (sea un péptido o el fmet) hacia el grupo amino del aminoácido unido al ARNt que ocupa el sitio A, catalizada por una actividad de peptidiltransferasa presente en la subunidad 50 S del ribosoma. Estudios recientes indican que existe una notable participación del ARNr en esta actividad catalítica, aunque el concurso de proteínas ribosomales no ha sido descartado totalmente.

Aunque el sitio activo se localiza completamente en la subunidad mayor, la actividad puede ser detectada sólo en el ribosoma completo. La necesidad de la subunidad menor puede entenderse como un mecanismo de seguridad que evita la unión azarosa de aminoacil-ARNt por la subunidad mayor solamente.

Uno de los problemas aún no resueltos de la síntesis de proteínas es la explicación de cómo es posible que 2 ARNt ligados a codones contiguos puedan localizar sus brazos aceptores lo suficientemente cerca uno de otro para permitir la formación del enlace peptídico, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de los aminoacil-ARNt.

### Translocación

El ciclo de elongación se completa con la translocación, en la cual el ribosoma avanza 3 nucleótidos a lo largo del ARNm. Al formarse el enlace peptídico el ribosoma

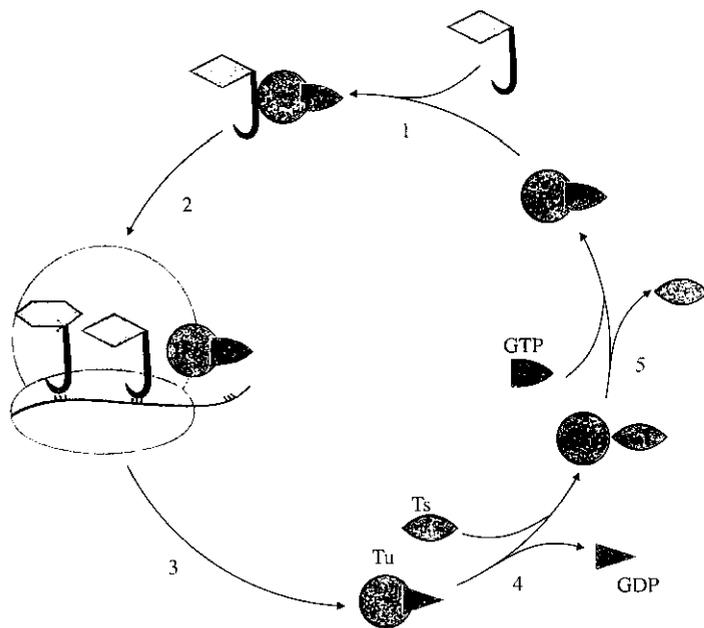


Fig. 30.7. Ciclo del factor de elongación T.  
 1. El FE-Tu (en azul) unido al GTP (en rojo) y reacciona con el aminoacil-ARNt. 2. El complejo formado se incorpora al ribosoma. 3. El GTP es hidrolizado a GDP y complejo Tu|GDP abandona el ribosoma. 4. En ese momento interviene el FE-Ts que se une al FE-Tu desplazando al GDP. 5. Con posterioridad el GTP desplaza al FE-Ts, con lo cual el factor queda en condiciones para recomenzar el ciclo.

portamiento pudiera ser la estructura del brazo aceptor del ARNt, el cual delante del ACCA-aminoacil contiene un C:A no apareado en vez del par presente en todos los demás ARNt. Otro hecho sería la presencia del grupo amino bloqueado, pues se ha comprobado que el bloqueo del grupo amino en otros aminoacil-ARNt impide su unión con el complejo FE-Tu:GTP.

Estudios con GDPCP han demostrado que la hidrólisis del GTP ocurre con posterioridad a la incorporación del complejo aminoacil-ARNt | FE-Tu | GTP al ribosoma pero, previa a la formación del enlace peptídico, se produce la hidrólisis de un GTP por cada aminoacil-ARNt que es incorporado.

### Formación del enlace peptídico

El enlace peptídico se forma en una reacción en la cual se transfiere el grupo unido al ARNt que ocupa el sitio P (sea un péptido o el fmet) hacia el grupo amino del aminoácido unido al ARNt que ocupa el sitio A, catalizada por una actividad de peptidiltransferasa presente en la subunidad 50 S del ribosoma. Estudios recientes indican que existe una notable participación del ARNr en esta actividad catalítica, aunque el concurso de proteínas ribosomales no ha sido descartado totalmente.

