

ARTICULO**Optimización de un sistema de traducción *in vitro* derivado de placenta humana para la evaluación de antibióticos**

Ana C Ferreras, Eduardo Bandeira, Ninoska Ramirez, Edgar Tovar, Edmundo Cayama, Juana Ledia Triana, Francisco Triana Alonso,

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

Correspondencia: F. Triana Alonso
Final Calle Cecilio Acosta, Urb. Cantarrana, Las Delicias, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

Telf.: + 58-243-2425822 / 2425997

Fax: + 58-243-2425333

E-mail: ftrianaalonso@yahoo.com
biomed@uc.edu.ve

Recibido: Febrero 2007 **Aprobado:** Abril 2007

RESUMEN

Un sistema de traducción *in vitro* derivado de placenta humana es una herramienta útil para estimar el efecto que tendrían antibióticos nuevos sobre la síntesis de proteínas en células humanas. Una modalidad simple de ensayo *in vitro* es la síntesis de polifenilalanina o poli(Phe), dependiente del ARN sintético poli(U). Para optimizar este ensayo, se purificó ARNt^{Phe} homólogo, partiendo de ARNt total de placenta, mediante una combinación de cromatografía hidrofóbica y de alta presión en fase reversa (RP-HPLC). Al incorporar el ARNt^{Phe} purificado a los ensayos se duplicó la eficiencia de síntesis de poli(Phe) con respecto a la obtenida con un ARNt total heterólogo de levadura. El sistema de ensayo optimizado fue usado para determinar el efecto de antibióticos sobre la elongación de polipéptidos por ribosomas humanos. La actividad ribosomal fue inhibida eficientemente por antibióticos que actúan sobre el ribosoma eucariota (cicloheximida y emetina, IC₅₀ \cong 40-60 μ mol/L y 10-30 μ mol/L, respectivamente). Por el contrario, antibióticos que actúan sobre el ribosoma bacteriano (cloranfenicol, azitromicina, y clindamicina) no mostraron efecto inhibitorio aún a concentraciones altas (hasta 1 mmol/L). Estos resultados demuestran la sensibilidad diferencial esperada del sistema *in vitro* y su potencialidad para ser utilizado en una evaluación temprana y rápida del efecto de antibióticos de nueva generación sobre la síntesis de proteínas con ribosomas humanos. Por lo tanto, el sistema de ensayo *in vitro* permitiría seleccionar aquellos compuestos con mejores posibilidades para las pruebas posteriores necesarias para establecer su uso terapéutico en humanos.

Palabras clave: Ribosomas, Traducción *in vitro*, Placenta Humana, Antibióticos.

ABSTRACT

An *in vitro* translation system derived from human placenta is an useful tool to evaluate the possible effect of new antibiotics on protein synthesis in human cells. A simple assay model is the poly(U)-directed poly(Phe) synthesis test. To optimize this assay, the homologous tRNA^{Phe} was purified from total RNA isolated from human placenta combining hydrophobic chromatography and reverse phase high pressure chromatography (RP-HPLC). Parallel assays with heterologous tRNA from yeast and purified human tRNA^{Phe} revealed a two-fold increase in poly(Phe) synthesis efficiency when the homologous tRNA was used. The improved assay system was used to test the effect of antibiotics on polypeptide elongation by human eukaryotic ribosome (cicloheximide and emetine, IC₅₀ \cong 40-60 μ mol/L and 10-30 μ mol/L, respectively). In contrast, antibiotics that affect the bacterial ribosome (chloramphenicol, azytromicine and clyndamicine) did not show inhibitory effect at concentrations as high as 1 mmol/L. This showed the expected differential sensitivity of the *in vitro* assay system making possible an early and fast evaluation of the effect of new antibiotics on protein synthesis with human ribosomes. The use of this system would allow to select the compounds with the best possibilities for the next necessary tests to establish their therapeutic use in humans.

