

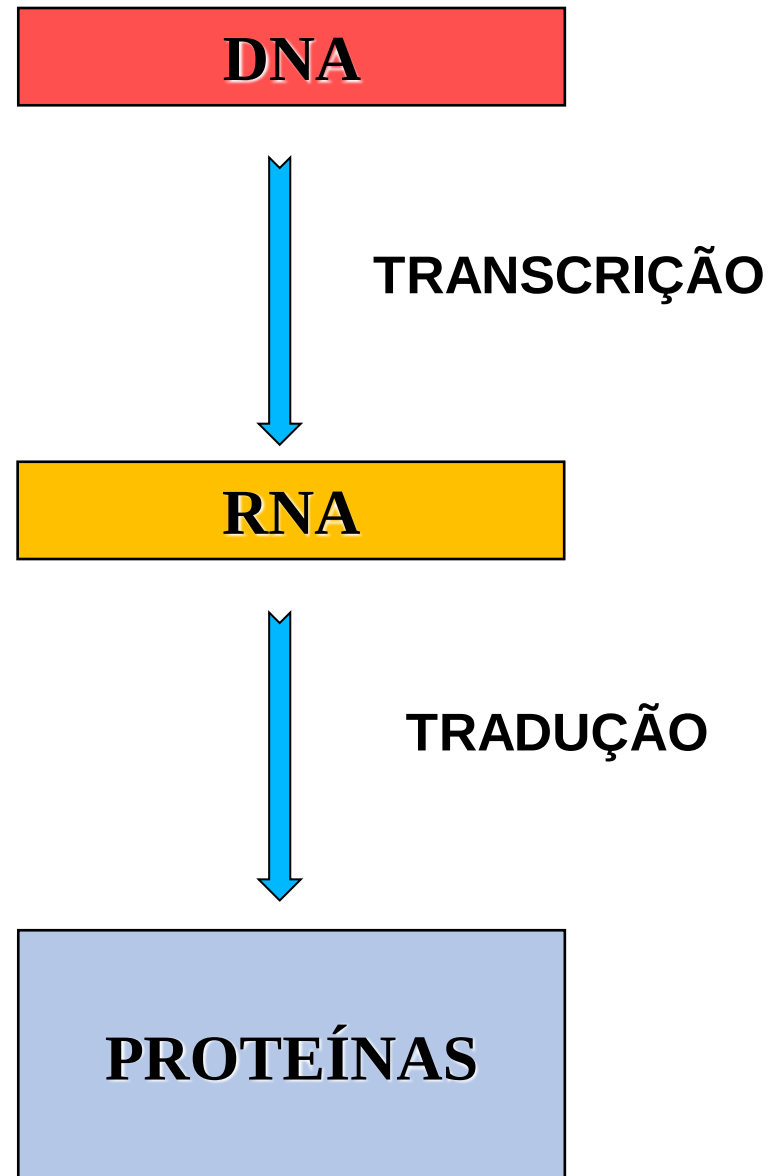
BIOLOGIA MOLECULAR

ACH5564-2022

AULA_4- TRADUÇÃO

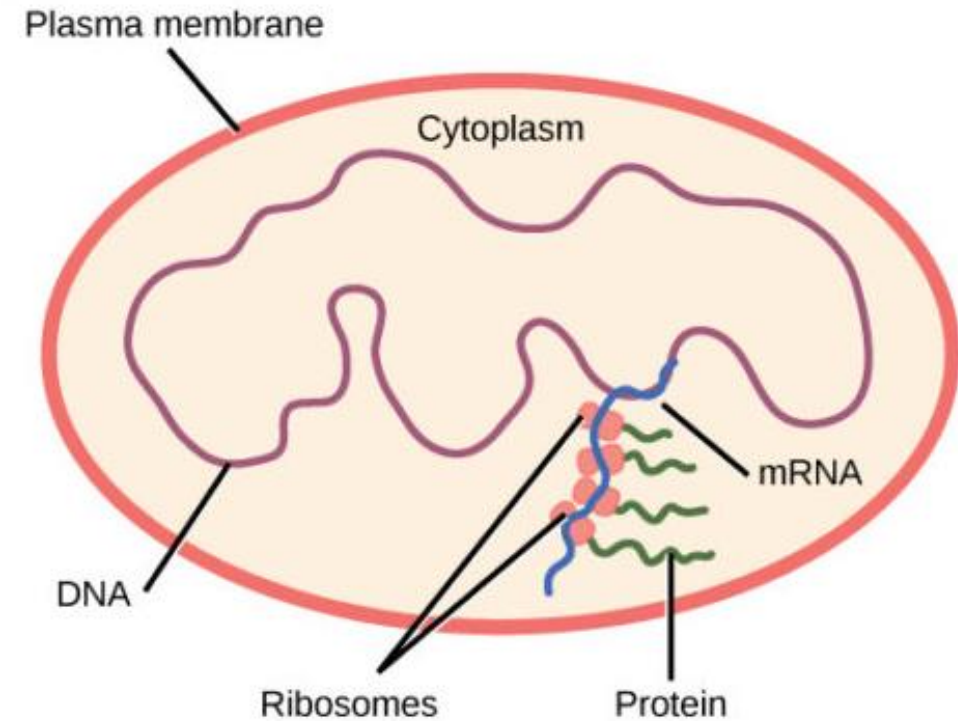
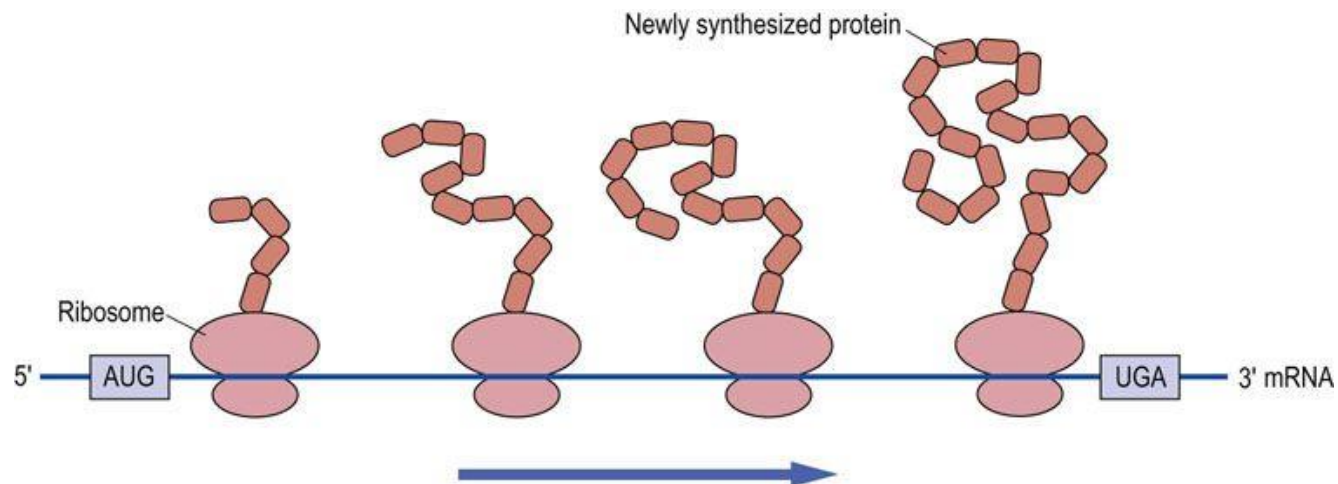
Prof. Luiz Paulo Andrioli