Aunque el sitio activo se localiza completamente en la subunidad mayor, la actividad puede ser detectada sólo en el ribosoma completo. La necesidad de la subunidad menor puede entenderse como un mecanismo de seguridad que evita la unión azarosa de aminoacil-ARNt por la subunidad mayor solamente.

Uno de los problemas aún no resueltos de la síntesis de proteínas es la explicación de cómo es posible que 2 ARNt ligados a codones contiguos puedan localizar sus brazos aceptores lo suficientemente cerca uno de otro para permitir la formación del enlace peptídico, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de los aminoacil-ARNt.

### Translocación

El ciclo de elongación se completa con la translocación, en la cual el ribosoma avanza 3 nucleótidos a lo largo del ARNm. Al formarse el enlace peptídico el ribosoma

porta un ARNt descargado en el sitio P y un peptidil-ARNt en el sitio A. Como parte de un mismo mecanismo, en la translocación se expulsa el ARNt del sitio P y simultáneamente el peptidil-ARNt se mueve del sitio A hacia el sitio P. El ribosoma entonces presenta un sitio A no ocupado, que permitirá la entrada del siguiente aminoacil-ARNt. En esta fase interviene el EF-G (la G alude a que liga nucleótidos de guanina) que constituye una de las principales proteínas de la célula con un peso molecular de 72 kD y representa el 2 % de las proteínas celulares, lo que hace que se encuentre en cantidad aproximadamente igual al número de ribosomas.

Como en los casos anteriores, se debe formar un complejo EF-G-GTP que garantiza la conformación adecuada para la unión al ribosoma y después la hidrólisis del GTP no sólo proporciona la energía necesaria para el movimiento, además cambia la conformación de la proteína permitiéndole abandonar el ribosoma.

Los ribosomas no pueden unirse simultáneamente al EF-Tu, y al EF-G, por lo que la síntesis de proteínas sigue un ciclo en el cual estos factores son alternativamente unidos a, o liberados de, los ribosomas.

Este ciclo de elongación se repite tantas veces como aminoácidos sean necesario incorporar a las proteínas, por lo cual constituye el período de mayor duración de todo el proceso.

## Terminación

La terminación de la síntesis de proteínas implica un fenómeno poco frecuente, pues se trata de la interacción de un codón directamente con una proteína.

Se han caracterizado 3 proteínas que intervienen en la terminación y se denominan factores de liberación FL. El FL-1 reconoce los codones UAA y UAG, en tanto FL-2, los UGA y UAA y requiere que el peptidil-ARNt se encuentre en el sitio P. Parece ser que los factores de liberación realizan su acción en el sitio A, ya que algunos ARNt mutantes capaces de reconocer codones de terminación compiten con ellos por entrar al ribosoma. El FL-3 estimula la acción de los 2 restantes.

La actividad de los factores de liberación implica la separación de la cadena polipeptídica neoformada y al desensamblaje de todo el aparato biosintetizador (Fig. 30.8).

## Traducción en eucariontes

La traducción en eucariontes, como ha sido estudiada en reticulocitos de conejos, sigue en líneas generales el mismo procedimiento que en los organismos procariontes. No obstante, en cada paso se destacan diferencias específicas que vienen dadas principalmente por 3 factores fundamentales:

1. Los ribosomas eucariontes son más grandes y complejos que los procariontes.
2. Los ARNm de eucariontes son casi siempre monocistrónicos, codifican para una sola cadena polipeptídica.
3. En el proceso interviene un número mucho mayor de proteínas no ribosomales.

Estos elementos hacen necesario detenerse en cada etapa para resaltar las principales diferencias, ya que no se cuenta aún con datos completos como en el caso de los procariontes.

La iniciación es la etapa que presenta mayores diferencias. Se han descrito más de 15 proteínas no ribosomales que participan en la iniciación. Para significar su origen eucarionte se escribe la letra "e" delante del símbolo del factor.