Key words: Ribosomes, *In vitro* translation, Human Placenta, Antibiotics.ribosomes. The ribosomal activity was efficiently inhibited by antibiotics known to affect the

INTRODUCCIÓN

El proceso de síntesis de proteínas, en especial la actividad ribosomal, es uno de los blancos principales de muchos antibióticos, tanto naturales como sintéticos. La emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos usados en terapéutica y el esclarecimiento de la estructura atómica del ribosoma bacteriano (1-3), ha estimulado a la industria farmacéutica al desarrollo de antibióticos sintéticos con especificidad para unión y bloqueo de dominios funcionales claves de estos ribosomas (4-6). Debido a las similitudes estructurales evolutivamente conservadas entre los ribosomas de bacterias y de eucariotas, puede existir un efecto cruzado indeseado sobre los ribosomas humanos. Esta posibilidad debe ser descartada antes de establecer el posible uso terapéutico de estos antibióticos en humanos.

Los antibióticos nuevos, igual que cualquier nueva droga que se proponga para uso en humanos, se someten a una serie de ensayos *in vitro* y pruebas en animales. Esto determina altos costos y largos períodos de tiempo. Al tratarse de compuestos con capacidad para afectar la maquinaria traduccional es lógico que los ensayos de síntesis de proteínas *in vitro* se incluyan con alta prioridad para examinar, por un lado, el efecto sobre bacterias y, por el otro, el posible efecto sobre mamíferos. Estos ensayos se efectúan con sistemas libres de células constituidos por un extracto celular total que contiene componentes traduccionales: ribosomas, enzimas solubles, factores y ARN de transferencia (ARNt) o por la reunión de cada uno de estos componentes purificados. Con un suplemento adecuado de energía (ATP y GTP), aminoácidos y otros cofactores (Mg⁺², K⁺), estos sistemas pueden sintetizar *in vitro* proteínas codificadas por ARNm endógeno o exógeno (7).

Los sistemas de traducción *in vitro* generalmente utilizados para estudiar los mecanismos de acción de los antibióticos son el de *E. coli*, en bacterias (8, 9) y el de reticulocito de conejo, en mamíferos (10, 11, 12). Sin embargo, las restricciones interespecie claramente indican que cuando se trata de probar fármacos para futuro uso en humanos, es preferible utilizar un sistema eficiente de traducción *in vitro* de origen homólogo (humano).

Este tipo de ensayo no ha sido posible hasta el reciente desarrollo de un sistema optimizado para traducción *in vitro* con componentes traduccionales aislados de placenta humana (13). Este sistema, constituido por ribosomas 80S libres de membranas y la fracción soluble (fuente de factores y enzimas de la traducción), es muy activo en la síntesis de polifenilalanina o poli(Phe) dirigida por el ARN sintético poli(U). Durante la optimización del sistema fue evidente que los componentes aislados muestran actividad máxima en condiciones cercanas a las fisiológicas de $[Mg^{+2}]$, $[K^+]$ y temperatura (13). Esta cualidad de actividad, en dichas condiciones, indica que este sistema se puede usar para evaluar en forma confiable y rápida el efecto de nuevos antibióticos sintéticos sobre los ribosomas citoplasmáticos humanos.

En este trabajo se presenta una optimización de la purificación del ARNt específico para fenilalanina (ARNt^{Phe}) de placenta humana utilizado en los ensayos de síntesis de poli(Phe) y la evaluación del efecto de antibióticos conocidos, que afectan al ribosoma bacteriano o al eucariótico, sobre dichos ensayos. Lo primero es necesario para un sistema de traducción *in vitro* homólogo y activo en condiciones cercanas a las del intracelular de células humanas. Esto constituye un requisito fundamental para determinar si los resultados que se deriven de la evaluación del efecto de los antibióticos sobre la traducción *in vitro*, representan de manera confiable lo que ocurriría *in vivo*.

