Ekaia, 2023, 43, 101-116
https://doi.org/10.1387/ekaia.23624

ekaia
ZIENTZIA eta TEKNOLOGIA ALDIZKARIA

ISSN 0214-9001 – eISSN 2444-3255

Proteinen tolestura tunel erribosomikoan

(Protein folding within the ribosomal tunnel)

Sara M-Alicante[a, 1,2], *Arantza Muguruza-Montero*[a, 1,3], *Oscar R. Ballesteros*[2], *Ane Metola*[4], *Janire Urrutia*[5], *Alvaro Villarroel*[1], *Eider Nuñez*[1,2,*]

[1] Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC), 48940, Leioa. Bizkaia.
[2] Fisika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU-Leioa, Bizkaia)
[3] Biokimika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU-Leioa, Bizkaia)
[4] Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University (SE-106 91 Stockholm, Sweden)
[5] Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU-Leioa, Bizkaia)
[a] Egile hauek ekarpen berdina egin dute lan honetan

LABURPENA: Proteinak polimero lineal gisa sintetizatzen dira eta beren jatorrizko egitura tridimentsionalean tolestu behar dira zelulan hainbat funtzio betetzeko. Proteinen tolespena ulertzea funtsezkoa da, tolespen okerrak hainbat gaixotasun neurodegeneratiboren jatorria direlako. Proteinen tolespena modu koitzultzailean has daiteke, hau da, sortzen ari den peptidoa erribosomari lotuta dagoenean oraindik. Izan ere, zelularen proteinen heren bat baino gehiago erribosomaren tunelaren espazio mugatuan tolesten direla frogatu da, hau da, erribosomaren gainazalarekiko interakzioek modulatuta eta erribosoma-tunelaren beraren mugen pean. Gero eta ebidentzia gehiagok iradokitzen dute erribosomak funtsezko zeregina duela proteinen tolespenean. Erribosomak proteina trinkotzea erraztu dezake, soluzioan ikusten ez diren bitartekoak sortzea eragin dezake edo tolestearen hasiera atzeratu dezake. Hala ere, proteinen koitzulpenezko tolesdura aztertzeak zailtasun handiak ditu, batik bat, egungo teknikek dituzten mugengatik. Hori dela eta, proteinen tolesteari buruzko ikerketa gehienak soluzioan dauden proteinetan oinarritzen dira, proteina tolestuz eta destolestuz egiten direnak, prozesu horretan erribosomak duen rola kontuan hartu gabe. Artikulu honetan, azken urteotan proteinen koitzulpenezko tolestura ikertzeko garatu diren tekniken laburpena egin da.

HITZ GAKOAK: koitzulpenezko tolestura, tunel erribosomikoa, atzipen peptidoa, fluoreszentzia, erresonantzia magnetiko nuklearra, indar mikroskopia, dinamika molekularra.

ABSTRACT: *Proteins are synthesised as linear polymers and must fold into their native three-dimensional structure to perform various functions in the cell. Understanding protein folding is crucial because protein misfolding is at the origin of several neurodegenerative diseases. Protein folding can start co-translationally, i.e. when the emerging peptide is still associated with the ribosome. Indeed, it has been shown that more than one third of the cell's proteins fold in the limited space of the ribosome tunnel. Increasing evidence suggests that the ribosome plays a critical role in protein folding. The ribosome can facilitate protein compaction, cause the creation of non-visible media in solution or delay the onset of folding. However, the study of co-translational folding presents serious difficulties, mainly due to the limitations of the different current techniques. Hence, most studies on protein folding are based on proteins in solution, which are carried out by unfolding and refolding the protein, without taking into account the role of the ribosome in this process. In this article, we summarised the techniques developed in recent years for the study of co-translational protein folding.*

KEYWORDS: cotranslational folding, ribosome tunnel, Arrested peptide, Fluorescence, Nuclear Magnetic Resonance, Force Microscopy, Molecular Dynamics.

**** Harremanetan jartzeko / Corresponding author:*** Eider Nuñez. Biofisika Institutua. Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). – eider.nunez@ehu.eus – https://orcid.org/0000-0001-8075-9815

Nola aipatu / How to cite: M-Alicante, Sara; Muguruza-Montero, Arantza; Ballesteros, Oscar R.; Metola, Ane; Urrutia, Janire; Villarroel, Alvaro; Nuñez, Eider (2023). «Proteinen tolestura tunel erribosomikoan». *Ekaia*, 43, 2023, 101-116. (https://doi.org/10.1387/ekaia.23624).

Jasotze-data: 2022, maiatzak 11; Onartze-data: 2022, uztailak 19.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2023 UPV/EHU

Lan hau *Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-LanEratorririkGabe 4.0 Nazioartekoa* lizentzia baten mende dago

1. **SARRERA**

Giza zelula batean 100.000 proteina ezberdin baino gehiago daude, bakoitza bere egitura eta funtzio espezifikoekin. Zelulan dituzten funtzioak egiteko, proteinak egitura tridimentsionaletan tolestu behar dira. Proteinak zuzen tolestea funtsezkoa da funtzio zelularrerako; izan ere, proteinen tolesdura okerrak, funtzioaren galeraz edo aldaketaz gain, proteomaren desoreka dakar eta baita proteinak degradatzearen energia-kostuak handitzea ere. Proteinen tolesdura okerra alzheimerraren, parkinsonaren eta beste gaixotasun neurodegeneratibo batzuen jatorria da, eta minbiziarekin eta zahartzearekin ere erlazionatu da [1].

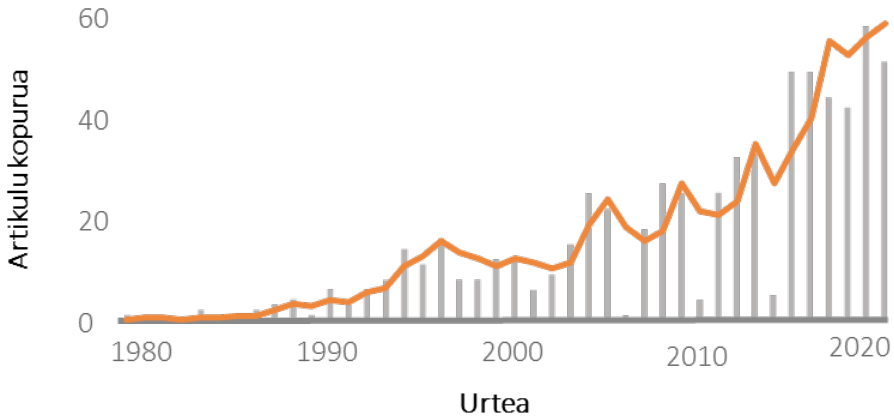
1960ko hamarkadan Christian Anfinsenek lehen aldiz frogatu zuen proteina baten aminoazidoen sekuentzian jasotako informazioa nahikoa zela bere egitura tridimentsionalean tolesteko. Izan ere, 1969an Cyrus Levinthalek adierazi zuen proteinak ezin direla ausaz tolestu; proteina batek ausaz konfigurazio egokia lortzeko, unibertsoaren adina baino denbora luzeagoa beharko luke [2]. Hala ere, badakigu proteinak berez tolesten direla milisegundo edo mikrosegundotan, eta horrek agerian uzten du proteinen tolesduran berezko arauak daudela.