En la formación del *pool* de subunidades de 40 S intervienen el eIF-3 que se une a ella y el eIF-6 que se une a la de 60 S, y tienen en ambos casos un efecto antiasociante. El eIF-2:GTP forma un complejo ternario con el met-ARNt<sub>i</sub> (los eucariontes no utilizan formilmetionina) que después se incorpora al ribosoma antes de la entrada del ARNm, por lo cual su ubicación no depende de una interacción codon-anticodon. El eIF-3 participa

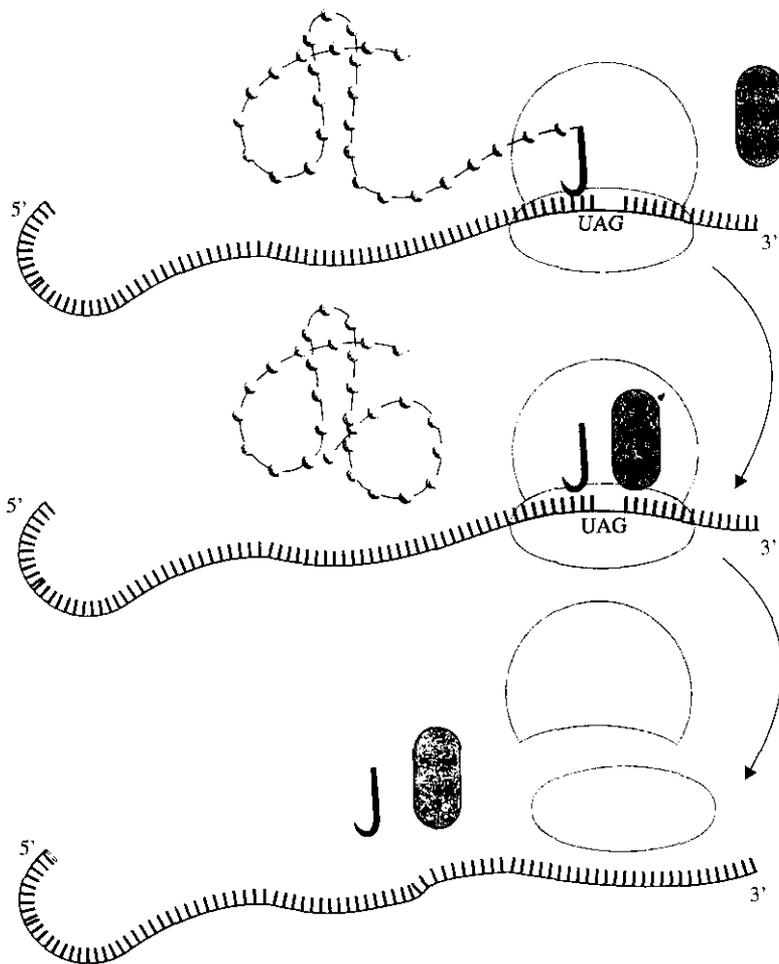


Fig. 30.8. Terminación. Al aparecer en el sitio A el codon de terminación, el factor de liberación interacciona directamente con el ARNm y determina no sólo la separación de la proteína neoformada, sino además, la desorganización de todo el sistema sintetizador.

en la incorporación del ARNm después que ha sido ubicado el met-ARN<sub>t</sub>, por un mecanismo diferente a como ocurre en procariontes. El ARNm se une al ribosoma por su extremo 5' donde existe la estructura del casquete al cual previamente se ha unido una proteína específica. La subunidad 40 S se mueve entonces a lo largo del ARNm, utilizando la energía de hidrólisis del ATP hasta encontrar el primer codon de iniciación que siempre es el AUG. El eFI-3 contribuye a esta unión al desestabilizar la estructura secundaria del ARNm que impide su unión al ribosoma. Cuando se produce la unión del codon de iniciación con el anticodon del met-ARN<sub>t</sub>, el ribosoma deja de moverse y entonces por la acción del eFI-5 se produce la incorporación de la subunidad 60 S impulsada por la hidrólisis del GTP.

Los eFI-2, eFI-3 y eFI-5 son imprescindibles para la formación del complejo de iniciación de 80 S, los demás factores conocidos, eFI-1, eFI-4A, eFI-4B, eFI-4C, eFI-4D y eFI-4F interactuando con los primeros mejoran grandemente la eficiencia del proceso. Los factores Co-eFI-2A, Co-eFI-2B y Co-eFI-2C controlan la formación del complejo ternario eFI-2 | GTP | met-ARN<sub>t</sub>.