MATERIALES Y METODOS

Las placentas se obtuvieron por cesáreas practicadas a mujeres (previo consentimiento informado), sanas y con embarazos normales a término. El procesamiento de las placentas y la obtención de los componentes traduccionales: ribosomas 80S y fracción postpolisomal o S-100 (fuente de enzimas y factores de la traducción) se realizó de acuerdo a lo descrito previamente (13).

Purificación de ARNt^{Phe} de placenta humana. Se partió de una preparación de ARN crudo de placenta, obtenida mediante extracción del tejido placentario con fenol como ha sido reportado (14). Para obtener el ARNt total, esta preparación se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y fraccionamiento con isopropanol, según los métodos descritos previamente (14-16). El ARNt total se sometió a cromatografía hidrofóbica siguiendo un procedimiento similar al descrito para la purificación de ARNt específicos de *E. coli* (16). Para ello, 4.800 unidades de absorbancia a 260 nanómetros (unidades A_{260}) de ARNt total se aplicaron a una columna de fenil-sefarosa (*Fast Flow*, SIGMA; 26 x 2 cm) equilibrada en solución A: Na(CH₃COO) 20 mM, pH 5,3; MgCl₂ 10 mmol/L y (NH₄)₂SO₄ 1,5 mol/L y ajustada a un flujo de 1,5 mL/min. El material retenido se recuperó aplicando un gradiente negativo de (NH₄)₂SO₄ en solución A hasta 0,7 mol/L. El exceso de (NH₄)₂SO₄ en las fracciones colectadas se removió por filtración molecular en una columna de Sephadex G-25 equilibrada en Na(CH₃COO) 5 mmol/L; Mg(CH₃COO)₂ 3 mmol/L y NaCl 75 mmol/L. El material excluido se precipitó con un volumen de isopropanol a -20 °C (por 12 horas), se recuperó por centrifugación y se disolvió en agua estéril. La presencia de ARNt^{Phe} en las fracciones se determinó mediante ensayos de aminoacilación. Las fracciones que presentaron mayor capacidad aceptora de

Phe (enriquecidas en ARNt^{Phe}) se sometieron a cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).

Aproximadamente 400 unidades A₂₆₀ de las fracciones enriquecidas en ARNt^{Phe} se inyectaron en una columna DeltaPack (Waters) tipo C4 (diámetro de poro 300 Å, diámetro de partícula 15 µmol/L) equilibrada en solución B: NH₄(CH₃COO) 20 mmol/L pH 5,5; NaCl 400 mmol/L, y Mg(CH₃COO)₂ 10 mmol/L, a un flujo de 1,4 mL/min (presión típica de 500-600 psi). El material retenido en la columna se separó con un gradiente de metanol en solución B, según se indica. El material contenido en las fracciones obtenidas fue recuperado por precipitación con isopropanol y rediseuelto en agua estéril. Las fracciones con mayor actividad aceptora de Phe se reunieron y se sometieron a una segunda separación por RP-HPLC.

Ensayos de aminoacilación. Volúmenes fijos de las fracciones procedentes de cromatografía hidrofóbica o RP-HPLC se mezclaron con la fracción enzimática (S-100) de placenta (concentración final de proteínas: 2-4 mg/mL) en presencia de [¹⁴C]Phe (50 dpm/pmol) en las condiciones descritas previamente (13). La actividad aceptora se expresa como los picomoles de [¹⁴C]Phe incorporados por unidad A₂₆₀ de fracción analizada (pmol Phe/ A₂₆₀).