Urte batzuk geroago, proteinen sintesia erribosometan gertatzen dela frogatu zen. Kate jaioberria sintetizatu ahala, erribosomaren tuneletik igarotzen da eta zitosolaren aldean agertzen da, non tolespena gertatzen den. Urte askotan zehar, erribosomaren tunela peptido jaioberriarentzat konduktu pasibo bat besterik ez zela pentsatu zen; hala ere, ikerketa askok erakutsi dute proteinen tolesturan rol aktiboa duela. Tunel erribosomikoaren barruan 37 aminoazido inguruko kate polipeptidikoa sar daiteke, eta sortzen ari den peptidoa erribosomaren tunelean tolesten has daiteke, are gehiago, hirugarren mailako egiturak ere sor daitezke bertan, erribosoma-tunelaren espazio mugatuak baldintzatuta [3]. Beraz, proteinen tolestura erribosoman sintesia gertatzen den heinean ematen da eta prozesu honi koitzulpeneko tolestura deritzo [4].

Prozesu hori enigmatiko samarra da; izan ere, erribosomaren tunelaren barruan gertatzen denak ihes egiten dio egungo teknikek landu dezaketenari. Alde batetik funtsezko sinplifikazioak sartu behar dira ikerketa konputazionalean. Metodo konputazionaletan berriki egindako aurrerapenek, AlphaFold kasu, adimen artifizialaren bidez proteinen egitura ebaztea lortu badute ere, ez dira iristen toleste-prozesua deskribatzeraino [5, 6]. Beraz, arrazoi teknikoak direla eta, argitaratutako ia ikerketa guztiek erribosomatik kanpo gertatzen den tolestura izan dute ardatz. Bestalde, kriomikroskopia, erresonantzia magnetiko nuklearra (EMN), X izpien kristalografia eta fluoreszentzian oinarritutako teknikek ematen duten informazio estrukturala garrantzi handikoa bada ere, ez da nahikoa prozesuaren dinamika zeluletan gertatzen den bezala ulertzeko. Proteinen sintesian zehar kate jaio-

berria oso malgua da, eta horrek lausotu egiten ditu teknika horien bidez lortzen diren seinaleak [4, 7].

Beraz, lehen egitura proteikoak ebatzi zirenetik egiturazko biologian oinarritutako teknikak izugarri garatu badira ere, koitzulpenezko tolesturak arlo ezezaguna izaten jarraitzen du [8]. Hala ere, 1. irudian ikusten den bezala, koitzulpenezko tolesturarekiko interesak gora egin du azken urteotan. Hori, hein handi batean, azken urteetan gaiari heltzeko teknika esperimentalak eta konputazionalak garatu direlako gertatu da, eta horiek komunitate zientifikoaren interesa pizten lagundu dute. Artikulu honek koitzulpenezko tolestura ikertzeko teknika horien laburpena egiten du.



1. irudia. Urteetan zehar koitzulpenezko tolesturarekin zer ikusia duten artikuluen kopurua. Datuak PubMed-etik lortu dira (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/).

2. TUNEL ERRIBOSOMIKOAREN EZAUGARRIAK

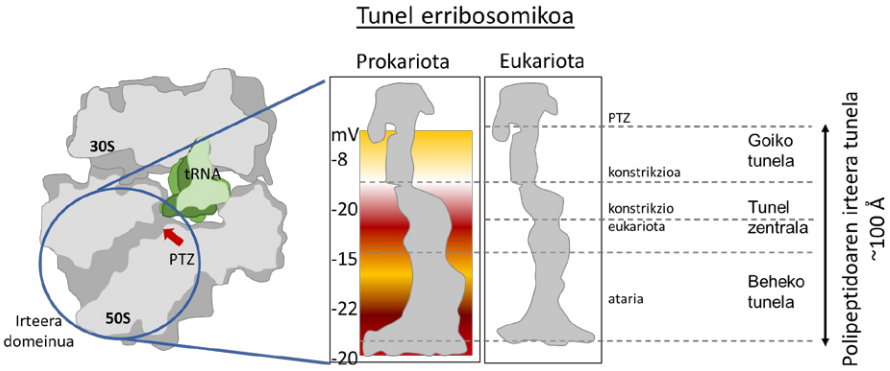
Erribosomak dira RNA mezulariaren (RNAm) itzulpenaren, hots, bizi-forma guztien azpian dagoen funtsezko prozesuaren eragileak. RNAren nukleotidoak deskodetzeaz gain, erribosomek itzulpenaren dinamika eta beste itzulpen-prozesu zentral batzuk erregulatzen dituzte, hala nola zelula-mintzetara translokatzea eta proteinak tolestea.

80S erribosoma eukariotoa 70S erribosoma prokariotoarekin alderatuta masan eta luzeran handiagoa bada ere, bakterioen tunel erribosomikoa handiagoa da, bai luzeran, bai diametro ertainean (2. irudia). Erribosoma bakoitza bi azpiunitatek osatzen dute, bat handiagoa (50S zelula prokariotoetan eta 60S zelula eukariotoetan) eta bestea txikiagoa (30S zelula prokariotoetan eta 40S zelula eukariotoetan) (2. irudia). Bi azpiunitateak RNAk eta proteinek osatzen dituzte, eta azpiunitate bateko proteinen eta beste az-

piunitateko RNAren arteko interakzioek bi azpiunitateak bata bestearekin lotzen dituzte [9].

Proteinen sintesiaren funtsezko urrats kimikoa peptidiloak transferitzeko zentroan (PTZ) gertatzen da, han elkarrekin lotzen baitira kate jaioberriaren aminoazidoak lotura peptidikoen bidez (2. irudia). Kate jaioberria, erribosoma utzi aurretik, PTZ-tik erribosomaren gainazaleraino luzatzen den erribosomaren tunela izeneko egitura batetik igarotzen da lehenik. Tunelean destolesturiko ~37 aminoazido sar daitezkeenez, bere geometriak eta propietate biofisikoek eragina izan dezakete itzulpenaren dinamikan, bai eta proteinen tolestean ere [10, 11].