Mención especial merece el eFI-2, éste ha sido purificado a partir de múltiples organismos y en diferentes laboratorios, presenta un peso molecular de alrededor de 145 kD; se trata de una proteína polimérica formada por 3 subunidades diferentes, la  $\alpha$  con peso de 35 a 38 kD; la  $\beta$ , de 52 a 56 kD, y la  $\gamma$ , de 48 a 52 kD. La subunidad  $\alpha$  liga GTP con baja afinidad, pero GDP con afinidad muy elevada y puede ser fosforilada por una proteína quinasa independiente de AMPc que es estimulada por la deficiencia de grupos hemo en el reticulocito, los ARN de doble hebra y el interferón, con lo cual se inactiva el factor y se inhibe la iniciación. La  $\beta$  puede ser fosforilada por la caseína quinasa II pero esta modificación no altera su funcionamiento. La  $\gamma$  no es fosforilada por ninguna de las quinasas anteriores y es la que se une al met-ARN<sub>t</sub>.

Como la afinidad del eFI-2 es mayor para el GDP (que favorece la conformación inactiva) que para el GTP (que favorece la activa), es necesaria la participación de otra proteína denominada eFI-2A para realizar el intercambio GDP/GTP, pero su mecanismo es desconocido.

Las fases de la elongación son iguales a las descritas para los procariontes. La incorporación de los aminoacil-ARNt se lleva a cabo con la formación previa de un complejo ternario aminoacil-ARNt:GTP:eFE-1 $\alpha$  que, al posicionarse en el ribosoma, provoca la hidrólisis del GTP y libera el complejo binario eFE-1 $\alpha$ :GDP que se activa con la participación del eFE-1 $\beta$ ; estos 2 factores, además de eFE-1 $\gamma$  de función desconocida, suelen agruparse formando un complejo de elevado peso molecular que se ha denominado eFE-1.

La incorporación del aminoacil-ARNt va seguida de la formación del enlace peptídico. La translocación se produce por la participación de eFE-2 una proteína de 100 kD que unida al GTP se asocia al ribosoma y provoca su desplazamiento. Es interesante que este factor sea modificado por la toxina diftérica que transfiere el grupo ADP-ribosa del NAD<sup>+</sup> a un resto de histidina modificado de la proteína, con lo cual se producen su inactivación y la inhibición de la elongación. Se ha descrito la existencia de un eFE-3, que es una proteína de 125 kD con actividades de GTPasa y ATPasa que son imprescindibles para la elongación, pero su función específica no se ha determinado.

En eucariontes existe una sola proteína que actúa como factor de liberación (eFL) que está compuesta por 2 subunidades idénticas de 55 kD. Para unirse al sitio A donde aparece el codón de terminación forma un complejo con el GTP, cuya hidrólisis parece ser el último evento de la terminación, necesario para la disociación de todo el sistema sintetizador de proteínas.

## Postterminación

La cadena polipeptídica formada en el ribosoma suele experimentar modificaciones que pueden producirse simultánea a su formación (modificaciones cotraduccionales), o una vez que ha sido liberada del ribosoma (modificaciones postraduccionales), que dan lugar a la forma definitiva y funcional de la proteína.

En los procariontes el grupo formilo de la formilmetionina es eliminado antes de terminar la traducción por la acción de una desformilasa específica, y en ocasiones, tanto en procariontes como en eucariontes, enzimas del tipo de las aminopeptidasas catalizan la separación de varios aminoácidos a partir del extremo N terminal. La eliminación de los aminoácidos parece estar influida por los aminoácidos que ocupan las posiciones siguientes: la metionina permanecerá como primer aminoácido, si el aminoácido que ocupa el segundo lugar es arginina, asparagina, ácido aspártico glutámico, isoleucina o lisina; mientras que será separada si los aminoácidos que ocupan el segundo lugar las alanina, glicina, prolina, treonina o valina. Frecuentemente el grupo aminoterminal así formado es acetilado por acción de transacetilasas.

Algunas cadenas laterales de los aminoácidos son modificadas, por ejemplo, durante la síntesis del colágeno se produce la hidroxilación de los restos de prolina y de lisina; también son esterificados grupos fosfatos a restos de serina, tirosina y triptófano de numerosas proteínas.

Los grupos prostéticos son añadidos a las proteínas como el hemo de la hemoglobina y como los cofactores que se unen de forma covalente a la enzima como la biotina, el FAD, etcétera.

Un evento postraduccionales importante es la formación de los puentes disulfuro entre 2 cisteínas que contribuyen a la estructura tridimensional de muchas proteínas.