EXPRESSÃO GÊNICA



EXPRESSÃO GÊNICA BACTÉRIAS

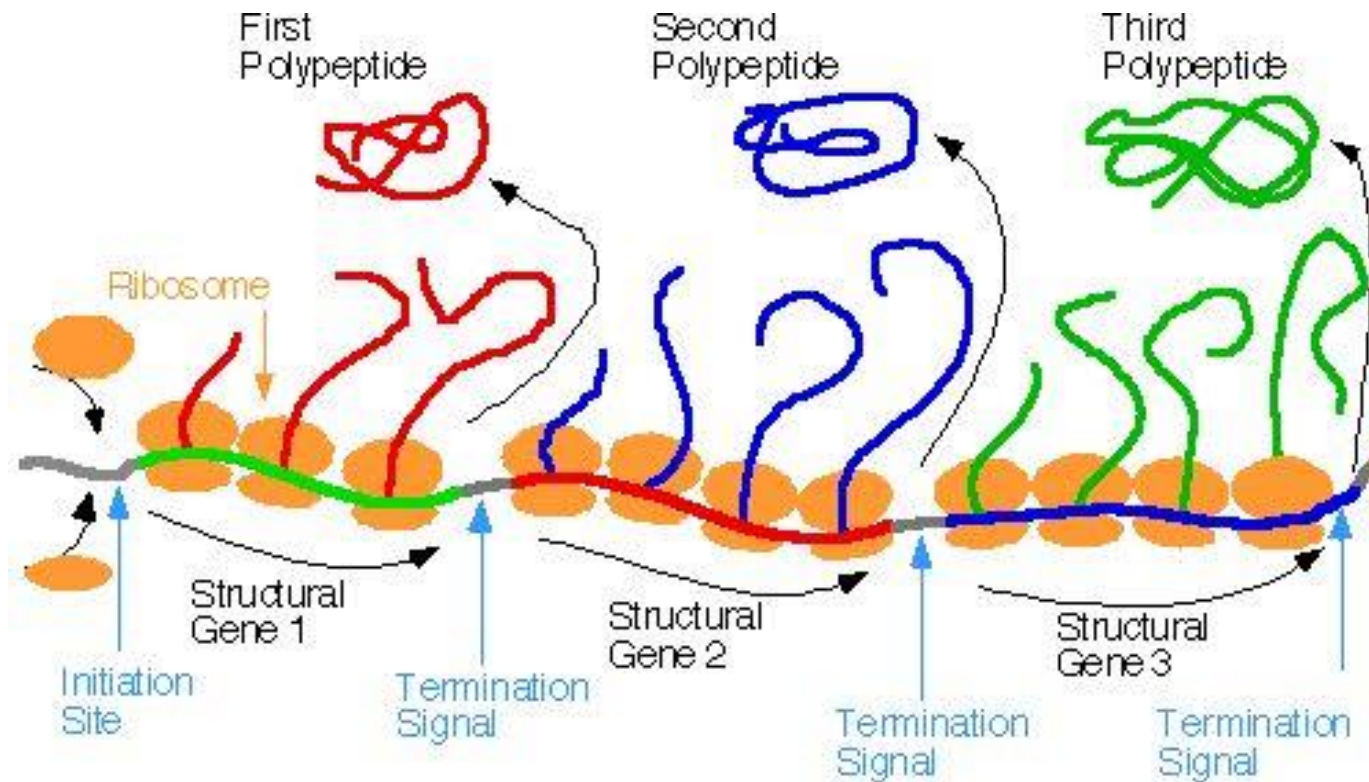
- A transcrição e tradução na bactéria são simultâneas (acopladas), e realizadas no mesmo compartimento- citoplasma;
- Na verdade, antes de finalizar a transcrição, a tradução é iniciada;
- Ribossomos se agregam ao RNA mensageiro ainda durante a transcrição, formando polissomos (polirribossomos);



(a) Prokaryote

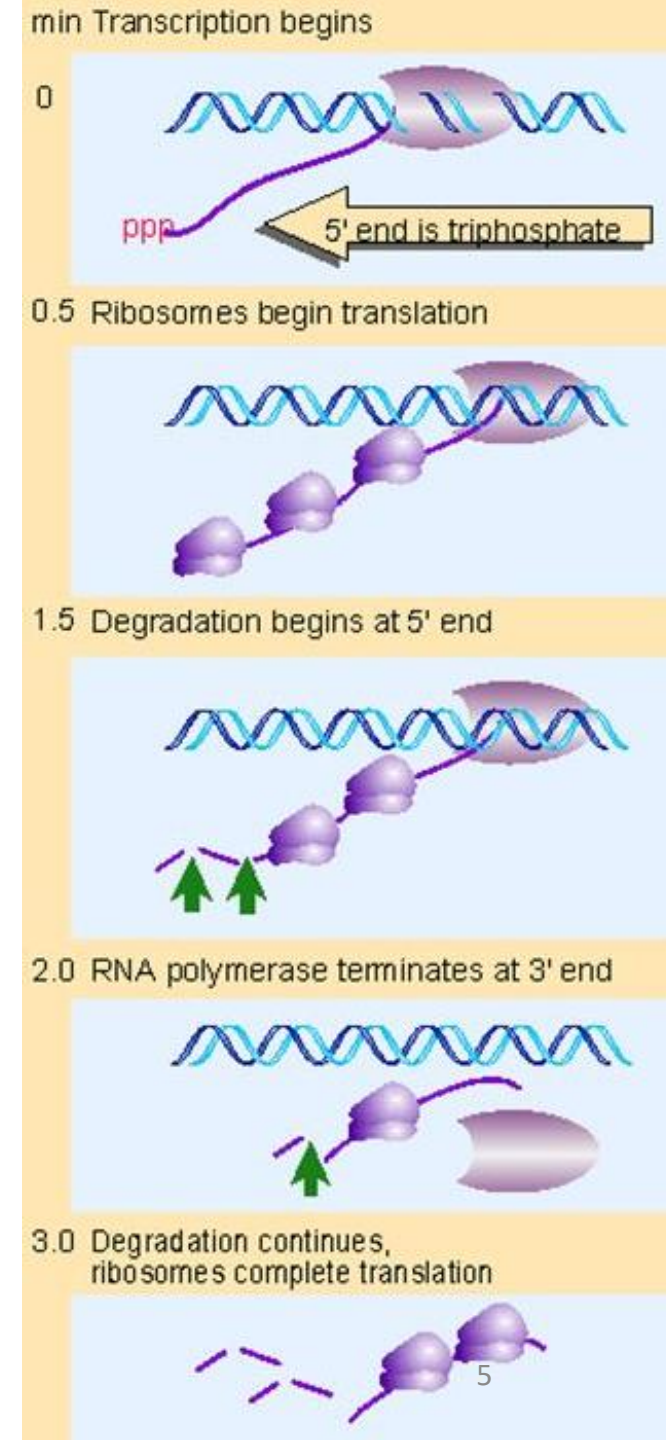
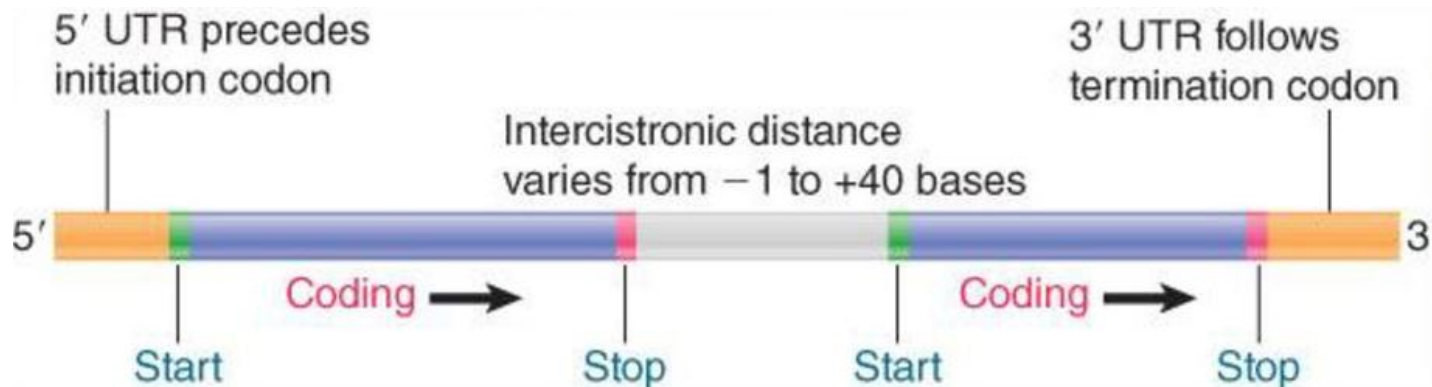
EXPRESSÃO GÊNICA BACTÉRIAS