Baina zer itxura du tunel erribosomikoak proteinak bertan tolestu ahal izateko? Bakterio-tunelak eta eukariotak hainbat antzekotasun dituzte; biek 100 Å inguruko luzera dute, PTZtik 20 Å-ra konstrikzio bat aurkezten dute eta tunelaren amaieran, ataria deiturikoan, tunela zabaldu egiten da, 23 Å-ko diametroa lortzeraino (1. irudia). Hala ere, bi desberdintasun garrantzitsu daude tunel erribosomiko bakterianoaren eta eukariotoaren artean. Lehenengoa eukariotoetan bigarren konstrikzio-gune baten presentzia da, ul4 proteina erribosomikoan begizta-sekuentzia zabal baten txertaketaren ondoren agertu zena. Bigarren diferentzia bakterioetan gertatu zen, uL23 begizta eL39 proteina txikiarekin ordezkatu zenean; horrek haien ataria zabalagoa izatea eragin zuen (2. irudia) [12].



2. irudia. Erribosoma eta tunel erribosomikoa. Ezkerrean, *E.coli* erribosomaren irudi eskematikoa: 30S eta 50S azpiunitateak grisez irudikatuta daude, tRNA berdez eta peptidiloak transferitzeko zentroa (PTZ) gezi gorri batekin adierazten da. Eskuinean, peptidoaren irteerako tunelaren neurriak jatorri prokariotoa eta eukariota duten erribosometan. Koloreak tunel barruko potentzial elektrostatikoa bistaratzen du. Liutkute eta al., 2020tik eraldatuta [13].

Esan bezala, proteinek 3. mailako egitura sinpleak har dezakete tunelaren barruan; adibidez, ikusi da zink-hatzamar domeinuak krio-EM bidez

tunel erribosomikoaren barnean tolesten direla [3]. Bigarren mailako egituren inguruan askotan egiaztatu da tunel erribosomikoaren barnean alfa helize bat primeran egokitu daitekeela. Beta laminaz osaturiko proteinen tolestura, ordea, gutxiago ulertzen da. Hainbat ikerketak iradokitzen dute beta estrukturak jaiotzen ari den polipeptidoa erribosomaren tuneletik irtetean tolesten direla, proteina bera erribosomatik askatu baino lehen [14-18]. Bestalde, beta estruktura txikiak, hala nola beta urkilak, erribosomaren tunelaren barruan tolestu daitezke [19, 20]. Esan bezala, erribosomaren tunelean gertatzen diren tolestura goiztiarrak garrantzizkoak dira, proteinaren amaierako konformaziora heltzeko bidezidor efizientea ezartzen diolako sortzen ari den kateari [21]. Hala ere, koitzulpenezko tolesturaren bidezidor zehatza proteina gutxi batzuentzat soilik ezagutzen da.

Erribosomaren barrualdean gertatzen den tolestura-bidezidorrak ikertzea erronka bat da, teknikoki zailtasun handiak dituelako. Hala ere, hainbat teknika garatu dira era zuzen eta ez-zuzenean jaiotzen ari den polipeptidoaren trinkotze-maila tunelean neurtzeko.

3. **METODOAK**

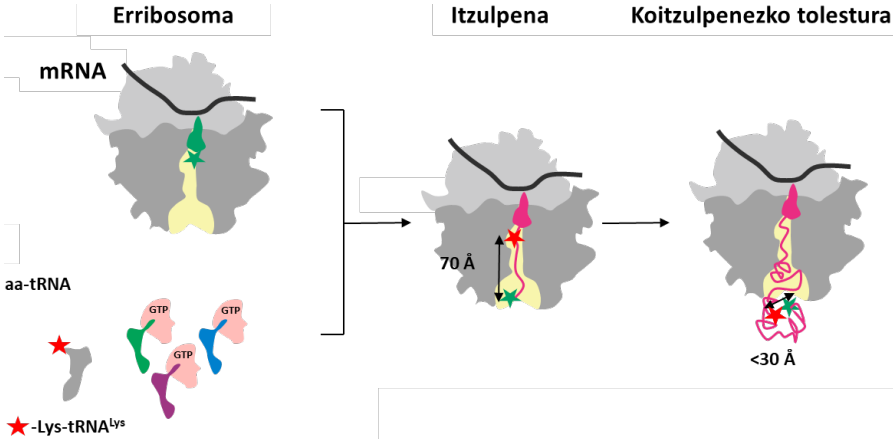
3.1. **Fluoreszentzian oinarritutako teknikak**

Lehenengo teknika Föster erresonantziaren energia-transferentzian (*Föster Resonance Energy Transfer*, FRET) oinarritzen da. Energia-transferentzia hori bi fluorofororen artean gertatzen da baldin eta fluoroforo emailearen emisio-espektroa eta fluoroforo hartzailearen kitzikapen-espektroa gainjartzen badira. Hori gertatzeko, fluoroforoek espazialki oso gertu egon behar dute. Koitzulpenezko tolesturak FRET-aren bidez *in vitro* ikertzeko, purifikatutako erribosomak erabiltzen dira, eta erreakzioari fluoroforoz markatutako transferentziazko RNAk (tRNA) gehitzen zaizkio. tRNA mRNAren osagarria den antikodon bat eta aminoazido espezifiko bat garraiatzen duen RNA molekula bat da. tRNA desberdinen aminoazidoek kate polipeptidikoa sortuko dute proteinaren sintesian. Adibidez, metionina-tRNA fluoroforo emailearekin markatu daiteke eta lisina-tRNA fluoroforo hartzailearekin. Bi aminoazidoak 30 Å baino distantzia txikiagora badaude, orduan FRET seinalea egongo da, zeina polipeptidoaren konpaktazioarekin zuzenean erlazionatuta baitago. Erribosomek sintetizatuko duten polipeptidoaren lehenengo aminoazidoa metionina izango da, proteina guztietan bezala, eta lisina mutagenesi bidez polipeptidoaren leku batean baino gehiagotan koka daiteke. Horrela, polipeptidoa sintetizatzen den heinean tunel barnean gertatzen den tolestura monitoriza daiteke [22] (3. irudia).

Bigarren teknika fotoinduzitutako elektroi-transferentzian (*Photoinduced Electron Transfer,* PET) oinarritzen da. Kasu horretan, argia igortzen

duen molekula bat jartzen zaio jaiotzen ari den polipeptidoari, eta molekula hori jaiotzen ari den proteinaren triptofano batetik oso hurbil dagoenean (Van der Walls distantziara, 2-4 Å) fluoreszentzia galduko du. Ingeniaritza genetikoaren bitartez, triptofanoaren lekua aukera daiteke, eta horrela toleste-prozesua pausoz pauso deskribatzea ahalbidetzen du. Horrela, proteinaren trinkotzearen dinamika azter daiteke, zeina mikrosegundotan eta azpi-mikrosegundotan gertatzen baita, [22].