Ensayos de síntesis de poli(Phe). Muestras de ribosomas 80S (0,6 unidades A₂₆₀) fueron incubadas con la fracción S-100 de placenta humana (2-3 mg/mL), el ARN sintético poli(U) (40 µg), el ARNt total de levadura (0,8 unidades A₂₆₀ por ensayo) o el ARNt^{Phe} purificado de placenta humana (0,06 unidades A₂₆₀ por ensayo, o como se indique en las figuras) y [¹⁴C]Phe (12,5 dpm/pmol), en un volumen final de 50 µL bajo las condiciones optimizadas previamente (13). En algunos casos se añadieron los antibióticos que se indican en las figuras. La actividad de síntesis se expresa como la cantidad de [¹⁴C]Phe (en dpm) incorporada en polipéptidos insolubles en TCA. En el caso de los ensayos donde se añadieron antibióticos la actividad se expresa como el porcentaje de síntesis tomando el ensayo control sin antibiótico como 100%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se examinó la dependencia de ARNt y ribosomas 80S de la actividad de síntesis de poli(Phe) del sistema de traducción *in vitro* de placenta humana (Fig. 1).

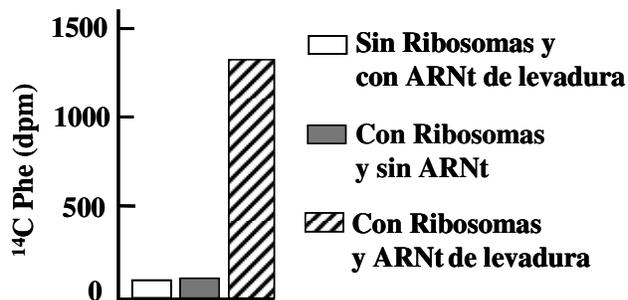


Figura 1. Actividad de síntesis de poli(Phe) en ausencia o en presencia de los ribosomas de placenta humana (0,6 unidades A₂₆₀) o del ARNt de levadura (0,8 unidades A₂₆₀).

En ausencia de los ribosomas o del ARNt, la incorporación de Phe en polipéptidos no fue significativa, mientras que en presencia de estos

componentes la incorporación incrementó en más de 10 veces. A pesar de este incremento la utilización del ARNt total comercial de levadura establece limitaciones por no ser específico (contiene todas las especies de ARNt) ni homólogo. Reportes previos, tanto en procariotes como en eucariotes, indican claramente que las mayores actividades corresponden a sistemas de traducción contruidos con componentes homólogos en condiciones de ensayo cercanas a las fisiológicas (13). Por estas razones el siguiente paso fue la purificación del ARNt^{Phe} de placenta humana.

Previamente se reportó un procedimiento de purificación de ARNt^{Phe} de placenta humana (13). El protocolo de aislamiento fue mejorado significativamente en este trabajo, usando una combinación de cromatografías líquidas de baja y alta presión, basadas en las propiedades iónicas e hidrofóbicas de las moléculas de ARNt. Para separar diferentes grupos de especies de ARNt, el ARNt total de placenta humana se sometió en primer lugar a cromatografía hidrofóbica en fenil-sefarosa (Fig. 2A).