- Os genes policistrônicos são transcritos em uma única fita, mas a tradução (montagem/ desmontagem dos ribossomos) depende de sinais de início e de parada de cada cístron;



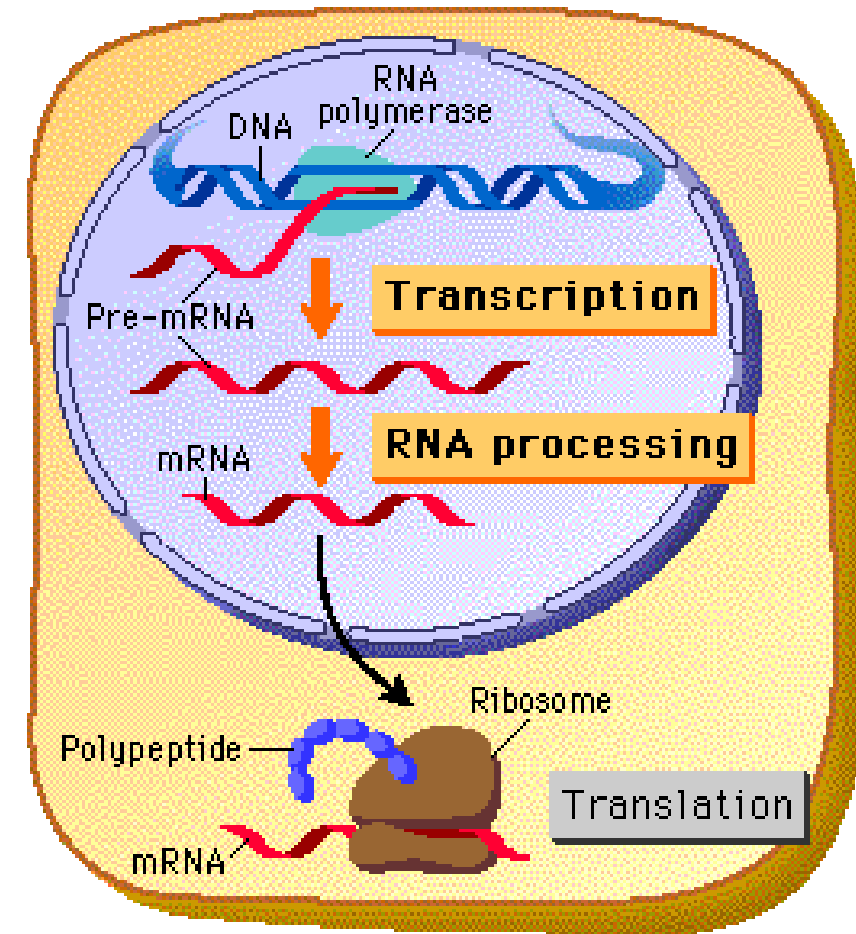
EXPRESSÃO GÊNICA BACTÉRIAS

- A instabilidade dos RNAs na bactéria é alta, a degradação do RNAm tem início logo após o início da tradução;
- Os genes policistrônicos podem ter regiões que modulam esses processos no 5' UTR (leader) ou 3' UTR (trailer), além das sequências entre os cístrons com tamanho variável.



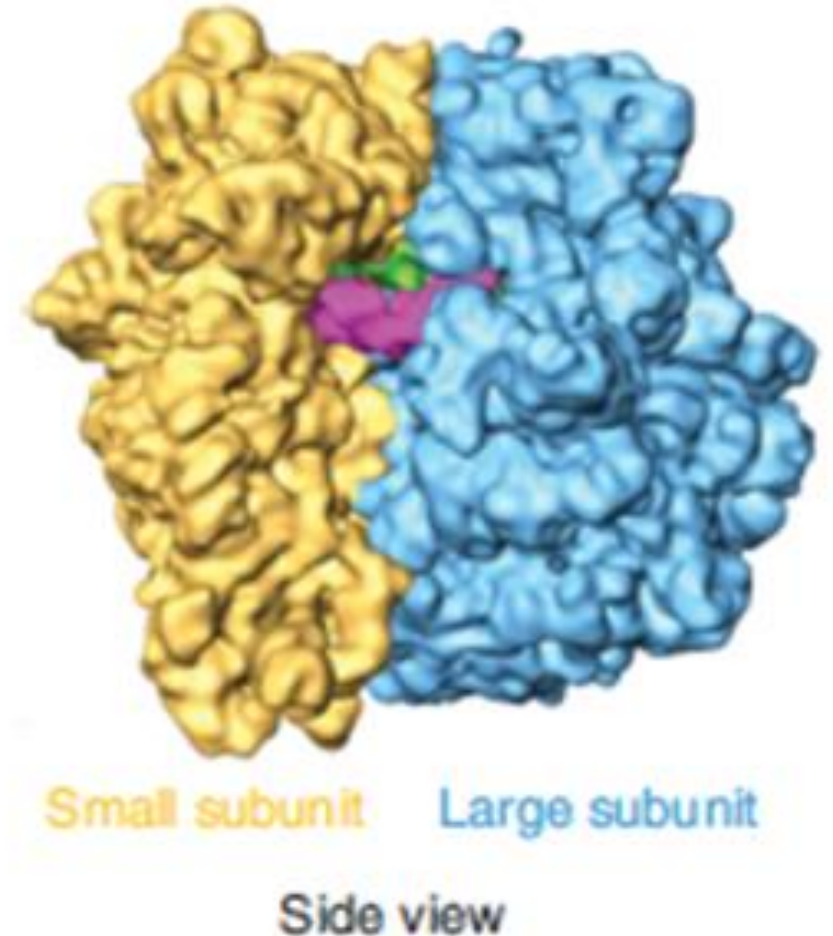
EXPRESSÃO GÊNICA EUCARIOTOS

- Nos eucariotos a transcrição e a tradução são desacopladas;
- No núcleo ocorrem extensas alterações nos RNAs (processamento), antes de serem exportados;
- No citoplasma os RNAs são muito mais estáveis em função das modificações nas regiões não traduzidas das moléculas;
- Tipicamente são traduzidos por várias horas.