Bi teknika horiek konbinatuz, erribosomaren tunelean gertatzen diren proteinaren tolesturen modeloak garatu dira [22, 23].



3. irudia. FRET metodoa koitzulpenezko tolestura ikertzeko. *In vitro* itzulpenerako beharrezko substantzia guztiak gehitzen dira saio-hodian (erribosomak, mRNA, aa-tRNA desberdinak, etab.) eta, horrez gain, fluoroforoekin etiketatutako bi aa-tRNA desberdin gehitzen dira. Fluoroforoak bata bestetik espazialki urrun badaude ez da FRET seinalerik egongo, baina proteinaren konpaktazioa gertatzen bada koitzulpena gertatzen den heinean, fluoroforoak bata bestera hurbilduko dira, eta, hala, handitu egingo da FRET seinalea.

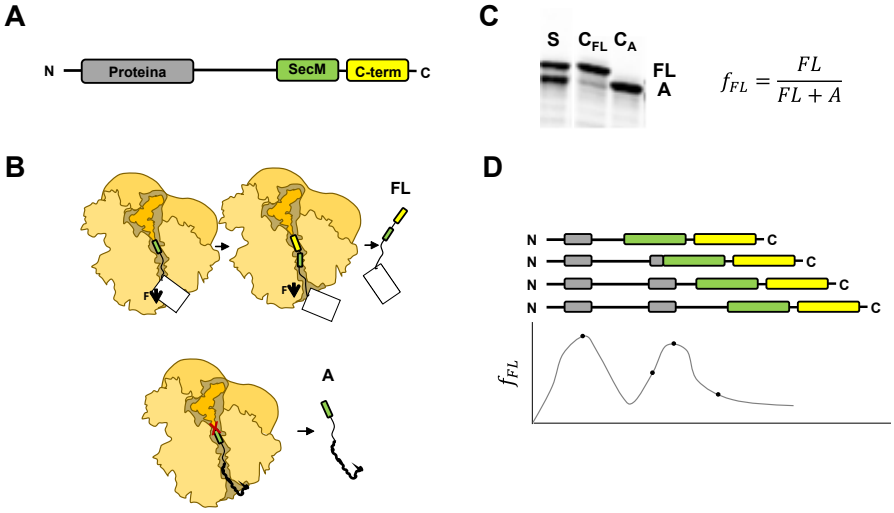
3.2. **SecM, atzipen-peptidoak**

Polipeptidoak erribosoman sintetizatzen diren heinean, tunelaren hormarekin interakzioa duten sekuentzia batzuk izan ditzakete, haien sintesia moteldu edo geldiarazteko gai direnak. Bereziki, positiboki kargatutako aminoazidotan eta prolinatan aberatsak diren sekuentziek itzulpena moteltzen dutela deskribatu da [24, 25].

Itzulpena geldiarazteko interakzio espezifikoak sortzen dituzten sekuentziak itzulpenaren atzipen-peptidoak dira [26]. Peptido labur horiek (7-20 aminoazido inguru) proteina prokariotoetan zein eukariotoetan aur-

kitu dira. Zelula prokariotoetan atzipen-peptidoek geneen adierazpena erregulatzen dute; inguruan gertatzen diren baldintzen arabera, itzulpena geraraz dezakete edo aurrerago kokatuta dauden geneen itzulpena aktibatu. Atzipen-peptido ezagunetariko bat bakterioetan aurkitzen den SecM peptidoa da. Peptido hori itzultzen den heinean, kate polipeptidikoan koitzulpenezko tolesturak eragindako tentsioa dagoen igartzen du, hau da, indar-sentsore moduan jarduten du. Beraz, erribosomak atzipen-peptidoaren azken kodonean gelditzen dira blokeatuta tentsio baxuko baldintzetan, baina itzulpenarekin jarraitzen dute atzipen-peptidotik aurrera tentsioa handia denean; esaterako, kate jaioberria egitura tridimentsionalean tolestu denean (4.B irudia) [3]. Behaketa horretatik abiatuta, SecM atzipen-peptidoa proteina ezberdinak kodetzen dituzten DNA-sekuentzietan sar daiteke indarsentsore transplantagarri gisa, eta kate jaioberrian jarduten duten indarrak zehaztasun handiz mapeatzeko erabili (4.A irudia). Koitzulpenezko tolestura aztertzeko, lehenik eta behin, atzipen-peptidoa proteinaren luzera desberdinetan kokatua duten DNA-sekuentziak prestatzen dira. Jarraian, sekuentzia bakoitza *E. coli*-n edo *in vitro* itzulpen-sistema batean adierazten da, eta [^{35}S] -metionina erradioaktiboarekin markatzen da. Segituan, sintetizatutako proteina bakoitzaren tamaina eta kantitatea zehazteko, laginak immunoprezipitatu eta SDS-PAGE elektroforesiaren bidez analizatzen dira (4.C irudia). Immunoprezipitazioaren bidez ikertu nahi den proteina antigorputz espezifiko baten bidez prezipitatzen da. Prezipitatu horretan dauden proteinak SDS-PAGE sistema elektroforetikoaren bidez banatzen dira beren pisu molekularren arabera. Proteina-luzera bakoitzarentzat atzitutako kate laburraren eta guztiz itzuli den kate luzearen proportzioa zenbatesten da, eta balio guztiak katearen luzeerarekiko irudikatzen dira; hala lortzen da indar-profila deritzona (4.D irudia).

Sintetizatutako proteinaren luzera aztertzeko erradioaktibitatea erabili ordez, fluoreszentzia ere erabil daiteke, prozedura esperimentalaren ziurtasuna bermatuz. Horretarako, eraikitzen diren cDNA-sekuentzietan fluoroforoak sintetizatzeko informazioa ere gehitzen da N eta C terminaletan. Adibidez, urdin eta hori koloreko fluoroforoak jartzen badira N eta C-terminaletan, hurrenez hurren, laginaren fluoreszentzia neurtuz moztutako proteina eta luzera osoko proteina kantitateak kuantifika daitezke [27].