La cadena proteínica puede ser hidrolizada en diferentes puntos como sucede con los zimógenos del tubo digestivo, como el pepsinógeno, el tripsinógeno, etcétera, que parecen ser formas de almacenamiento de la enzima y que sólo alcanzan su estado funcional en el momento de su acción.

La proinsulina es hidrolizada con la liberación de un segmento polipeptídico denominado péptido C que se encuentra en el centro de la molécula, haciendo que la forma funcional de la hormona esté formada por 2 cadenas polipeptídicas, cuando se ha sintetizado como una cadena polipeptídica única. En la hipófisis se forma una proteína que es procesada mediante proteólisis parcial específica y que puede dar lugar a varias hormonas de acuerdo con la posición de los enlaces peptídicos que son hidrolizados.

El ensamblaje de las proteínas formadas por subunidades también se produce después de la traducción. Este ensamblaje parece ser más sencillo en procariontes, donde en muchos casos todas las subunidades de una proteína multimérica se forman a partir de un solo ARNm policistrónico y, por lo tanto, se traducen de manera simultánea; en los eucariontes cada subunidad se forma a partir de ARNm diferentes.

## Distribución de proteínas

En los organismos eucariontes tiene una significación especial el proceso de distribución de las proteínas. Todas las proteínas se forman en los ribosomas pero deben realizar sus funciones en diferentes compartimentos celulares y, en ocasiones deben ser llevadas hacia el exterior de las células. Las proteínas que permanecen en el citosol, así como las destinadas a las mitocondrias, los peroxisomas y el núcleo son sintetizadas por ribosomas libres; las destinadas a otros compartimentos o hacia el exterior se sintetizan en ribosomas unidos a las membranas del retículo endoplasmático. A manera de ilustración se describirá el tránsito de proteínas a través de los sistemas membranosos de la célula, entre otras cosas por ser el mejor conocido.

Las proteínas que deben ser procesadas en el retículo endoplasmático se forman en un estado de preproteína, pues contienen hacia su extremo N terminal un pequeño péptido de 22 a 30 aminoácidos denominados péptido señal. Cuando este péptido ha sido traducido es reconocido por un complejo nucleoproteínico conocido como partícula de reconocimiento de la señal que está formada por un ARN de aproximadamente 300 nucleótidos y 6 proteínas de diferentes tamaños. Esta partícula actúa también sobre el ribosoma, bloquea la traducción y posteriormente transporta los ribosomas hacia las membranas del retículo, transfiriéndolos a una proteína receptora que es parte integral de la membrana. La unión del ribosoma a su receptor recluta hacia esa zona a un grupo de proteínas que se organizan en forma de canal denominado aparato translocador, y hacia el cual es transferido el ribosoma. La unión del ribosoma al aparato translocador se realiza de forma que el dominio de secreción queda en contacto con la luz del canal, y al continuar la síntesis de la proteína ésta es descargada hacia la luz del retículo (Fig. 30.9).

Formando parte del aparato translocador se han identificado al menos 4 proteínas, todas ellas con actividad enzimática. La peptidasa señal separa el péptido señal del resto de la cadena polipeptídica, en tanto la peptidasa hidrolasa produce la degradación hidrolítica del péptido señal hasta sus aminoácidos constituyentes. Las 2 enzimas restantes actúan sobre la cadena polipeptídica en crecimiento. La oligosacaril transferasa cataliza la transferencia de oligosacáridos hacia residuos específicos de serina o asparagina, en tanto, la tiol disulfuro isomerasa cataliza la formación de los enlaces disulfuros y contribuye a la formación de la estructura tridimensional de las proteínas.

Las proteínas que pasan a la luz del retículo contienen pequeñas secuencias aminoacídicas que indican su destino. La presencia hacia el extremo C terminal de la secuencia KDEL determina que la proteína permanezca en el retículo, en tanto la señal KxKx ó KKxx u otras con 2 lisinas dirigen las proteínas hacia el aparato de Golgi. La presencia de manosa-6-P en el extremo de los oligosacáridos orienta las proteínas hacia los ribosomas. Se cree que existe otra señal para las proteínas que forman gránulo-

