

Actividad ATP hidrolasa asociada a ribosomas humanos como nuevo indicador para evaluar fármacos *in vitro*.

Eduardo Bandeira, Ana C. Ferreras, Denys Bacilio, Gabriel Galvis, Héctor Parada, Edmundo Cayama, Juana L. Triana, Francisco Triana Alonso.



RESUMEN

En todos los ribosomas de mamíferos estudiados hasta el presente se ha identificado una actividad ATP hidrolasa (ATPasa) asociada. Su papel en el mecanismo de síntesis de proteínas está siendo estudiado actualmente y existen evidencias de homología funcional con el factor de elongación 3 (EF3) de hongos. Para caracterizar la actividad ATPasa ribosomal humana, se aislaron ribosomas 80S de placenta humana y se estudiaron los parámetros cinéticos de dicha actividad. La velocidad de hidrólisis ($0,50 \pm 0,05$ nmol Pi/A₂₆₀80S/min) a concentración fisiológica de ATP (3 mmol/L) y la constante de catálisis aparente ($0,5 \pm 0,1$ s⁻¹) están en el rango reportado para otros ribosomas eucarióticos. Los valores aparentes de V_{max} (0,65 nmol Pi/A₂₆₀80S/min) y K_M (58 μmol/L), determinados por análisis de Lineweaver-Burk, también son comparables a los reportados para ribosomas de otros mamíferos. El análisis de Eadie-Hofstee indicó la presencia de cooperatividad positiva, con un K_M aparente de 15 μmol/L para la forma más activa de la enzima. La ATPasa fue inhibida por metavanadato (inhibidor de EF3), y por los antibióticos emetina (inhibidor de la translocación) y anisomicina (actúa sobre los sitios ribosomales A y E). Además, la actividad no fue afectada por antibióticos específicos para otras funciones ribosomales en eucariotes ni tampoco por bloqueadores del ribosoma bacteriano. La sencillez y bajo costo del ensayo de actividad ATPasa ribosomal lo hacen ideal para el diseño de pruebas de alto rendimiento *in vitro* que harían posible tomar decisiones tempranas sobre el posible uso terapéutico en humanos de nuevos antibióticos o fungicidas.

Palabras clave: ATPasa, Ribosomas, Traducción *in vitro*, placenta humana, antibióticos.

ABSTRACT

Human ribosome-associated ATPase activity as a new indicator for *in vitro* Evaluation of drugs

A ribosome-associated ATPase activity has been identified in all mammal systems studied so far. The function of this activity is currently been studied and there is evidence of a relationship with the activity of the elongation factor 3 (EF3) in fungi. In order to characterize the human ribosomal ATPase, 80S ribosomes were isolated from human placenta and the kinetics parameters of the activity were studied. At physiological concentration of ATP (3 mmol/L), both the speed of reaction ($0,50 \pm 0,05$ nmol Pi/A₂₆₀80S/min) and the apparent k_{cat} ($0,5 \pm 0,1$ seg⁻¹) were in the range reported for other eukaryotic ribosomes. After Lineweaver-Burk analysis, the apparent values of V_{max} (0,65 nmolPi/A₂₆₀80S/min) and K_M (58 μmol/L), were also comparable to reported values for mammalian ribosomes. An Eadie-Hofstee analysis indicated the presence of positive cooperativity and an apparent K_M of 15 μmol/L for the most active form of the enzyme. The ATPase was inhibited by metavanadate (EF3 inhibitor), and by the antibiotics emetine (translocation inhibitor) and anysomicine (which affects ribosomal sites A and E). Furthermore, the activity was not affected by specific antibiotics for other ribosomal functions in eukaryotes or by specific antibiotics for bacterial ribosomes. The simplicity and low cost of the ribosomal ATPase activity assay make it suitable for use in high throughput *in vitro* tests for new antibiotics and fungicides, allowing early decisions about the best compounds for therapeutic use in humans.