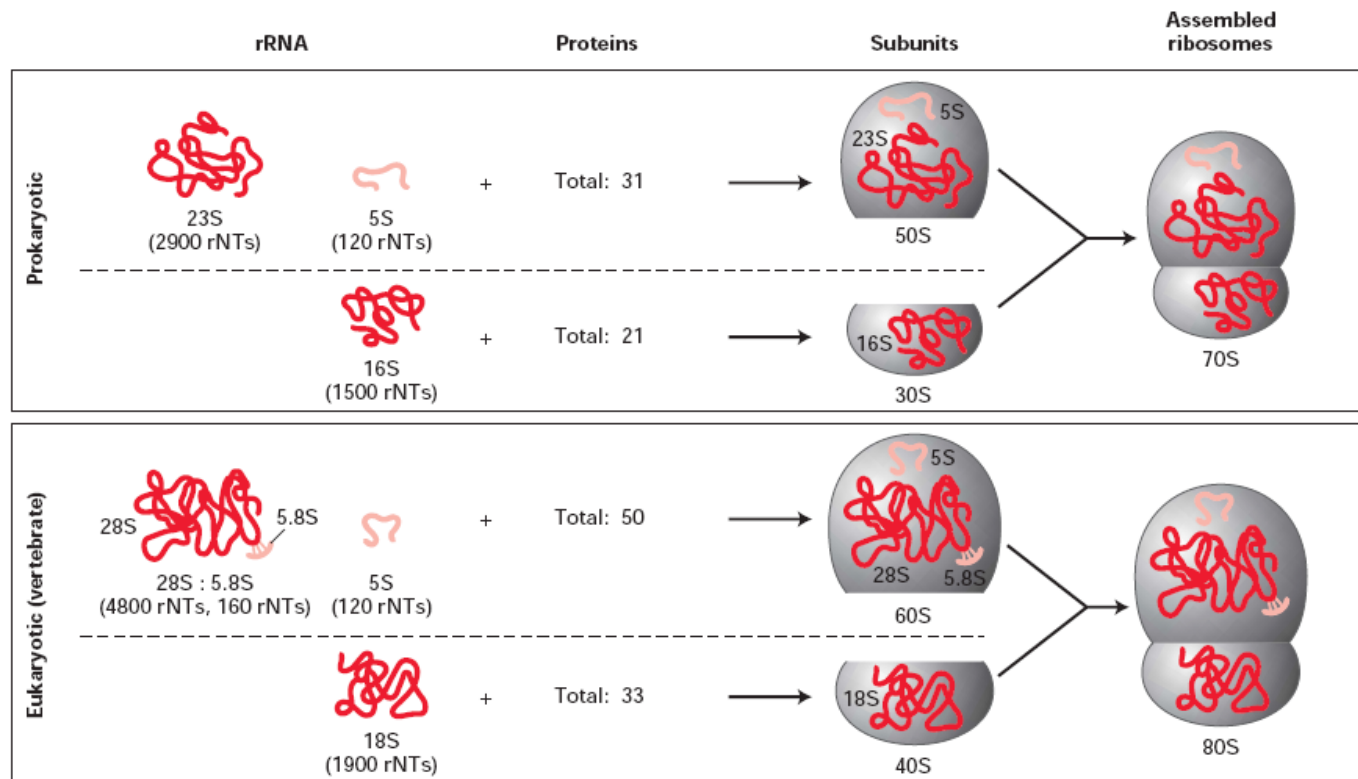
RIBOSSOMO

- Os ribossomos são estruturas supramoleculares (de grandes dimensões);
- Estão presentes em grande número nas células;
- Apresentam poucas diferenças entre os ribossomos de bactérias e eucariotos;
- O ribossomo é uma estrutura bem conservada ao longo da evolução;
- Assim como o processo de tradução.



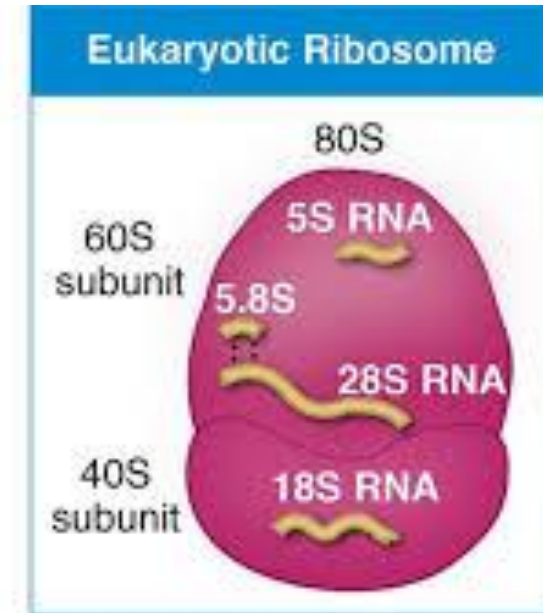
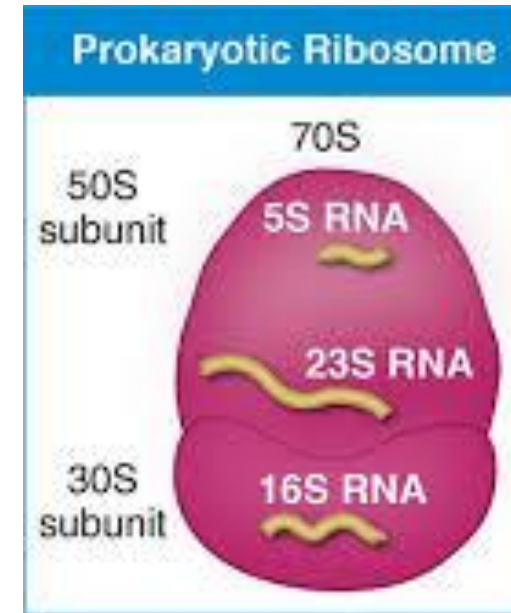
RIBOSSOMO

- Os ribossomos são ribonucleoproteínas (formados por proteínas e RNAs ribossomais) tanto na subunidade maior quanto na subunidade menor;
- Existem ao menos 50 proteínas diferentes nos ribossomos das bactérias e 80 em eucariotos;
- São proteínas pequenas, presentes em cópia única;
- As subunidades encontram-se separadas quando não estão realizando tradução;



RIBOSSOMO

- Além disso, cada subunidade contém uma longa molécula de RNAr e RNAr menores (na subunidade maior);
- Os RNAr são fundamentais não só na estrutura do ribossomo, mas tb desempenham papel ativo no reconhecimento de outros RNAs e nas atividades catalíticas do ribossomo.