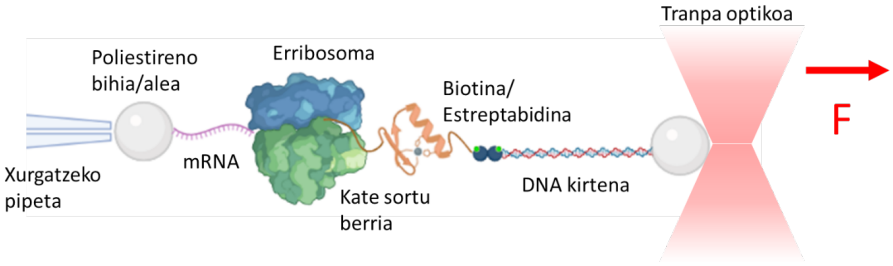
4. irudia. Atzipen-peptidoak kate jaioberrian jarduten duten indarrak mapeatzeko erabil daitezke. (A) DNA-sekuentziaren diseinua. Ikertu nahi den proteina SecM atzipen-peptidoarekin fusionatzen da, lokailu batekin bereiziz, eta SecM-aren ondoren edozein proteinatako sekuentzia bat jartzen zaio C terminalean. (B) Atzipen-peptidoaren funtzionamenduaren irudikapen eskematikoa. Goian, ikertu nahi den proteinak indarra sortuko du (F, force), eta beraz, SecM-aren ondoren erribosomak sintetizatzen jarraituko du eta luzera osoko proteina sortuko du, jarri den C terminalari esker (FL, *full length*, proteina osoa). Behean, ikertu nahi den proteinak ez badu indarrik sortzen, sintesia SecM-an geldituko da, eta proteina laburragoa ekoiztuko da (A, arrested, moztutako proteina). (C) [^{35}S]-metionina erradioaktiboarekin markatutako proteinak SDS-PAGE elektroforesi gel batean. Lagina, S, luzera osoko proteinaren kontrola, C_{FL} eta atzitutako proteinaren kontrola, C_A, ageri dira. Eskuinean, luzera osoko proteinaren eta atzitutako proteinaren arteko ratioa kalkulatzeko formula ageri da. (D) Proteina baten indar-profilaren (f_{FL}) adibidea.

3.3. **Molekula bakarreko indar-espektroskopia**

Molekula bakarreko indar-espektroskopia (MBIE) proteinen koitzulpenezko tolestura aztertzeko tresna indartsua da [28]. MBIE esperimentuetan, egiturazko aldaketak indar kontrolatuen pean dauden molekuletan monitorizatzen dira, pintza optikoak, pintza magnetikoak eta/edo indar atomikoko mikroskopia erabiliz [28]. Teknika hau duela gutxi erabili da erribosomei lotutako kate jaioberrien toleste-trantsizioak monitorizatzeko [29]. Aplikazio horretarako, sortzen ari den katearen eta erribosomaren artean indarra aplikatzen da, eta pintza optikoak erabiliz monitorizatzen da [28] (5. irudia). Indarrak tokian-tokian eragiten duenez, erribosomari lotutako poli-

peptidoen egonkortasuna selektiboki asalda daiteke, erribosomaren egiturazko osotasuna aldatu gabe [28]. Esperimentu mota horrek frogatu zuen erribosomak, RNAm-ak deskodetzeaz gain, sortzen diren kateen *de novo* tolestura eraginkorra ere aktiboki sustatzen duela [29,30]. Adibidez, MBIE erabiliz, Kaiser *et al*.k [30] frogatu zuten T4 lisozimazko polipeptido trunkatuak gaizki tolesten eta agregatzen direla soluzioan daudenean, baina ondo tolesten direla *in vitro* itzulpen-sistema bat erabiltzen denean, hau da, erribosoma bati lotuta daudenean.

Tinoco Jr. eta Bustamantek ere teknika hori erabili zuten sortzen ari den domeinu proteiko globular baten tolesturak trakzio-indar bat sor dezakeela erakusteko. Indar horrek SecM atzipen-peptidoak baino indar handiagoa duenez, peptidoa askatuko du eta itzulpena berraktibatuko da [31]. Lan horretan egileek proposatu zuten jaiotzen ari den katean zehar dagoen trakzio-indarra atzeraelikatzeko mekanismo garrantzitsua izan zitekeela hazten ari diren kate jaioberrien elongazioa eta tolestea doitzeko [31]. Pintza optikoak aplikatu dira hainbat proteinaren koitzulpenezko tolestura behatzeko eta alderatzeko; besteak beste, GFP proteina fluoreszentearena, dihidrofolato erreduktasarena (DHFR) eta hTau40 izeneko proteina intrintsekoki desordenatuarena [32].



5. irudia. Pintza optikoekin egindako esperimentuetarako muntaia molekularraren irudi eskematikoa. Jaiotzen ari den polipeptidoari indarra aplika dakioke, tranpa optikoa pipetarekiko mugituz. Proteina poliestirenozko bihi batekin elkartzen da DNA-kirtenaren bidez, eta bi horiek proteinarekin lotzen dira lotura disulfuroen bidez. DNA-kirtenak beharrezkoak dira pintza optikoen arteko bereizketa espazial nahikoa emateko: proteina tipiko baten tamaina nanometro gutxi batzuetakoa baino ez da, eta bi bihiei proteina bakar bat zuzenean lotzea teknikoki zaila izango litzateke, edo ezinezkoa, eta bihien desplazamenduen neurketa zehatza eragotziko luke. Horretarako, DNA-kirtenen luzera osoa 500 eta milaka base pare artekoa da. Proteinak biotina du, eta proteina estreptabidinan zuzenean immobilizatzeko erabiltzen da. Beraz, toleste-energiari eta proteinaren dinamikari ez die eragiten bihien gainazalean immobilizatuta egoteak (Kaiser *et al*., 2011-tik eraldatua [21]).

3.4. **Erresonantzia magnetiko nuklearra**

Erresonantzia magnetiko nuklearra (EMN) fenomeno fisiko bat da non eremu magnetiko batean dauden nukleoek erradiazio elektromagnetikoa xurgatzen eta berregiten duten. Energia hori erresonantzia-maiztasun jakin bat da, eremu magnetikoaren indarra eta atomo isotopoen propietate magnetikoen araberakoa dena. EMN espektroskopia funtsezkoa da proteinen eta beste makromolekula biologiko batzuen egiturak eta dinamikak zehazteko. Isotopo erradiaktiboak erabiliz, proteinen jatorrizko eta ez-jatorrizko egoeren osaerak espezifikotasun handiz islatzen dira.