Key words: ATPase, Ribosomes, *in vitro* translation, human placenta, antibiotics.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de síntesis de proteínas en eucariotes se requiere de la energía liberada por la hidrólisis de los nucleósidos trifosfato ATP y GTP. La hidrólisis de ATP es necesaria en la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas, para la activación de aminoácidos y en el desdoblamiento de estructuras secundarias en el extremo 5' no traducible del ARN mensajero (1,2). El GTP y su hidrólisis también son necesarios en esta etapa para la correcta unión del metionil-ARNt^{Met} al complejo de iniciación. En la etapa de elongación se incrementa la dependencia de la hidrólisis de GTP, pues los factores universalmente necesarios para el proceso, EF1A (EF-Tu en bacterias) y el EF2 (EF-G en bacterias), son GTPasas altamente específicas (3, 4). La supuesta exclusividad de uso del GTP en el ciclo de elongación fue puesta a prueba con el descubrimiento de un tercer factor de elongación, el

Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC),
Facultad de Ciencias de la Salud - Sede Aragua,
Maracay, Venezuela

Final Calle Cecilio Acosta, Urb. Cantarrana,
Las Delicias, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

Correspondencia: F. Triana Alonso

E-mail: ftrianaalonso@yahoo.com

biomed@uc.edu.ve

Tel.: + 58-243-2425822 / 2425997

Fax: +58-243-2425333

Recibido: Junio 2007 **Aceptado:** Agosto 2007

EF3, en hongos superiores (5). Este factor es una ATPasa dependiente de ribosomas (6) y, al igual que EF1 y EF2, es esencial para la fase de elongación (7). Un estudio bioquímico detallado permitió establecer que el factor, en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP, es esencial para la función del sitio E durante el ciclo de elongación de polipéptidos (8,9). Un estudio ultraestructural reciente confirma estas conclusiones del estudio bioquímico sobre la importancia de EF3 y la hidrólisis de ATP en la función ribosomal (10).

En varios sistemas derivados de mamíferos también se ha descrito una actividad ATPasa asociada a los ribosomas (11-14). Aún cuando no se ha identificado un análogo del EF3 en dichos organismos, existen evidencias de un paralelismo funcional de la ATPasa ribosomal (11, 12). En ribosomas humanos también se ha demostrado la existencia de una actividad ATPasa asociada (15). Estos ribosomas son activos en un sistema de traducción *in vitro* homólogo (16) y, por tanto, constituyen un modelo ideal para caracterizar la actividad ATPasa y determinar su implicación funcional en el proceso de síntesis de proteínas.

En este trabajo se determinaron los parámetros cinéticos de la ATPasa asociada a ribosomas de placenta humana y el efecto de antibióticos que afectan al aparato traduccional sobre dicha ATPasa. Los resultados obtenidos indican que la medición de esta actividad puede ser utilizada en el diseño de ensayos de alto rendimiento ("high throughput") para determinar posibles efectos tóxicos de nuevas drogas que bloquean el aparato traduccional de microorganismos infecciosos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de ribosomas de placenta humana. Los ribosomas se aislaron a partir de placentas (procesadas previo consentimiento informado) provenientes de operaciones cesáreas practicadas a mujeres sanas, con embarazos a término. El aislamiento se efectuó a partir de polisomas libres de membranas (fracción no unida al retículo endoplásmico) obtenidos mediante técnicas de centrifugación diferencial y ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa. Los ribosomas 80S libres de membranas (80S LM) se recuperaron después de tratamiento con puomicina y ultracentrifugación (15, 16). Las preparaciones de ribosomas 80S LM utilizadas mostraron una alta competencia funcional en ensayos de síntesis de proteínas *in vitro* tal como ha sido reportado para preparaciones equivalentes (16).

Ensayos de síntesis de poli(Phe). Para analizar la funcionalidad de los ribosomas 80S LM, 12 unidades A_{260} /mL de ribosomas fueron incubados con la fracción S-100 de placenta humana (2-3 mg/mL) obtenida como se reporta previamente (16), el ARN sintético poli(U) (0,8 μ g/ μ L), ARNt^{Phe} purificado de placenta humana (0,06 unidades A_{260} por ensayo) y

[¹⁴C]Phe (16 μ mol/L; 12,5 dpm/pmol), en un volumen final de 50 μ L bajo las condiciones optimizadas previamente (16). Los antibióticos indicados se incluyeron en los ensayos a una concentración final de 0,5 mmol/L. La actividad de síntesis se expresa como la cantidad de [¹⁴C]Phe (en DPM) incorporada en polipéptidos insolubles en TCA.