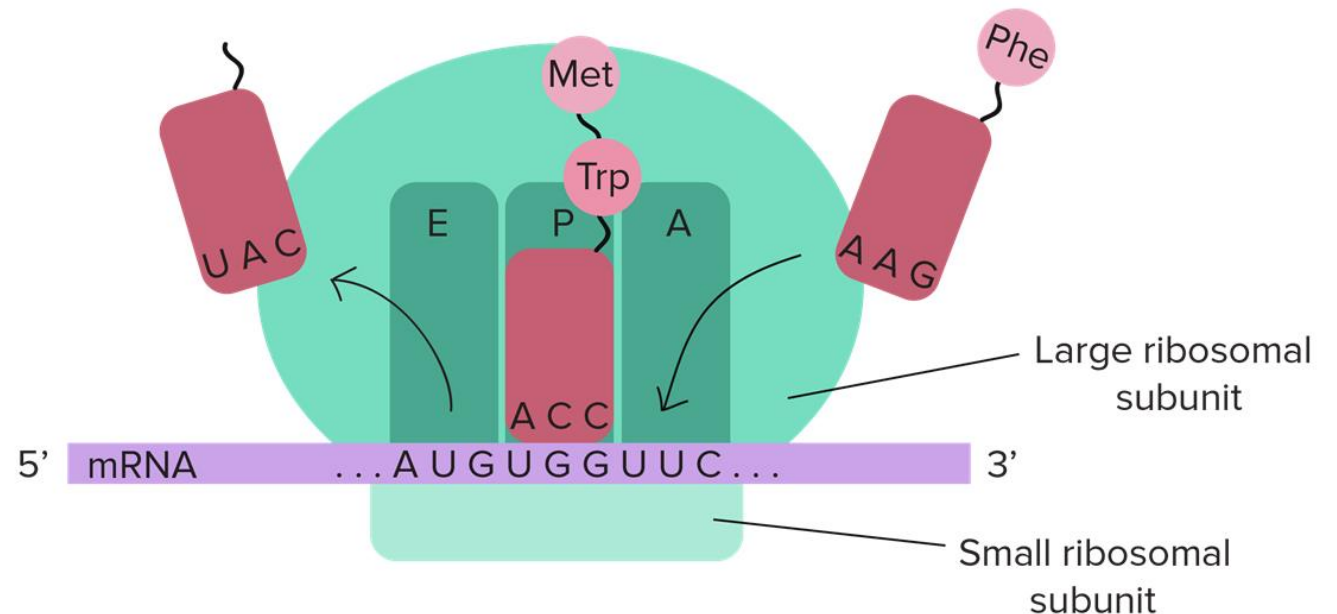


RIBOSSOMO

- As proteínas de cada subunidade provavelmente fazem contato direto com a longa molécula de RNAr de cada subunidade;
- Os ribossomos proporcionam condições necessárias para as várias alterações de conformação de eventos concomitantes durante as etapas da tradução;
- Acomodando as moléculas de RNAm e RNAts de acordo com as especificidades de cada uma das moléculas;
- Nos vários sítios ativos do ribossomo.

RIBOSSOMO

- A região principal do ribossomo é formada na junção das duas subunidades ribossomais, na presença de uma molécula de RNAm;
- Cerca de 35 bases do RNAm estão ligadas no ribossomos durante a tradução;
- Desses quase 10 códons, 2 estão ocupados com moléculas de RNAts ativas;
- Criando dois sítios distintos, sítio A e sítio P, onde a interação entre códon e anticódon do RNAt possibilita a identificação do aminoácido necessário e sua ligação na cadeia polipeptídica.



CÓDIGO GENÉTICO

- O código genético é baseado na correspondência entre uma sequência de 3 nucleotídeos (triplete) do RNAm com um aminoácido;
- A correspondência entre 1 triplete e 1 aminoácido define um **códon**.

		Second letter					
		U	C	A	G		
First letter	U	UUU Phenyl-alanine UUC UUA Leucine UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G	Third letter
	C	CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA Glutamine CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	U C A G	
	A	AUU Isoleucine AUC AUA AUG Methionine; start codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA Lysine AAG	AGU Serine AGC AGA Arginine AGG	U C A G	
	G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	U C A G	

CÓDIGO GENÉTICO

- Formado pela combinação dos 4 nucleotídeos em três posições seguidas;
- Então, existem 64 códons e destes, 61 apresentam um aminoácido correspondente;
- Alguns aminoácidos representados com um códon apenas;
- Por exemplo, o códon **AUG** é o único códon para a **metionina**, denominado **códon iniciador** (*start codon*);
- A metionina em geral é o primeiro aminoácido de uma cadeia polipeptídica tanto de bactéria como de eucarioto;
- E os 3 códons que não correspondem a um aminoácido são denominados **códons de término** (**terminação**) ou parada da tradução (*stop codon*);
- Isso porque sinalizam o término da sequência traduzida.

A	G
UAU TYR	UGU CYS
UAC	UGC
UAA STOP	UGA STOP
UAG	UGG TRP

CÓDIGO GENÉTICO

	U	
U	UUU } Phe UUC }	
	UUA } Leu UUG }	
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	

- Alguns aminoácidos representados por vários códons, **códons sinônimos**;
- Por isso o código genético é denominado **degenerado ou redundante**;
- Então, um aminoácido pode ter mais de um códon; mas, um códon especifica apenas um aminoácido, o código genético **não é ambíguo**;
- Os códons de um aminoácido são semelhantes entre si,
- Isso vale tb para códons de aminoácidos relacionados, o que diminui os efeitos de mutações;
- Uma análise mais detalhada do código genético mostra que a degeneração é clara para a terceira posição do códon.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenyl-alanine UUC	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC	UGU Cysteine UGC	U
		UUA Leucine UUG		UAA Stop codon UAG Stop codon	UGA Stop codon UGG Tryptophan	C
C		CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC	CGU Arginine CGC CGA CGG	U
				CAA Glutamine CAG		C
A		AUU Isoleucine AUC AUA	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC	AGU Serine AGC	U
		AUG Methionine; start codon		AAA Lysine AAG	AGA Arginine AGG	C
G		GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC	GGU Glycine GGC GGA GGG	U
				GAA Glutamic acid GAG		C
						A
						G

CÓDIGO GENÉTICO

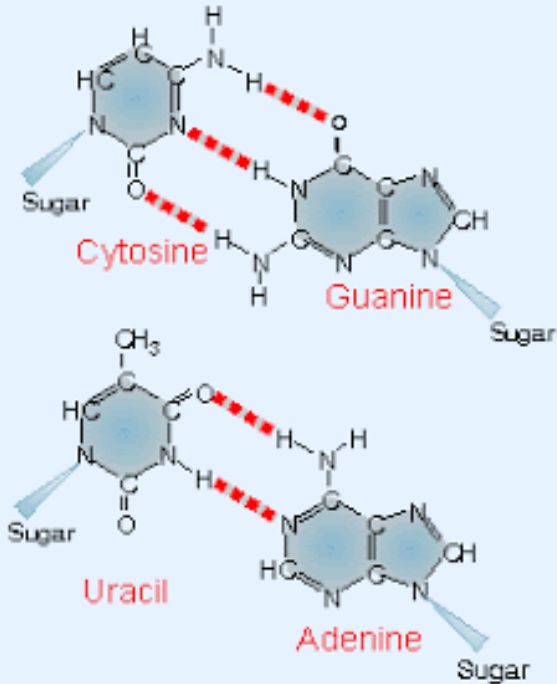
- Então, quanto a variação da última posição dos códons;
- O código genético pode ser agrupado em 3 grupos principais;
- Aas indiferentes para a última posição;
- Aqueles que toleram qualquer pirimidina;
- Aqueles que toleram qualquer purina.