EMNaren espektroskopia gai da erribosomari lotutako kate jaioberriari buruz bereizmen atomikoko informazioa emateko (normalean 250 aminoazido baino gutxiagoko kateentzat, hori baita EMNaren ohiko muga) [33]. Nahiz eta EMNak kate jaioberrien tolesteari buruzko egiturazko informazio garrantzitsua emateko ahalmena izan, teknika horren aplikazioa konplikatu egiten da. besteak beste homogeneoak diren eta kontzentrazio nahikoetan (10 μM) dauden kate jaioberriak izan beharra eskatzen duelako [33]. Alde horretatik, atzipen-peptidoen erabilerari esker aurrerapen garrantzitsuak egin dira, lagin kantitate handiak eta homogeneoak lortzea baimendu duelako. Izan ere, 70S erribosomaren konplexuak pisu molekular handia badu ere (2,4 MDa), eta horrek EMN seinale handiak ematen baditu ere, erribosomari lotutako kate jaioberriek erresonantzia konparatiboki garbiak eta biziak dituzte, eta, beraz, erribosoman tolesten ari diren kateei buruzko informazio estruktural zehatzak lortzen dira [33, 34].

2007an, EMN espektroskopiaren bidez eta erribosoma bati lotuta, jaiotzen ari zen kate baten lehen egitura zehaztu zen, inmunoglobulinarena (Ig2) hain zuzen [35]. Horretarako, proteina $^{13}C/^{15}N$-arekin markatu zen. Markatutako kateak *E. coli*-ren itzulpen libreko sistema batean sintetizatu ziren, ARNm batetik abiatuta [35]. Ikerketa horrek frogatu zuen kalitate nabarmeneko EMN espektroak lor daitezkeela erribosomari lotutako kate polipeptidiko jaioberri batentzat; halaber, Ig2-aren C-terminala erribosomaren barruan bere egitura tridimentsionalera tolesten dela aurkitu zuten [35].

EMN bidez luzera desberdinetako kate jaioberriak aztertzean, hau da, atzipen-peptidoa proteinaren hainbat puntutan zehar kokatzean, proteinaren koitzulpenezko tolesturaren argazki-sekuentzia bat lortzen da [36]. Urte batzuk geroago, biraketa-angelu magikoa (Magical Angle Spinning, MAS) eta polarizazio nuklear dinamikoa (Dyna*mic Nuclear Polarization*, DNP) garatzean, erribosomaren tunelaren barruan A oxidorreduktasa disulfuroaren (DsbA) seinale-sekuentziaren egitura aztertu ahal izan zen [37].

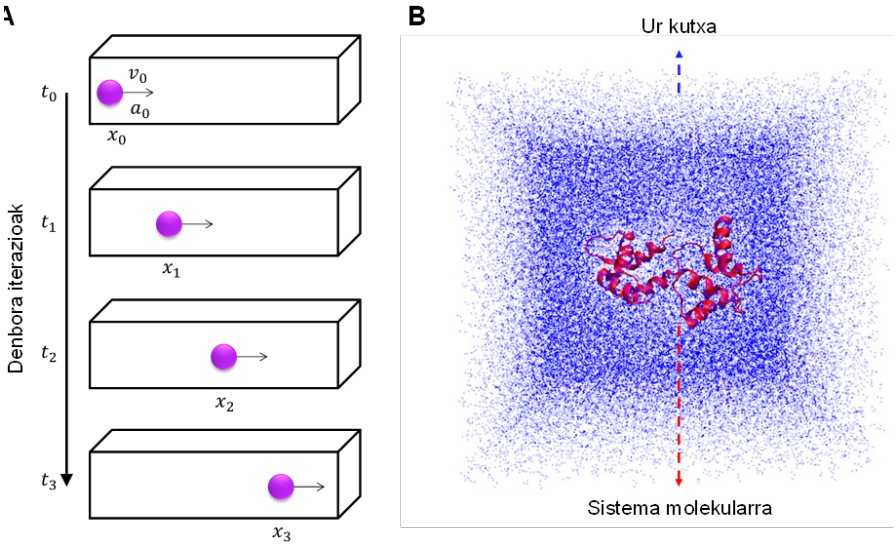
3.5. **Biologia konputazionala**

Koitzulpenezko tolesturari ikuspegi konputazionaletik ere heldu zaio [38]. Koitzulpenezko tolesturak duen izaera dinamikoa kontuan hartuta, hurbilketa konputazionalak nagusiki dinamika molekularreko simulazioetan oinarritzen dira. Dinamika molekularreko simulazioetan ikertu nahi den sistema molekularra ur-kutxa batean sartzen da konputazionalki. Programa informatikoak, Newtonen ekuazioen bidez, zenbait denbora-iterazio desberdinetan atomo bakoitzaren posizio berriak kalkulatzen ditu inguruko atomoek eragiten dituzten interakzioen arabera [39] (6. irudia). Koitzulpenezko tolestura simulatzeko, ur-kutxan erribosoma osoa eta sortzen ari den kate berria sartu behar dira. Atomo horien guztien posizio berriak eta, are gehiago, toleste-gertaerak behatzeko behar den denbora kalkulatzeak kostu konputazional handia du (segundotik minutura). Kontuan hartuta simulazio mota horretan iterazio-denbora estandarra femtosegundo batekoa (10^{-15} s) edo bikoa dela, eta sistema osatzen duten atomoak milioika inguru direla, dinamika molekular estandarrarekiko beste hurbilketa batzuk egin behar dira nahitaez.

Sinplifikazio mota bat eredu atomikoaren bereizmena mantentzean oinarritzen da, hau da, sistema molekularreko atomo guztiak mantentzea (*all-atoms* ereduak), baina tunelaren irteeran jaiotzen ari den kate peptidikoaren egituraren luzera mantenduz; beraz, proteinaren sintesia ez da simulatuko. Horrek zera adierazten du: egitura horiek tunelaren barruan sar daitezkeen kasu batzuetan egitura tertziarioak ere sor daitezkeela, nahiz eta termodinamikoki ezegonkorrak izan [40].

Beste estrategia bat atomoen arteko interakzioak kalkulatzeko erabilitako eredua sinplifikatzea da, hainbat atomo interakzio-gune batean taldekatuz (*coarse grain* ereduak). Oro har, aminoazido bakoitzeko atomoak kalkulu-talde batean elkartzen dira; horrela, iterazio bakoitzeko, ordenagailuak kalkulu gutxiago egin beharko ditu [41]. *Coarse grain* ereduak pauso bat harago eramanez, interakzio-gune bakoitzean hiru aminoazido elkartuz [42], tolestura-koitzultzailea aztertu da mintzeko proteina batzuetan, eta emaitza esperimentalak erreproduzitzeko gai ere izan dira [43, 44].