Determinación de la actividad de ATPasa en ribosomas 80S LM de placenta. Muestras de ribosomas 80S LM a una concentración final de 12 unidades A_{260} /mL fueron incubadas durante 40 min a 30°C en solución de ensayo (Hepes-KOH 30 mmol/L, pH 7.5; acetato de magnesio 5 mmol/L; acetato de potasio 150 mmol/L; β -Mercaptoetanol 4 mmol/L) en presencia de diferentes concentraciones de ATP (según el caso). Algunos experimentos se realizaron incorporando en el ensayo inhibidores de la actividad ATPasa (metavanadato de amonio o ouabaina) o de los antibióticos indicados. La actividad de ATPasa se determinó siguiendo la cinética de hidrólisis de ATP. Para ello se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción, correspondientes a 0,6 unidades A_{260} de ribosomas, a los tiempos indicados y se midió el fosfato inorgánico (Pi) liberado mediante una adaptación de un método colorimétrico previamente descrito (17). Para ello, las muestras se diluyeron hasta un volumen de 150 μ L con agua destilada y se mezclaron con 150 μ L de SDS al 12 gr/dL, y 300 μ L de reactivo de color (ácido ascórbico al 6 gr/dL, molibdato de amonio al 1 gr/dL en HCl 1N). Esta mezcla se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se añadieron 450 μ L de reactivo estabilizante (citrato de sodio al 2 gr/dL, metaarsenito de sodio al 2 gr/dL y ácido acético al 2 mL/dL %). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 850 nm. La cantidad de Pi liberado se determinó con una curva de calibración construida con una solución patrón de K_2HPO_4 en el rango de 0,5-100 nmol de Pi.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características bioquímicas de la actividad de ATPasa asociada a los ribosomas de placenta humana. La actividad de ATPasa asociada a los ribosomas de placenta humana se evaluó en la fracción de 80S LM. Esto fue necesario pues en la fracción de ribosomas unidos a membranas la actividad de ATPasa ribosomal es acompañada por las ATPasas de membrana y los resultados serían muy difíciles de interpretar. Los 80S LM aislados presentaron integridad estructural y fueron eficientes en traducir el ARN mensajero sintético poli(U) en un sistema para traducción *in vitro* de placenta humana bajo condiciones iónicas y de temperatura cercanas a las fisiológicas (16).

Los ensayos de cinética de hidrólisis de ATP (3 mmol/L) en presencia de los 80S LM permitieron calcular la velocidad de hidrólisis del nucleótido en condiciones saturantes ($V = 500 \pm 50$ pmol Pi/ A_{260} 80S/min) y la constante de catálisis aparente (k_{cat} aparente = $0,5 \pm 0,1$ s⁻¹) de la actividad enzimática aso-

ciada a los ribosomas (Figura 1A). Estos valores son compatibles con lo reportado para otros ribosomas eucarióticos (11-13, 18) y por lo tanto, sugieren que los 80S LM aislados de placenta humana son de pureza y competencia funcional semejantes a las de los ribosomas de otros mamíferos utilizados en reportes previos.