UUU UUC	UCU UCC	UAU UAC	UGU UGC
UUA UUG	UCA UCG	UAA UAG	UGA UGG
CUU CUC CUA CUG	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC CAA CAG	CGU CGC CGA CGG
AUU AUC AUA AUG	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC AAA AAG	AGU AGC AGA AGG
GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC GAA GAG	GGU GGC GGA GGG

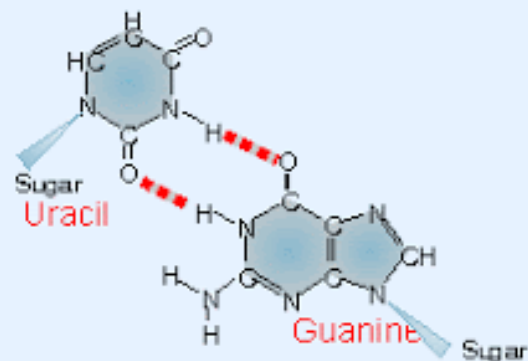
Third base relationship	Third bases with same meaning	Number of codons
 third base irrelevant	U, C, A, G	32
 } purines differ from pyrimidines	U or C	14
 }	A or G	10
 } unique definitions	U, C, A	3
 }	G only	2

CÓDIGO GENÉTICO

Standard base pairs occur at all positions



G-U wobble pairing occurs only at third codon position



- A degeneração da 3ª posição do códon tem implicações no pareamento;
- Se para as 1ª e 2ª posições vale o pareamento “Watson-Cick”;
- na 3ª posição vale as regras de “wobble” (oscilações), onde alguns pareamentos não convencionais são possíveis;
- Essas possibilidades decorrem do fato da 3ª posição do códon no sítio A ser flexível.

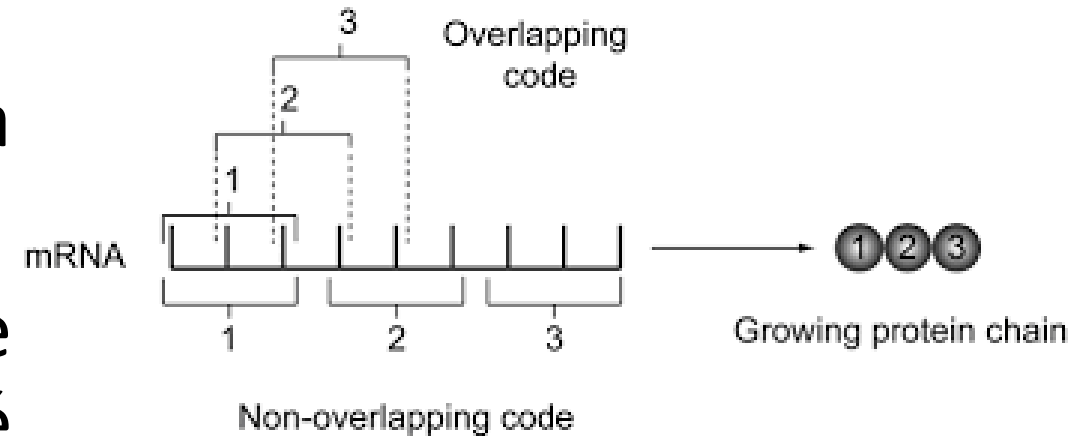
Base in First Position of Anticodon	Base(s) Recognized in Third Position of Codon
-------------------------------------	---

U	A or G
C	G only
A	U only
G	C or U

Anticodon UUG no RNAt da Glutamina reconhece os códons CAA e CAG

CÓDIGO GENÉTICO

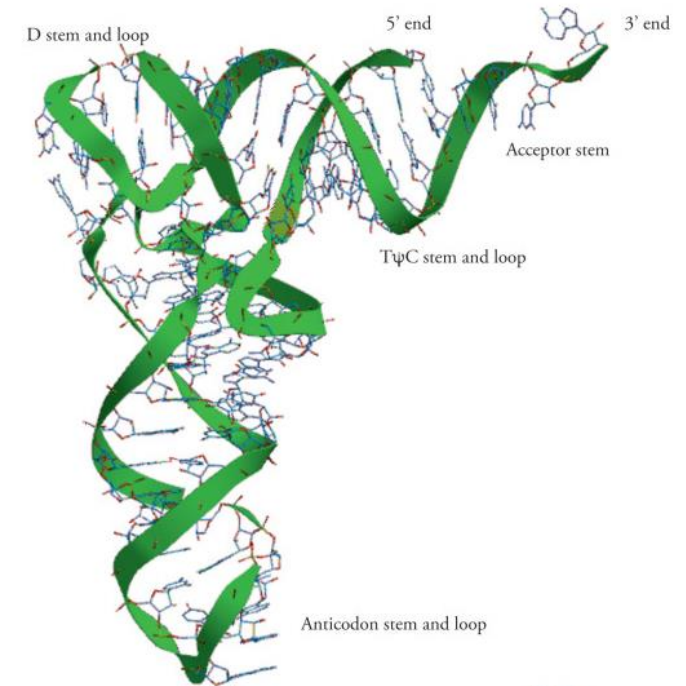
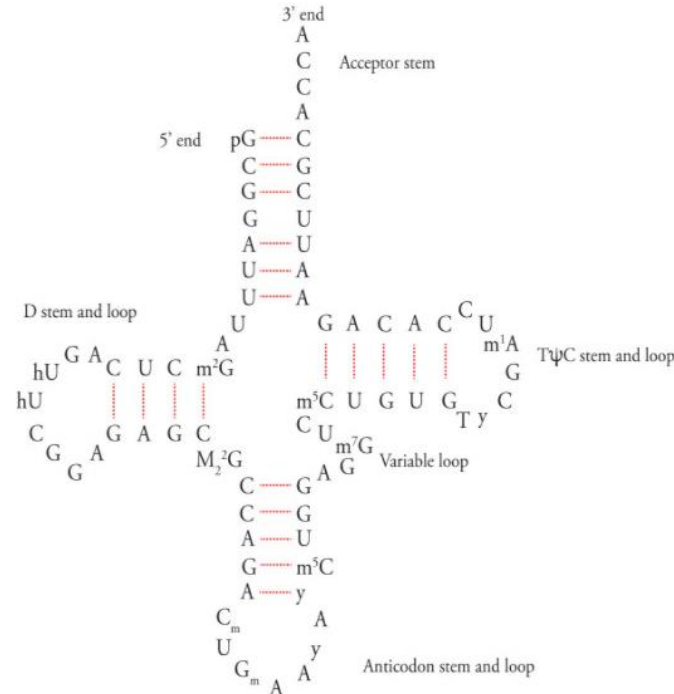
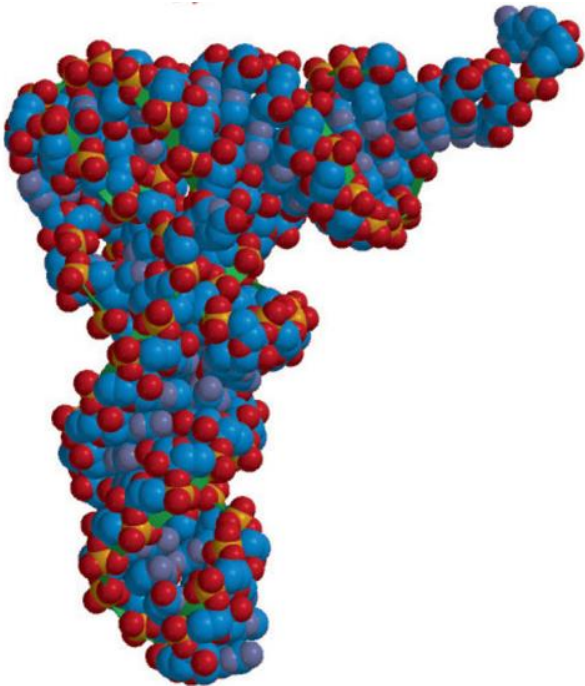
- Os códons não se sobrepõem durante a tradução;
- Existem 3 possibilidades (fases) de leitura, mas apenas uma delas é utilizada;
- Uma característica notável do código é ele ser universal;
- Aplica-se a todos organismos (com raras exceções).