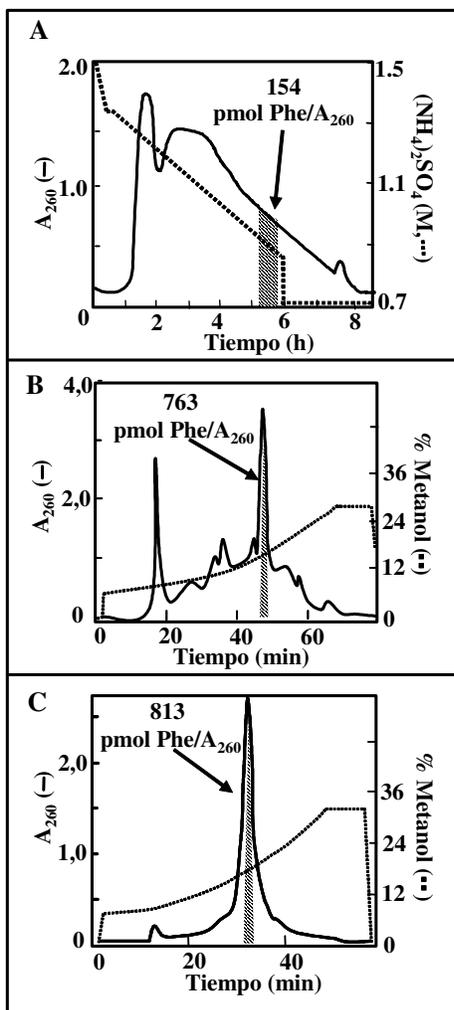


Figura 2. (A): Cromatografía hidrofóbica del ARNt total de placenta humana. Se muestra el perfil de absorbancia a 260 nm (A_{260}) (línea continua) de las fracciones que eluyen según el gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aplicado (línea punteada); la zona demarcada representa las fracciones con mayor actividad aceptora de Phe. (B) y (C) RP-HPLC de las fracciones demarcadas en (A). Se muestran los perfiles de A_{260} (línea continua) de las fracciones que eluyen de acuerdo al gradiente de metanol aplicado (línea punteada); las zonas demarcadas muestran las fracciones donde se encuentra el ARNt^{Phe} y su actividad aceptora de Phe (pmol Phe/ A_{260}).

El fundamento de esta estrategia de separación es el mismo que usan los sistemas biológicos para discriminar los ARNt: la secuencia de bases nitrogenadas (de carácter hidrofóbico) expuestas al medio. Los ensayos de aminoacilación efectuados revelaron el patrón de separación de la actividad aceptora de Phe (Fig. 2A, región sombreada). Las fracciones enriquecidas en ARNt^{Phe} mostraron una actividad aceptora promedio de 154 pmol Phe/A₂₆₀ (seis veces superior al ARNt total de partida, datos no mostrados). Este paso cromatográfico, permitió incrementar la eficiencia de purificación del ARNt^{Phe} en el siguiente paso de RP-HPLC.

La técnica de RP-HPLC es muy eficiente en el aislamiento de especies simples de ARNt (16, 17). Los ARNt interactúan con la matriz cromatográfica utilizada en un medio de alta polaridad y pueden ser separados diferencialmente disminuyendo la constante dieléctrica de la fase líquida incrementando el porcentaje de metanol (Fig. 2B, línea punteada). En el caso del ARNt^{Phe}, la presencia de la base modificada *wyosine* en el anticodón (18) resulta en una interacción fuerte de dicho ARNt con la matriz cromatográfica utilizada en el presente trabajo. Esto implica mayor tiempo de retención, lo cual favorece una mejor separación del ARNt^{Phe} de las otras especies de ARNt presentes en la muestra (17). En un primer paso de RP-HPLC, se aisló una fracción con una actividad aceptora de 763 pmol Phe/A₂₆₀ (Fig. 2B, zona demarcada). Esta fracción se sometió a un segundo paso de RP-HPLC donde se obtuvo una fracción más purificada con una actividad aceptora de 813 pmol Phe/A₂₆₀ (Fig. 2C, zona demarcada).

El ensayo de síntesis de poli(Phe) se realizó en presencia de diferentes cantidades del ARNt^{Phe} de placenta humana purificado (Fig. 3A). La máxima actividad de síntesis se alcanzó con 0,06 unidades A₂₆₀ de ARNt^{Phe} por ensayo de 50 μ L. Además, el nivel de síntesis obtenido con el ARNt^{Phe} purificado correspondió al doble del obtenido con el ARNt comercial de levadura y se requiere 13 veces menos cantidad del ARNt específico (Fig. 3B).