GO ereduak erabiltzea beste sinplifikazio estrategia bat da. Haietan, erribosomatik jaiotzen ari den katea proteina horren amaierako egiturara heltzera behartzen da. Egitura horrek esperimentalki ebatzita egon behar du eta *Protein Data Bank*-etik atera daiteke. Sinplifikazio horretan, jatorrizko egituran kontaktuan dauden aminoazidoen arteko interakzio erakargarriak soilik hartzen dira kontuan [45]. Estrategia horiek erabiliz, interakzioen konplexutasuna izugarri murrizten da, eta koitzulpenezko tolestea modu arinagoan iker daiteke. Izan ere, beste proteina batzuek toleste-prozesuan dituzten efektuak aztertzeko aukera ematen du. Horrela, txaperonak (proteinen tolestean parte hartzen duten proteinak) toleste-abiadura moteltzearen erantzuleak direla erakutsi zen [46].



6. irudia. Dinamika molekularreko simulazioak. (A) Denbora-iterazioen aurkezpen eskematikoa. Borobil moreak atomo bat aurkezten du; hasieran, posizio, abiadura eta azelerazio jakin bat izango du (x_0, v_0 eta a_0, hurrenez hurren). Horiek kontuan hartuta, Newtoen legeak aplikatuz, denbora-iterazio desberdinetarako (t) atomoak edukiko dituen posizio berriak (x) kalkulatuko ditu ordenagailuak. (B) Dinamika molekularreko sistema baten eredua. Ur-kutxa eta sistema molekular bat, kasu honetan proteina bat, urdinez eta gorriz aurkezten dira, hurrenez hurren. VMDrekin eginda.

4. ETORKIZUNEKO ERRONKAK

Azken urteetan egindako lanek informazio berria eman dute sortzen ari diren proteinen koitzulpenezko tolesturaren mekanismoari eta garrantziari buruz. Ondorio nagusia da proteina askoren tolestea erribosomak gidatzen duela eta sortzen ari den peptidoaren propietate intrintsekoek baldintzatzen dutela, hala nola tolestura motak, tamaina, egonkortasun termodinamikoa eta gainazaleko karga. Koitzulpenezko tolestura gidatzen duten arau fisikokimikoak ulertzea etorkizuneko erronketako bat da proteinen tolestura nola gertatzen den ulertzeko. Gainera, proteinen tolesteari buruz gaur egun ditugun ezagutzak nagusiki domeinu bakarreko proteina txikiei buruzko ikerketetatik datoz, proteina multidomeinuetatik baino gehiago, azken horiek zelularen proteina gehienak diren arren. Egitura topologiko konplexuak eta domeinuen arteko interakzio posibleak direla eta, proteina multidomeinu askoren tolesturak zinetika konplexua izan ohi du, eta horiek aztertzea ez dago gaur egun eskura.

Bestalde, proteinen sintesia energetikoki garestia den prozesua denez, itzulpen-zinetikaren eta koitzulpenezko tolesturaren arteko interakzio optimoak proteinen ekoizpen eraginkorra berma dezake. Adibidez, iradoki da, koitzulpenezko tolesturak proteinaren itzulpen-abiadurari eragiten diola, baina horri buruzko proba esperimentalak urriak dira. Aitzitik, gero eta froga gehiagok iradokitzen dute erribosomak proteina berrien euskarri gisa jarduten duela. Hala ere, ez dago argi nola eragiten duten txaperonek eta/edo proteinen biogenesi-faktoreek kate jaioberriaren toleste-ibilbidean. Baliteke hori izatea etorkizuneko gai nagusietako bat datozen urteetan. Bestalde, etorkizuneko azterketek lagunduko dute modu zehatzagoan definitzen tamaina eta forma jakin bateko domeinu proteiko batek tuneleko zein tokitan tolesten den. Arlo horretan aurrerapen handiak egin diren arren, oraindik galdera asko daude erantzuteko. Oro har, gai horiei heltzeko, teknika esperimentalak eta eredu konputazionalak gehiago berritu eta hobetu behar dira.

ESKER ONAK

Artikulu hau UPV/EHUk finantzatutako eta Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Sailak emandako dirulaguntzari esker egin da.

BIBLIOGRAFIA

[1] Hartl, F. U. 2017. «Protein Misfolding Diseases», DOI: 10.1146/annurev-biochem.

[2] C. Levinthal. 1969. «How to Fold Graciously». *Spectroscopy in Biological Systems Proceedings*, **67**, 22-26.

[3] Nilsson, O. B., Hedman, R., Marino, J., Wickles, S., Bischoff, L., Johansson, M., Müller-Lucks, A., Trovato, F., Puglisi, J.D., O'Brien, E.P., Beckmann, R., von Heijne, G. 2015. «Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel». *Cell Reports*, **12**, 1533-1540.

[4] Komar, A.A. 2018. «Unraveling co-translational protein folding: Concepts and methods». *Methods*, **137**, 71-81.

[5] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D. 2021. «Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold». *Nature*, **596**, 583-589.

[6] Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zídek, A., Green,

T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S. 2022. «AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models». *Nucleic Acids Research*, **50**, D439-D444.

[7] Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. 2009. «Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo». *Nature Structural and Molecular Biology*, **16**, 574-581.

[8] Stollar, E.J., Smith, D.P. 2020. «Uncovering protein structure». *Essays in Biochemistry*, **64**, 649-680.

[9] Wittmann, H. G. 1983. «Architecture of prokaryotic ribosomes». *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 35-65.

[10] Picking, W.D., Picking, W.L., Odom, O.W., Hardesty, B. 1992. «Fluorescence characterization of the environment encountered by nascent polyalanine and polyserine as they exit Escherichia coli ribosomes during translation». *Biochemistry*, **31**, 2368-2375.

[11] Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.A., Moore, P.B. 2006. «The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel». *Journal of Molecular Biology*, **360**, 893-906.

[12] Dao Duc, K., Batra, S.S., Bhattacharya, N., Cate, J.H.D., Song, Y.S. 2019. «Differences in the path to exit the ribosome across the three domains of life». *Nucleic Acids Research*, **47**, 4198-4210.

[13] Liutkute, M., Samatova, E., Rodnina, M.V. 2020. «Cotranslational Folding of Proteins on the Ribosome». *Biomolecules*, **10**, 97.

[14] Evans, M.S., Sander, I.M., Clark, P.L. 2008. «Cotranslational Folding Promotes β-Helix Formation and Avoids Aggregation In Vivo». *Journal of Molecular Biology*, **383**, 683-692.

[15] Eichmann, C., Preissler, S., Riek, R., Deuerling, E. 2010. «Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 9111-9116.

[16] Kelkar, D.A., Khushoo, A., Yang, Z., Skach, W. R. 2012. «Kinetic Analysis of Ribosome-bound Fluorescent Proteins Reveals an Early, Stable, Cotranslational Folding Intermediate». *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 2568-2578.

[17] Buhr, F., Jha, S., Thommen, M., Mittelstaet, J., Kutz, F., Schwalbe, H., Rodnina, M.V., Komar, A.A. 2016. «Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations». *Molecular Cell*, **61**, 341-351.