Genome	Codon	Universal Code	Altered Code
Bacterial DNA			
<i>Mycoplasma capricolum</i>	UGA	Stop	Trp
Mitochondrial DNA			
Human	UGA	Stop	Trp
Human	AUA	Ile	Met
Human	AGA, AGG	Arg	Stop
Yeast	UGA	Stop	Trp
Trypanosomes	UGA	Stop	Trp
Plants	CGG	Arg	Trp
Nuclear DNA			
<i>Tetrahymena</i>	UAA	Stop	Gln
<i>Paramecium</i>	UAG	Stop	Gln

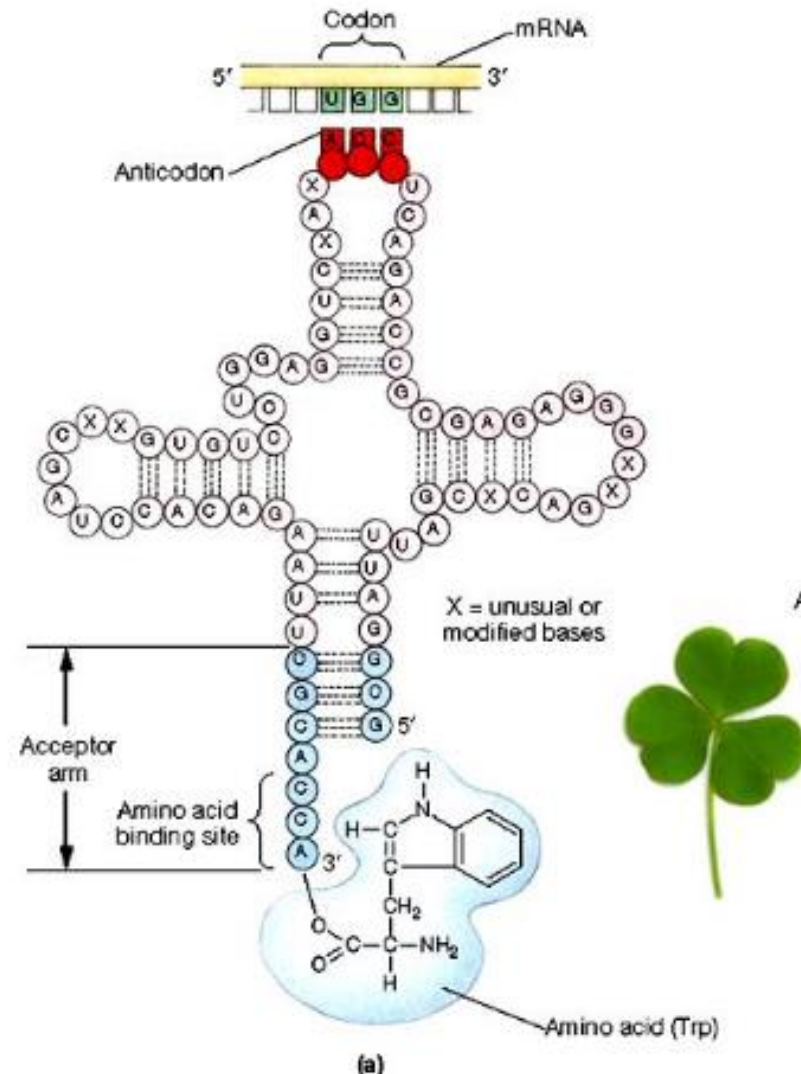
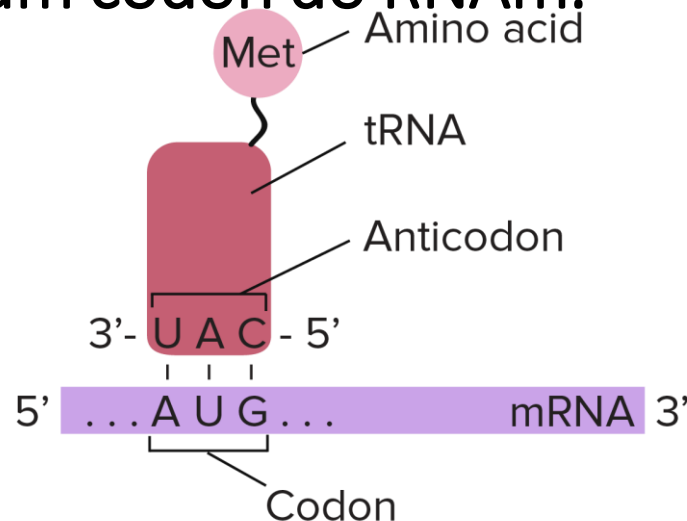
RNA TRANSPORTADOR

- Molécula mediadora da tradução;
- Contém em torno de 70- 90 nucleotídeos;
- Estrutura secundária rica devido ao pareamento intramolecular entre bases complementares;
- Gerando as hastes (regiões pareadas) e as alças (regiões não complementares);
- Conformação típica em L com extremidades da molécula próximas.