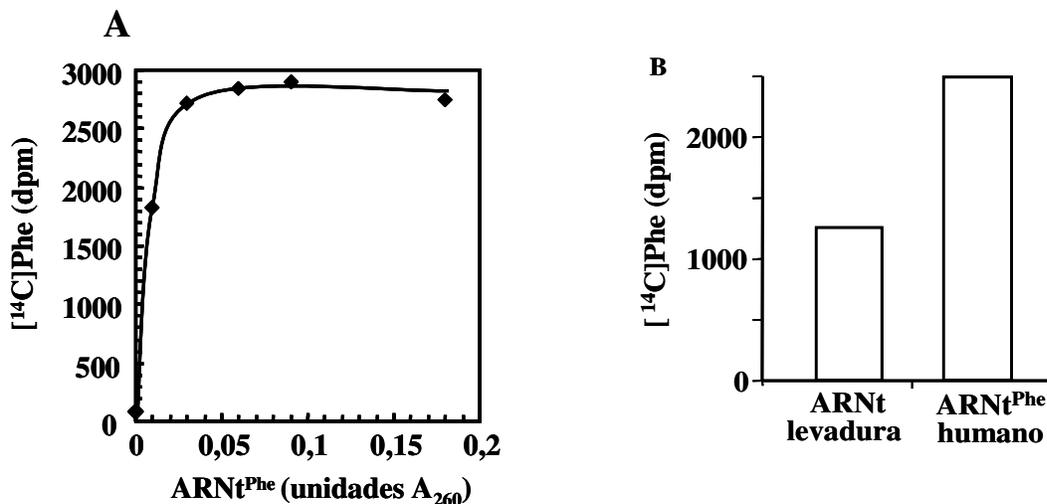
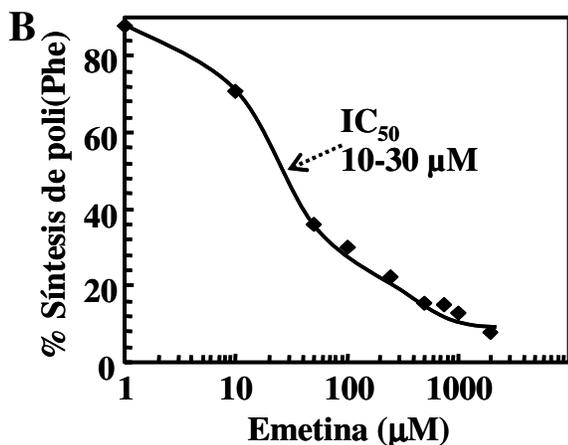
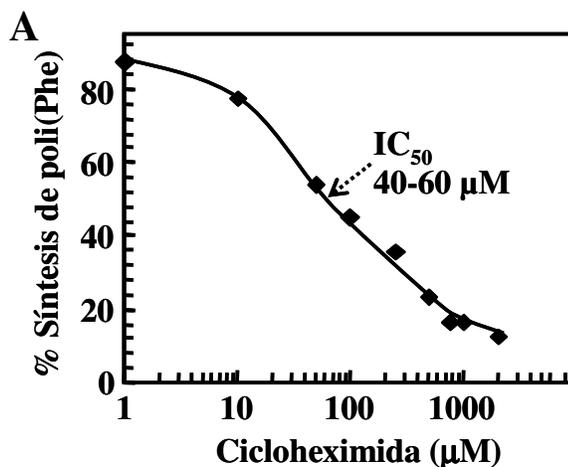


Figura 3. A: Síntesis de poli(Phe) en presencia de diferentes cantidades de ARNt^{Phe} de placenta humana. B: Síntesis de poli(Phe) en presencia de ARNt de levadura y ARNt^{Phe} de placenta humana. Tanto en A como en B el ensayo se realizó en un volumen final de 50 μ L.

Con el uso del ARNt^{Phe} de placenta humana, el sistema de traducción *in vitro* además de ser más eficiente tiene la ventaja de ser un sistema de origen humano completamente homólogo, apropiado para estudiar mecanismos moleculares del proceso de traducción en humanos y el efecto de sustancias de interés farmacológico sobre dicho proceso.