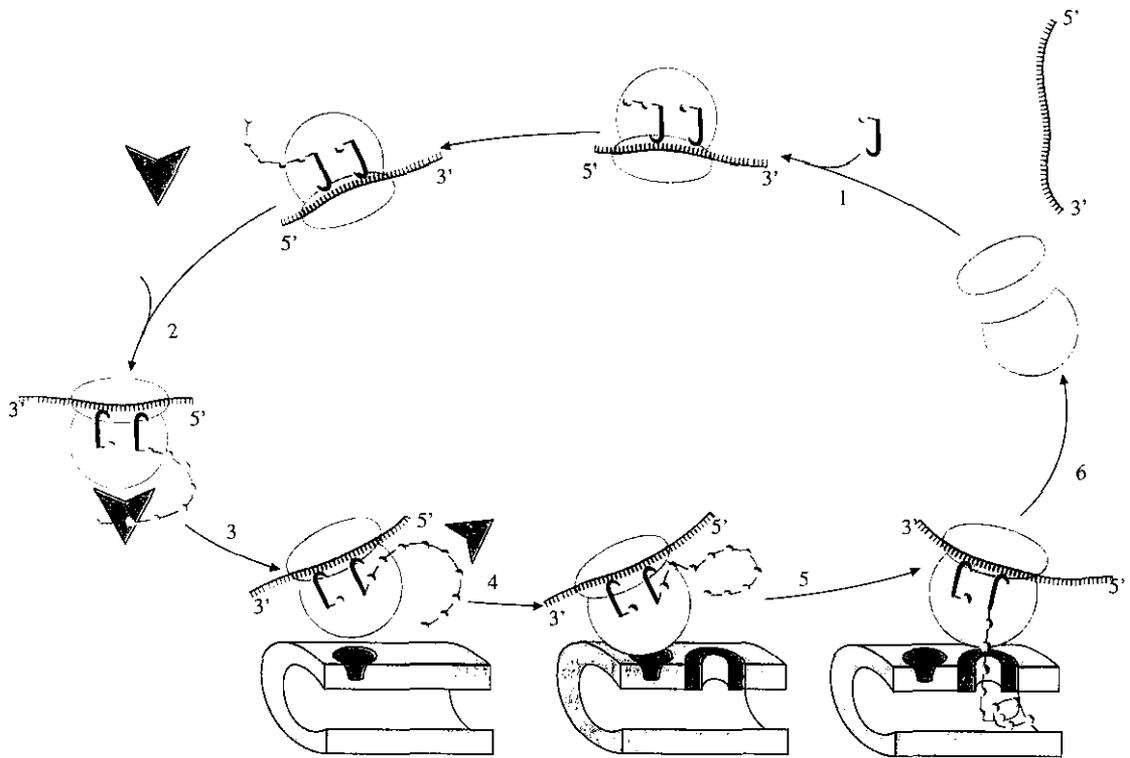


Fig. 30.9. Síntesis de las proteínas de secreción. 1. Formación del complejo de iniciación y comienzo de la elongación. 2. Al aparecer el péptido señal éste es reconocido por la partícula de reconocimiento que detiene la síntesis de proteínas. 3. Los ribosomas son llevados a una proteína receptora que se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático. 6. La unión del ribosoma a su receptor provoca el reclutamiento hacia ese sitio de un grupo de proteínas que forman un canal a través de la membrana. 7. La proteína es translocada por el canal hacia la luz del retículo y la síntesis continúa. 8. Una vez terminada la síntesis el ribosoma se separa del canal que se desarma y el ciclo comienza de nuevo.

los de secreción, pero no ha sido identificada. Estos gránulos de secreción se acumulan por debajo de la membrana plasmática y son segregados hacia el exterior cuando la célula recibe un estímulo específico. De igual manera se supone la existencia de señales que determinan la ubicación de proteínas en la membrana plasmática, en la cual parece ser determinante un residuo de tirosina. Si ninguna de estas señales está presente, entonces la proteína es segregada en forma constitutiva, lo cual significa que la ausencia de señal es también una señal.

Aunque en los últimos años se ha progresado notablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso de distribución de las proteínas, falta mucho por conocer para tener una imagen precisa de este proceso.

### Consideraciones energéticas

El proceso que se acaba de describir representa un gasto energético considerable para la célula que sólo puede justificarse por el elevado valor que tiene el producto que se obtiene, las proteínas. Aunque se ha señalado que la hidrólisis del GTP tiene fundamentalmente una función reguladora, es cierto que la energía se libera y, por lo tanto, constituye un gasto para la célula, que pudiera cuantificarse si se tiene en cuenta lo que ocurre en cada una de las etapas.