[18] Guinn, E.J., Tian, P., Shin, M., Best, R.B., Marqusee, S. 2018. «A small single-domain protein folds through the same pathway on and off the ribosome». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 12206-12211.

[19] Kosolapov, A., Deutsch, C. 2009. «Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel». *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**, 405-411.
[20] Marino, J., Von Heijne, G., Beckmann, R. 2016. «Small protein domains fold inside the ribosome exit tunnel». *FEBS Letters*, **590**, 655-660.
[21] Kaiser, C.M., Goldman, D.H., Chodera, J.D., Tinoco, I., Bustamante, C. 2011. «The Ribosome Modulates Nascent Protein Folding». *Science*, **334**, 1723-1727.
[22] Holtkamp, W., Kokic, G., Jager, M., Mittelstaet, J., Komar, A.A., Rodnina, M.V. 2015. «Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time». *Science*, **350**, 1104-1107.
[23] Mercier, E., Rodnina, M.V. 2018. «Co-Translational Folding Trajectory of the HemK Helical Domain». *Biochemistry*, **57**, 3460-3464.
[24] Charneski, C.A., Hurst, L.D. 2013. «Positively Charged Residues Are the Major Determinants of Ribosomal Velocity». *PLoS Biology*, **11**, e1001508.
[25] Pavlov, M.Y., Watts, R.E., Tan, Z., Cornish, V.W., Ehrenberg, M., Forster, A.C. 2009. «Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 50-54.
[26] Ito, K., Chiba, S. 2013. «Arrest Peptides: Cis-Acting Modulators of Translation». *Annual Review of Biochemistry*, **82**, 171-202.
[27] Janire Urrutia, Alejandra Aguado, Carolina Gomis-Perez, Arantza Muguruza-Montero, Oscar R. Ballesteros, Jiaren Zhang, Eider Nuñez, Covadonga Malo, Hee Jung Chung, Aritz Leonardo, Aitor Bergara. 2020. «An Epilepsy-Causing Mutation Leads to Co-Translational Misfolding». *bioRxiv*.
[28] Schönfelder, J., De Sancho, D., Perez-Jimenez, R. 2016. «The Power of Force: Insights into the Protein Folding Process Using Single-Molecule Force Spectroscopy». *Journal of Molecular Biology*, **428**, 4245-4257.
[29] Liu, K., Rehfus, J.E., Mattson, E., Kaiser, C. M. 2017. «The ribosome destabilizes native and non-native structures in a nascent multidomain protein». *Protein Science*, **26**, 1439-1451.
[30] Kaiser, C.M., Tinoco, I. 2014. «Probing the Mechanisms of Translation with Force». *Chemical Reviews*, **114**, 3266-3280.
[31] Goldman, D.H., Kaiser, C.M., Milin, A., Righini, M., Tinoco, I., Bustamante, C. 2015. «Mechanical force releases nascent chain–mediated ribosome arrest in vitro and in vivo». *Science*, **348**, 457-460.
[32] Wruck, F., Katranidis, A., Nierhaus, K.H., Büldt, G., Hegner, M. 2017. «Translation and folding of single proteins in real time». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, DOI: 10.1073/pnas.1617873114.
[33] Waudby, C.A., Launay, H., Cabrita, L.D., Christodoulou, J. 2013. «Protein folding on the ribosome studied using NMR spectroscopy». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **74**, 57-75.
[34] Cabrita, L.D., Hsu, S.-T.D., Launay, H., Dobson, C.M., Christodoulou, J. 2009. «Probing ribosome-nascent chain complexes produced in vivo by

NMR spectroscopy». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 22239-22244.

[35] Hsu, S.-T.D., Fucini, P., Cabrita, L.D., Launay, H., Dobson, C.M., Christodoulou, J. 2007. «Structure and dynamics of a ribosome-bound nascent chain by NMR spectroscopy». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 16516-16521.

[36] Cabrita, L.D., Cassaignau, A.M.E., Launay, H.M.M., Waudby, C.A., Wlodarski, T., Camilloni, C., Karyadi, M.-E., Robertson, A.L., Wang, X., Wentink, A.S., Goodsell, L.S., Woolhead, C.A., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Christodoulou, J. 2016. «A structural ensemble of a ribosome–nascent chain complex during cotranslational protein folding». *Nature Structural & Molecular Biology*, **23**, 278-285.

[37] Lange, S., Franks, W.T., Rajagopalan, N., Döring, K., Geiger, M.A., Linden, A., van Rossum, B.-J., Kramer, G., Bukau, B., Oschkinat, H. 2016. «Structural analysis of a signal peptide inside the ribosome tunnel by DNP MAS NMR». *Science Advances*, **2**, DOI: 10.1126/sciadv.1600379.

[38] Trovato, F., O'Brien, E.P. 2016. «Insights into Cotranslational Nascent Protein Behavior from Computer Simulations». *Annual Review of Biophysics*, **45**, 345-369.

[39] Hollingsworth, S.A., Dror, R.O. 2018. «Molecular Dynamics Simulation for All». *Neuron*, **99**, 1129-1143.

[40] O'Brien, E.P., Hsu, S.-T.D., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. 2010. «Transient Tertiary Structure Formation within the Ribosome Exit Port». *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 16928-16937.

[41] Baaden, M., Marrink, S. J. 2013. «Coarse-grain modelling of protein–protein interactions». *Current Opinion in Structural Biology*, **23**, 878-886.

[42] Niesen, M.J.M., Wang, C.Y., Van Lehn, R.C., Miller, T.F. 2017. «Structurally detailed coarse-grained model for Sec-facilitated co-translational protein translocation and membrane integration». *PLOS Computational Biology*, **13**, e1005427.

[43] Nicolaus, F., Metola, A., Mermans, D., Liljenström, A., Krč, A., Abdullahi, S.M., Zimmer, M., Miller III, T.F., von Heijne, G. 2021. «Residue-by-residue analysis of cotranslational membrane protein integration in vivo». *eLife*, **10**, DOI: 10.7554/eLife.64302.

[44] Niesen, M.J.M., Müller-Lucks, A., Hedman, R., von Heijne, G., Miller, T.F. 2018. «Forces on Nascent Polypeptides during Membrane Insertion and Translocation via the Sec Translocon». *Biophysical Journal*, **115**, 1885-1894.

[45] Takada, S. 2012. «Coarse-grained molecular simulations of large biomolecules». *Current Opinion in Structural Biology*, **22**, 130-137.

[46] O'Brien, E.P., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. 2012. «Trigger Factor Slows Co-translational Folding through Kinetic Trapping while Sterically Protecting the Nascent Chain from Aberrant Cytosolic Interactions». *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 10920-10932.