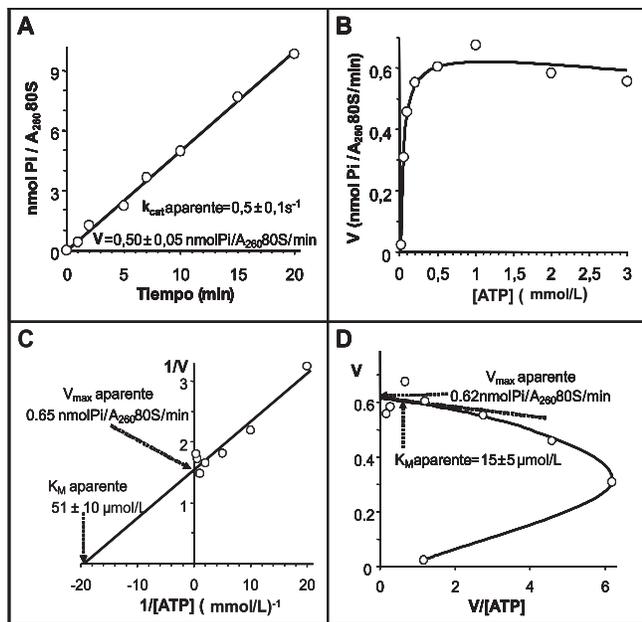


Figura 1. Análisis cinético de la actividad ATPasa asociada a ribosomas 80S libres de membranas (LM) humanos. **A**, Cinética de hidrólisis de ATP. Los ribosomas 80S LM (5,1 unidades A_{260}) fueron incubados en presencia de ATP (3 mmol/L) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas correspondientes a 0,6 unidades A_{260} de ribosomas a los tiempos indicados para analizar el Pi liberado (nmol Pi/ A_{260} 80S). Se indican los promedios para la constante de catálisis aparente (k_{cat} aparente) y la velocidad de hidrólisis de ATP (V) en nanomoles de Pi liberado por unidad A_{260} de 80S por minuto (nmol Pi/ A_{260} 80S/min), de tres experimentos independientes. **B**, Velocidad de hidrólisis a diferentes concentraciones de ATP. Las velocidades de hidrólisis (V) se expresan como nmol Pi/ A_{260} 80S/min. Los resultados mostrados en **B** fueron transformados para representar los gráficos de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk, (**C**) y de Eadie-Hofstee (**D**). Se indican los valores de K_M y de V_{max} aparentes, estimados en ambas representaciones.

Para determinar los parámetros cinéticos de la actividad ATPasa asociada a los ribosomas 80S LM humanos, se realizaron experimentos de cinética de hidrólisis en presencia de diferentes concentraciones de sustrato. La velocidad de hidrólisis alcanza su valor máximo entre 0,5 mmol/L y 1,0 mmol/L ATP; por encima de 1,0 mmol/L hay una ligera disminución de la actividad, que indica un fenómeno de inhibición por sustrato (Figura 1B).

Con las velocidades de hidrólisis a diferentes concentraciones de ATP, se realizó un análisis de dobles recíprocos (Figura 1C).

En el análisis no se incluyó el punto correspondiente a la mínima concentración de sustrato (20 μ mol/L) por estar muy desviado de la tendencia que establecen el resto de los puntos. Esta desviación sugiere un comportamiento enzimático no ajustado a la ecuación de Michaelis-Menten, que fue corroborado al utilizar la representación de Eadie-Hofstee. La forma del gráfico obtenido en este caso corresponde a una enzima con cooperatividad positiva (Figura 1D). La cooperatividad positiva implica cambios conformacionales que incrementan la afinidad por el sustrato a medida que la concentración de éste aumenta. Dado que el ribosoma debe presentar cambios de conformación durante la traducción (8-10), la cooperatividad en la ATPasa podría estar implicada en la función ribosomal.

Los valores de V_{max} aparente obtenidos son similares para ambos tipos de representaciones: 0,65 y 0,62 nmol Pi/ A_{260} 80S/min, para la de Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee, respectivamente. Los estimados de K_M fueron de 58 μ mol/L en la representación de Lineweaver-Burk (Figura 1C) y de 15 μ mol/L en la de Eadie-Hofstee para la forma más activa de la enzima (Figura 1D). Cabe destacar que el valor de K_M aparente (calculado según la representación de Lineweaver-Burk) para la ATPasa asociada a los ribosomas de placenta humana, está en el orden de las reportadas para ribosomas de hígado de conejo y de cerdo: 87 μ mol/L y 44 μ mol/L, respectivamente (12, 13). Por otra parte, la característica de cooperatividad positiva encontrada en la ATPasa asociada a los ribosomas 80S LM de placenta humana, también ha sido reportada para las ATPasas asociadas a ribosomas de cerdo, de hígado de conejo y para el factor EF3 de levadura (13, 18). Estas similitudes sugieren características enzimáticas conservadas de las ATPasas asociadas a ribosomas de diferentes especies de mamíferos, y una homología funcional de esta actividad con el factor EF3 de hongos.

Se estudió el efecto de inhibidores de hidrólisis de ATP empleando ribosomas de placenta humana (Tabla I). El metavanadato de amonio, un inhibidor del factor EF3 y de ATPasas asociadas a otros ribosomas eucarióticos (9, 18-20), ocasionó un incremento de 10 veces en el valor de la K_M aparente mientras que la V_{max} en presencia de metavanadato de amonio disminuyó en un 57% (ver Tabla I). En contraste, el alcaloide ouabaina, inhibidor de la Na^+/K^+ ATPasa de membranas (21), no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPasa. Estos resultados confirman que la actividad ATPasa está asociada a los ribosomas 80S LM y no a membranas que pudieran co-purificar con estos ribosomas. También es interesante denotar el paralelismo con el EF3 de hongos en cuanto a efecto de inhibidores.