En los eventos previos a la iniciación tiene lugar la activación de los aminoácidos, reacción en la cual se libera AMP por lo que representa un gasto energético equivalente a 2 ATP por cada aminoácido que es activado. En la iniciación un GTP es hidrolizado cuando el formil metionil-ARNt se incorpora al sitio P. Durante la elongación se requiere un GTP para la incorporación de cada aminoacil-ARNt y otro más para la translocación. Como esta etapa tiene carácter repetitivo, representa el mayor gasto; también en la terminación se consume un GTP.

Para tener una idea real del gasto que el proceso representa se tomará como ejemplo la síntesis de la  $\alpha$ -globina que como se sabe tiene 141 aminoácidos. La activación de esos aminoácidos representa un gasto total de 282 ATP. La iniciación y la terminación consumen un GTP cada una. En la elongación harían falta 2 GTP por cada aminoácido, por lo tanto el total sería otra vez de 282 ATP. En total serían 566 moléculas de ATP por cada molécula de la  $\alpha$ -globina.

## Inhibidores de la traducción

Debido a las diferencias entre los componentes del sistema traduccional en procariontes y eucariontes, los inhibidores del proceso en un tipo de organismo, suelen no serlo en el otro, aunque existen excepciones.

Los principales inhibidores de la traducción son antibióticos que no sólo han tenido valor en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sino también en el esclarecimiento de muchos de los aspectos de mecanismos de la traducción.

La puromicina permitió comprobar la existencia de los 2 sitios funcionales del ribosoma. Este antibiótico actúa como un análogo del aminoacil-ARNt (Fig. 30.10), pero no del fmet-ARNt, lo cual demostró que uno y otro se ubican en sitios diferentes. La adición de puromicina a un sistema de síntesis de proteínas provoca la terminación prematura de la cadena, originando pequeños péptidos de diferentes tamaños.

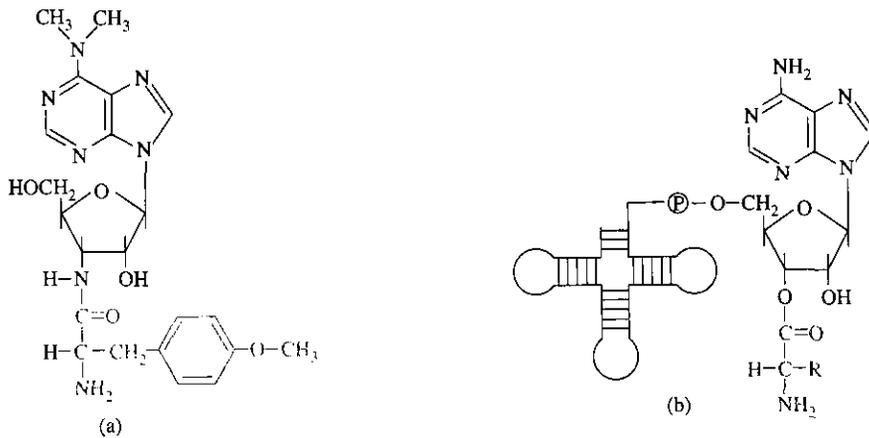


Fig. 30.10. Mecanismo de acción de la puromicina. Existe una gran similitud estructural entre la puromicina y el aminoacil-ARNt, por lo que el antibiótico se une al sitio A del ribosoma e impide la entrada del ARNt cargado, provocando la terminación abortiva de la síntesis de la proteína.

La estreptomina se une a la proteína S12 e impide la incorporación del ARNt<sub>i</sub> cargado o causa errores de lectura del código, si el proceso está en fase de elongación.

El cloranfenicol inhibe la peptidil transferasa. La eritromicina se une a la subunidad 50 S e impide su reasociación con el complejo de iniciación de 30 S, pero no tiene efecto sobre la elongación (Fig. 30.11).