Efecto de antibióticos sobre el sistema de traducción *in vitro* de placenta humana. Se analizó la sensibilidad del sistema a sustancias que inhiben la traducción, utilizando dos antibióticos que bloquean la actividad de los ribosomas eucariotas, como son la cicloheximida y la emetina (inhiben la formación del enlace peptídico y la translocación, respectivamente). Ambos antibióticos inhibieron eficientemente la síntesis de poli(Phe) con una IC₅₀ estimada en el rango de 10-30 $\mu\text{mol/L}$ para la emetina y de 40-60 $\mu\text{mol/L}$ para la cicloheximida (Fig. 4A). También se evaluó el efecto de antibióticos que afectan al ribosoma bacteriano, como son el cloranfenicol (interfiere con el centro peptidil-transferasa), la azitromizina (inhibe la actividad peptidil-transferasa o la translocación) y la clindamicina (interfiere con la unión del aminoacil-ARNt y el peptidil-ARNt al sitio A del ribosoma). Como era de esperarse, estos antibióticos no afectaron significativamente la incorporación en el sistema de placenta humana, aún cuando se utilizaron a concentraciones tan altas como 1 mmol/L. (Fig. 4C).



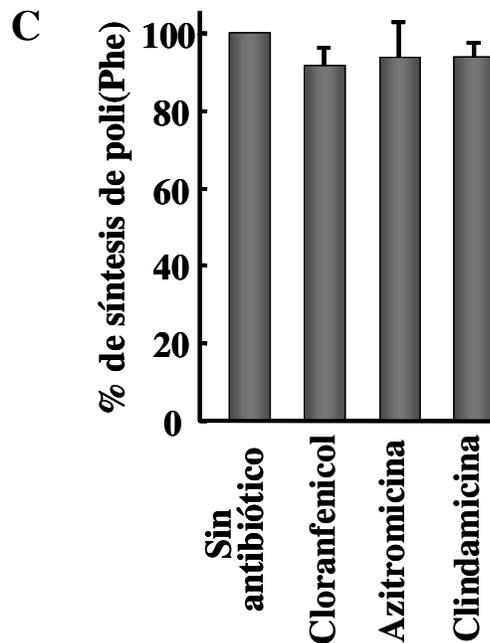


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de cicloheximida (A) y de emetina (B) sobre la síntesis de poli(Phe); las flechas indican la IC_{50} estimada para ambos antibióticos.(C) Efecto de antibióticos que afectan al ribosoma bacteriano sobre la síntesis de poli(Phe) en el sistema de placenta humana; la concentración utilizada en el ensayo de cada antibiótico fue de 1 mmol/L

Los resultados obtenidos con los antibióticos, demuestran la eficiencia y especificidad del sistema de traducción *in vitro* de placenta humana. La inhibición de la traducción por antibióticos que afectan al ribosoma eucariótico y no por aquellos que afectan al ribosoma bacteriano, demuestran la sensibilidad diferencial esperada de los ribosomas de placenta humana a estas sustancias. Esto indica, que este sistema constituye una herramienta útil para inferir el efecto de sustancias farmacológicas sobre la síntesis de proteínas en células humanas.

Muchos de los antibióticos que se están desarrollando actualmente están diseñados molecularmente para tener especificidad para unión y bloqueo de dominios funcionales claves del ribosoma bacteriano, como por ejemplo, el sitio de decodificación (sitio A) y el centro peptidil-transferasa (4-6). Sin embargo, debido a las similitudes estructurales entre los ribosomas bacterianos y el de los eucariotas (3), estos antibióticos también pueden afectar a los ribosomas humanos. Esta posibilidad debe ser evaluada en las primeras pruebas que se hacen para determinar la especificidad de dichos antibióticos.