Tabla 1 Parámetros cinéticos de los ribosomas 80S LM en presencia y ausencia de inhibidores de hidrólisis de ATP

Condición	K_M aparente* ($\mu\text{mol/L}$)	V_{max} aparente* ($\text{nmol Pi/A}_{260}/80\text{S}/\text{min}$)
80S LM sin inhibidor	58 ± 10	$0,70 \pm 0,10$
80S LM + meta-vanadato	558 ± 40	$0,30 \pm 0,10$
80S LM + ouabaina	56 ± 10	$0,69 \pm 0,10$

Los ribosomas 80S LM fueron incubados en ausencia y presencia de metavanadato (3 mmol/L) y ouabaina (3 mmol/L), y se siguió la cinética de hidrólisis de ATP según lo indicado en Materiales y Métodos. La K_M y V_{max} fueron calculados según gráfico de Lineweaver-Burk

Efecto de antibióticos sobre la actividad ATPasa asociada a ribosomas 80S. También se analizó el efecto de algunos antibióticos que afectan la función traduccional del ribosoma tanto en eucariotes como en bacterias, sobre la ATPasa ribosomal y se midió en paralelo el efecto sobre la síntesis de polifenilalanina (Figura 2).

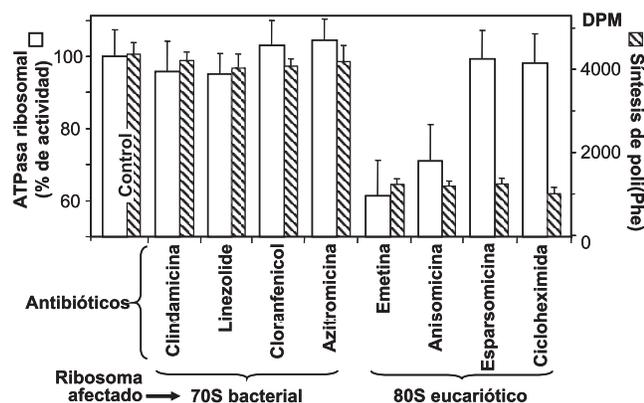


Figura 2. Efecto de diferentes antibióticos sobre la actividad ATPasa asociada a los 80S LM de placenta humana y sobre la actividad de síntesis de poli(Phe) de dichos ribosomas. Los ensayos de hidrólisis de ATP y de síntesis de poli(Phe) se realizaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, con 12 unidades A_{260}/ml de ribosomas 80S LM y en presencia de 0,5 mmol/L de cada uno de los antibióticos señalados. La actividad ATPasa se expresa como el porcentaje de Pi liberado con respecto al control sin antibiótico (\square) y la de síntesis de poli(Phe) como la radioactividad incorporada en poli(Phe) o DPM (hatched).

La esparsomicina y la cicloheximida, inhibidores de la actividad peptidil-transferasa en ribosomas eucarióticos (22, 23) así como los antibióticos específicos para ribosomas bacterianos, no tuvieron un efecto significativo sobre la ATPasa asociada a los ribosomas humanos. En el ensayo funcional de

síntesis de polifenilalanina los antibióticos usados mostraron la actividad esperada: sólo los conocidos por afectar al ribosoma eucariótico inhibieron la actividad traduccional *in vitro*. Estos resultados indican, como es de esperar, que dada la riqueza en sitios funcionales distintos que ofrece la estructura ribosomal, algunos antibióticos inhibidores de la traducción pueden no afectar la actividad ATPasa. No fue este el caso con la emetina y la anisomicina.

La emetina, un alcaloide que se une a la subunidad ribosomal 40S y bloquea el movimiento del ribosoma a lo largo del ARNm e inhibe la translocación (24), y se ha reportado que también inhibe la ATPasa ribosomal en hígado de conejo (18), disminuyó significativamente (~50%) la actividad de ATPasa de los 80S LM (ver Figura 2). La anisomicina, antibiótico que actúa sobre el sitio A de la subunidad ribosomal 60S bloqueando la formación del enlace peptídico (23), tuvo también un efecto inhibitorio significativo (~30%) sobre la actividad ATPasa asociada a los ribosomas. También se ha reportado que la anisomicina afecta al sitio E del ribosoma (23, 25). Este aspecto es interesante dada la interrelación funcional que existe entre el factor EF3 y el sitio E del ribosoma durante el proceso de síntesis de proteínas (10,12). El hecho de que un antibiótico que afecte este sitio ribosomal inhiba también a la actividad ATPasa asociada a los ribosomas humanos, sugiere una relación funcional entre dicha actividad con un factor análogo al EF3 de hongos. Evidencias adicionales de esta relación funcional, son los resultados señalados anteriormente de la inhibición de la actividad ATPasa asociada a los ribosomas humanos por el metavanadato (Tabla 1) y los estudios que indican que esta actividad tiene una implicación funcional en el proceso de síntesis de proteínas en humanos (15).