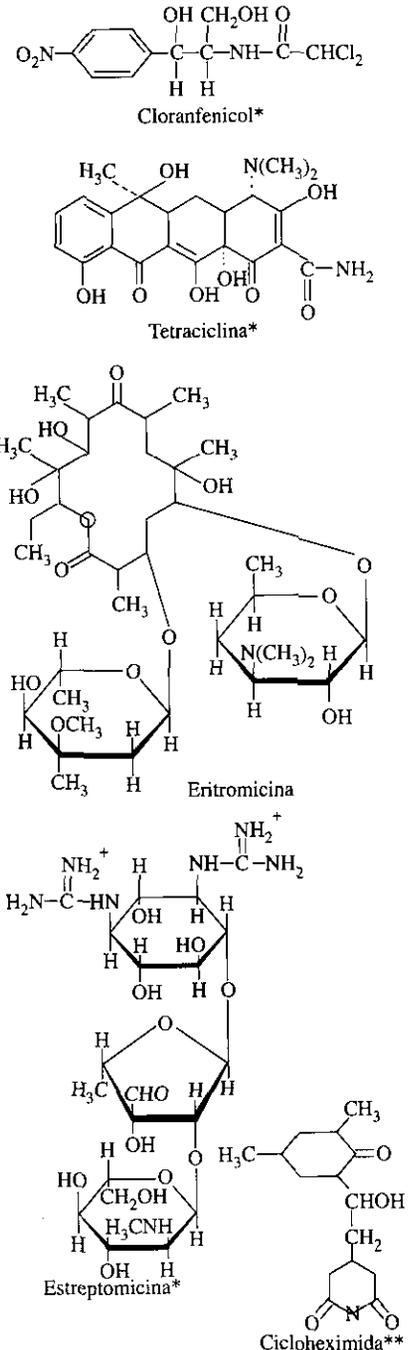


Fig. 30.11. Inhibidores de la traducción. Los principales inhibidores de la traducción son antibióticos, algunos de ellos sólo tienen acción sobre organismos procariontes (\*), otros solamente sobre eucariontes (\*\*), y muy pocos sobre ambos.

## Resumen

La traducción constituye la etapa crucial del proceso general de expresión de la información genética, pues en ella se producen las proteínas cuyas funciones específicas determinan un organismo.

Este proceso tiene lugar en los ribosomas y se produce unidireccionalmente del extremo N-terminal al C-terminal colineal a la lectura del ARNm. Tiene carácter gradual y repetitivo y está acoplada a la hidrólisis de NTP; para su realización se requieren más de 200 macromoléculas específicas. Para su incorporación a las proteínas los aminoácidos deben ser activados, lo cual se logra con su unión a los ARNt específicos por enzimas denominadas aminoacil-ARNt-sintetasa.

La iniciación consiste en la formación del complejo de iniciación de 70 S, para lo cual es necesario la separación de las subunidades de los ribosomas y la unión específica a la menor del ARNm y del fmet-ARNt. En esta etapa son necesarias 3 proteínas específicas llamadas factores de iniciación, también se requiere la energía de hidrólisis del GTP.

La elongación consiste en la incorporación uno a uno de los aminoacil-ARNt determinados por los codones que aparecen sucesivamente en el ARNm y para lo cual se requieren de los factores de elongación y de la hidrólisis del GTP.

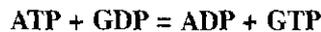
Durante la terminación algunas proteínas específicas conocidas como factores de liberación interactúan con el codon de terminación y no sólo determinan el final de la síntesis, sino también el desensamblaje del sistema biosintético. En muchas ocasiones las proteínas son modificadas durante o con posterioridad a la traducción hasta ser totalmente funcionales.

La traducción en eucariontes es similar en líneas generales a como ocurre en procariontes, pero existen diferencias sobre todo en el número mayor de proteínas no ribosomales que el proceso requiere.

Existen numerosos antibióticos cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir alguna de las fases de la traducción, pero estos antibióticos han contribuido considerablemente al conocimiento del proceso.

## Ejercicios

1. Demuestre que en el proceso de la traducción se cumplen los siguientes principios:
  - a) De los cambios graduales.
  - b) De acoplamiento.
  - c) De interrelación.
  - d) De transferencia de información.
2. ¿Por qué en los experimentos de *Nirenberg* y otros (capítulo 28) se podían utilizar, como ARNm, polinucleótidos que no contenían el codon AUG para la iniciación?
3. ¿Qué significado tiene en cuanto a la fidelidad de copia de la traducción las propiedades de las enzimas aminoacil-ARNt-sintetasa?
4. La enzima nucleósido-difosfato-quinasa cataliza la reacción:



¿por qué cree usted que la inhibición de esta enzima provoca una inhibición de la traducción?