Entre los sistemas de traducción *in vitro* que se han utilizado para evaluar el efecto de antibióticos sobre los ribosomas y la síntesis de proteínas en mamíferos, se han utilizado el derivado de hígado de rata (19) y el de reticulocito de conejo (11, 12). Sin embargo, estos sistemas no son los más adecuados para evaluar el efecto de estos compuestos sobre los ribosomas humanos ya que no son de origen homólogo. En este sentido, el sistema de traducción *in vitro* derivado de placenta humana, resulta ventajoso ya que los resultados que se obtengan son específicos y representarían de forma más fidedigna el efecto de los antibióticos sobre los ribosomas citoplasmáticos humanos.

Los altos costos de diseño y del esquema de evaluación de nuevas drogas (20, 21) son un gran estímulo para el desarrollo de pruebas para evaluación rápida de compuestos con posible actividad farmacológica. El tipo de ensayo optimizado en este trabajo corresponde a esta categoría pues permitiría decidir en forma rápida y temprana cuales compuestos con actividad antibiótica pueden proseguir el obligatorio, largo, y costoso proceso para autorizar que una nueva droga pueda ser probada en humanos.

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 placentas, y a la asistencia técnica del señor Antonio Yépez de la sección de Ácidos Nucleicos del BIOMED en la realización de los pasos cromatográficos.*

BIBLIOGRAFIA

1. Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 2000; 102: 615–623.
2. Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 2001; 107: 679-688.
3. Nilsson J, Nissen P. Elongation factors on the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 349-354.
4. Hermann T. Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 355–366.
5. Sutcliffe JA. Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 534-542.
6. Franceschi F, Duffy EM. Structure-based drug design meets the ribosome. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1016-1025.
7. Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 150-156.
8. Spirin, A. Ribosome Preparation and Cell-Free Protein Synthesis. En: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR, editors. *The Ribosome, Structure, Function & Evolution*, American Society for Microbiology, Washintong, D.C.1990. p. 56-70.
9. Yan K, Madden L, Choudhry AE, Voigt CS, Copeland RA, Gontarek RR. Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(11):3875-81.
10. Pelham HR, Jackson RJ. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 1976; 67: 247-256.
11. Emmerich B, Erben V, Weller C, Schuster H, Preis R, Rastetter J. Characterisation of protein synthesis in cell-free extracts from different mammalian cells by their sensitivity to inhibitors of polypeptide-chain initiation. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1979; 360(8):1099-111.
12. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* 2000; 6(7):1044-55.
13. Ferreras AC, Bandeira E, Cayama E, Zambrano R, Avila H, Yépez A, Triana L, Triana-Alonso F. Efficient and faithful *in vitro* translation of natural and synthetic mRNA with human ribosomes. *Int J Mol Med* 2004; 13: 527-536.
14. Roe BA. Studies on human tRNA. I. The rapid, large scale isolation and partial fractionation of placenta and liver tRNA. *Nucleic Acids Res* 1975; 2: 21-42.
15. Ehrenstein G. Isolation of sRNA from intact *Escherichia coli* cells. *Meth Enzymol* 1965; 12: 588-595.

16. Odom OW, Deng HY, Hardesty, B. Fluorescence labeling and isolation of labeled RNA and ribosomal proteins. *Meth Enzymol* 1988; 164: 174-187.
17. Cayama E, Yépez A, Rotondo F, Bandería E, Ferreras AC, Triana-Alonso FJ. New chromatographic and biochemical strategies for quick preparative isolation of tRNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E64.
18. Sprinzl M, Vassilenko KS. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(Database issue): D139-40
19. Uchiumi T, Wada A, Kominami R. A base substitution within the GTPase-associated domain of mammalian 28 S ribosomal RNA causes high thiostrepton accessibility. *J Biol Chem* 1995; 270(50):29889-93.
20. Chin-Dusting J, Mizrahi J, Jennings G, Fitzgerald D. Outlook: finding improved medicines: the role of academic-industrial collaboration. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 11: 891-897.
21. Nathan C, Goldberg FM. Outlook: the profit problem in antibiotic R&D. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 11: 887-891.