Se requieren más estudios para definir en detalle la función específica de la ATPasa asociada a los ribosomas humanos y su relación con el factor EF3 en hongos. Hasta los momentos, las características únicas del factor EF3 lo han definido como un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fungicidas (26, 27). Sin embargo, evidencias previas (12, 15, 18), y los resultados encontrados en este trabajo sugieren una posible similitud funcional de la ATPasa asociada a los ribosomas humanos con el factor EF3 de hongos superiores. Este aspecto debe ser considerado para analizar posibles efectos adversos de agentes farmacológicos diseñados para bloquear la función del EF3 de hongos patógenos. Obviamente, ensayos *in vitro* con ribosomas humanos constituirían un método práctico y de bajo costo para descartar compuestos potencialmente tóxicos para humanos.

La reciente elucidación de la estructura del ribosoma bacteriano a resolución atómica, ha desatado una proliferación de estudios estructurales y de relación estructura-función ribosomal. Una de las derivaciones más interesantes es la posibilidad de diseño de antibióticos sintéticos capaces de unirse con gran afinidad a sitios funcionales importantes del ribosoma bacteriano. En la industria farmacéutica, esto conduce a

la rápida producción de una gran cantidad de compuestos candidatos a uso terapéutico (28). Los enormes costos de las pruebas a las que tienen que ser sometidos estos compuestos antes de ser utilizados en humanos (1-1,2 millones USA\$ por compuesto) hacen muy pertinente la implementación de pruebas preliminares *in vitro*. Los compuestos diseñados para bloquear la función ribosomal pueden, por ejemplo, ser probados en ensayos de síntesis de proteínas *in vitro* (28). Los resultados de este estudio indican que otro tipo de prueba, no excluyente y preferiblemente previa, es el análisis de actividad ATPasa ribosomal. Aunque no se detectarían todos los compuestos potencialmente peligrosos (ver Figura 2), el análisis de la ATPasa sería, por su bajo costo, rapidez y sencillez de ejecución, útil para descartar los compuestos que muestren efecto. Además, el procedimiento de análisis es fácilmente adaptable a tecnología de ensayos de alto rendimiento ("high throughput") para el análisis rápido de gran número de compuestos.

Agradecimientos. Este trabajo fue posible gracias a la colaboración prestada por el personal médico y enfermeras de la Maternidad La Floresta (Maracay, estado Aragua) en la recolección de las placetas, y a los licenciados Ninoska Ramirez y Edgar Tovar, en el procesamiento de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- Svitkin YV, Pause A, Haghghat A, Pyronnet S, Witherell, G, Belsham, GJ, Sonenberg N. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA*. 2001; 7: 382-394.
- Svitkin YV, Sonenberg N. Translational control by the poly(A) binding protein: a check for mRNA integrity. *Mol Biol (Mosk)*. 2006; 40: 684-693.
- Proud CG. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol Biol Rep*. 1994; 19(3):161-70.
- Ganoza MC, Kiel MC, Aoki H. Evolutionary conservation of reactions in translation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(3): 460-85.
- Kamath A, Chakraborty K. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J Biol Chem*. 1989; 264: 15423-15428.
- Dasmahapatra, B, Chakraborty, K. Protein synthesis in yeast. I. Purification and properties of elongation factor 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 1981; 256: 9999-10004.
- Hutchinson, J.S., Feinberg, B., Rotwell, T.C., Moldave, K. Monoclonal antibody specific for yeast elongation factor 3. *Biochemistry*. 1984; 23: 3055-3063.
- Triana-Alonso, F, Chakraborty, K, and Nierhaus, KH. The Elongation Factor 3 Unique in Higher Fungi and Essential for Protein Biosynthesis is an E Site Factor. *J. Biol Chem*. 1995; 270: 20473-20478.
- Chakraborty K, Triana-Alonso FJ. Yeast elongation factor 3: structure and function. *Biol Chem*. 1998; 379: 831-840.
- Andersen CB, Becker T, Blau M, Anand M, Halic M, Balar B, Mielke T, Boesen T, Pedersen JS, Spahn CM, Kinzy TG, Andersen GR, Beckmann R. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature*. 2006; 443(7112): 663-668.
- El'skaya AV, Serebryanik AJ, Ovcharenko G.V. Stimulation of yeast EF-3 factor by mammalian ribosomes. *Ukr Biokhim Zh*. 1995; 67: 28-32.
- El'skaya AV, Ovcharenko GV, Palchevskii SS, Petrusenko ZM, Triana-Alonso FJ, Nierhaus KH. Three tRNA binding sites in rabbit liver ribosomes and role of the intrinsic ATPase in 80S ribosomes from higher eukaryotes. *Biochemistry*. 1997; 36: 10492-10497.
- Kovalchuk O, Chakraborty K. Comparative analysis of ribosome-associated adenosinetriphosphatase (ATPase) from pig liver and the ATPase of elongation factor 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 1994; 226: 133-140.
- Grummt, F., Grummt, I., and Erdmann, V. (1974) ATPase and GTPase activities isolated from rat liver ribosomes. *Eur J Biochem*. 43: 343-348.
- Bandeira E, Ferreras AC, Celis A, Pérez ME, Yépez A, Cayama E, Triana-Alonso F. ATP hidrolasa asociada a ribosomas de placenta humana. *Anales de Investigación. Memorias del Segundo Congreso de Investigación de la Universidad de Carabobo*. 2002; 1(1) 309-319.
- Ferreras AC, Bandeira E, Cayama E, Zambrano R, Avila H, Yépez A, Triana L, Triana-Alonso FJ. Efficient and faithful *in vitro* translation of natural and synthetic mRNA with human ribosomes. *Int J Mol Med*. 2004; 13: 527-536.
- Gonzalez P, Sanchez-Nieto S, Gavilanes-Ruiz M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem*. 1992; 200: 235-238.
- Rodnina MV, Serebryanik AJ, Ovcharenko G, El'skaya AV. ATPase strongly bound to eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem*. 1994; 225: 305-310.
- Uritani M, Miyazaki M. Characterization of the ATPase and GTPase activities of elongation factor 3 (EF-3) purified from yeast. *J Biochem (Tokio)*. 1988; 103: 522-530.
- Skogerson L, Engelhardt D. Dissimilarity in protein chain elongation factor requirements between yeast and rat liver ribosomes. *J Biol Chem*. 1977; 252: 1471-1475.
- Palasis M, Kuntzweiler TA, Arguello JM, Lingrel JB. Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J Biol Chem*. 1996; 271(24):14176-82.
- Baliga, B.S.; Pronczuk, A.W., Munro, H.N. Mechanism of Cycloheximide Inhibition of Protein Synthesis in a Cell-free System Prepared from Rat Liver. *J Biol Chem* 1969; 244: 4480-4489.
- Ioannou M, Coutsogeorgopoulos CH, Synetos D. Kinetics of Inhibition of Rabbit Reticulocyte Peptidyltransferase by Anisomycin and Sparsomycin. *Mol Pharm*. 1998; 53:1089-1096.
- Gupta RS, Siminovitch L. An *in vitro* analysis of the dominance of emetine sensitivity in Chinese hamster ovary cell hybrids. *J Biol Chem*. 1978; 253(11):3978-82.
- Rodriguez-Fonseca C, Amils R, Garrett RA. Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. *J Mol Biol*. 1995; 247:224-235.
- Lapan KA, Chapple JP, Galcheva-Gargova Z, Yang M, Tao J. Peptide ligands in antibacterial drug discovery: use as inhibitors in target validation and target-based screening. *Expert Opin Ther Targets*. 2002; 6(4): 507-516.
- Blakely G, Hekman J, Chakraborty K, Williamson PR. Evolutionary divergence of an elongation factor 3 from *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*. 2001; 83(7): 2241-2248.
- Franceschi F, Duffy EM. Structure-based drug design meets the ribosome. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 1016-1025.