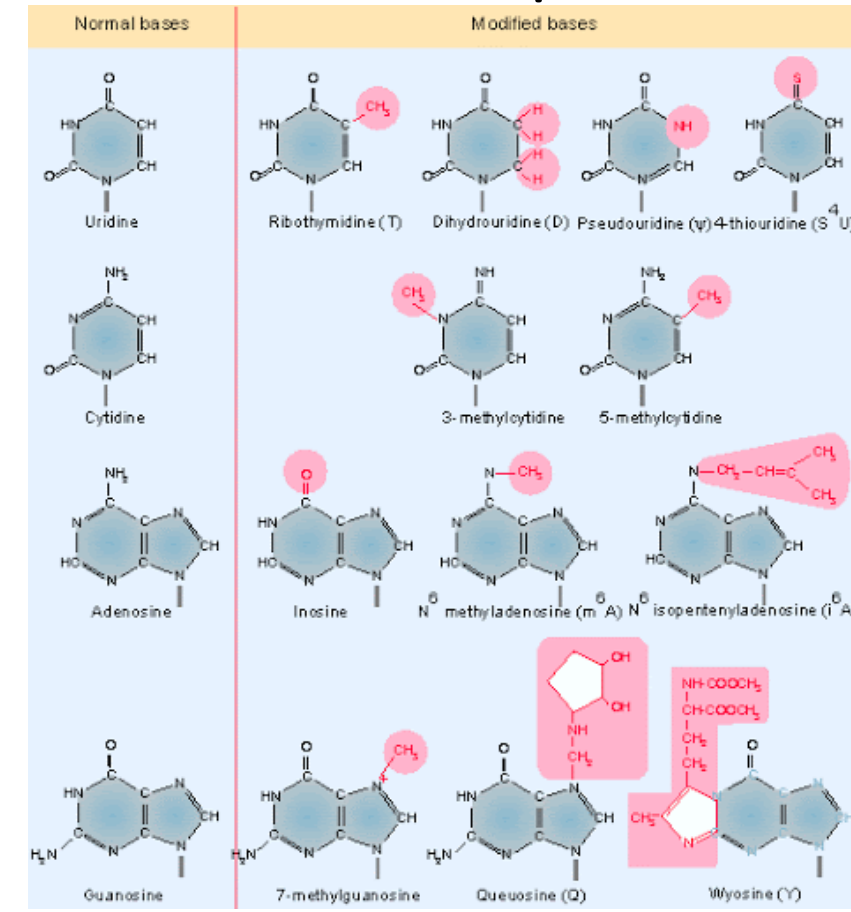
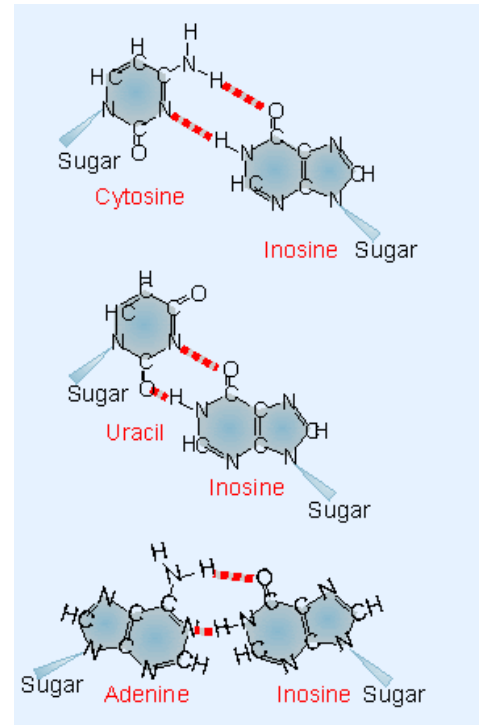
RNA TRANSPORTADOR

- Os aminoácidos se ligam na extremidade 3'da molécula (região aceptora do RNAt);
- Essa região é formada por uma haste (nucleotídeos) pareados e na extremidade 3';
- Existe sequência saliente ACC invariável, onde os aa são ligados;
- No outro lado da molécula, encontra-se uma alça onde se localiza o anticódon;
- Anticódon = sequência de 3 nucleotídeos complementares a um códon do RNAm.

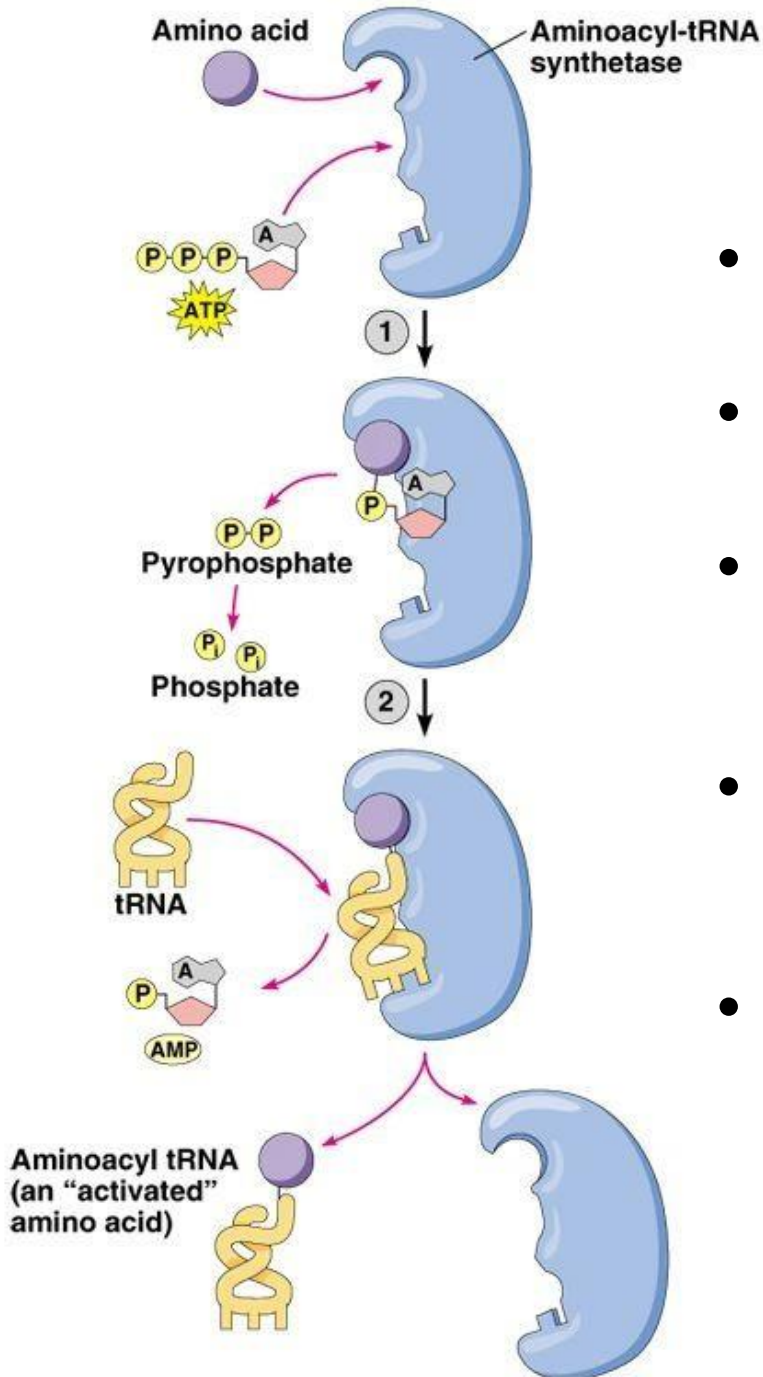


RNA TRANSPORTADOR

- São comuns alterações pós-transcricionais nos RNAs (MODIFICAÇÕES), principalmente nas bases nitrogenadas;
- Mas nos RNAs são diversificadas e extensas (15- 20% da molécula);
- Modificações vão desde metilações até a substituição de uma base por outra (convencional ou não);
- As modificações conferem estabilidade à molécula de RNA, especificidades de reconhecimento no sítio A do ribossomo, além de garantir especificidade de pareamento (por causa das oscilações (*wobbles*)).



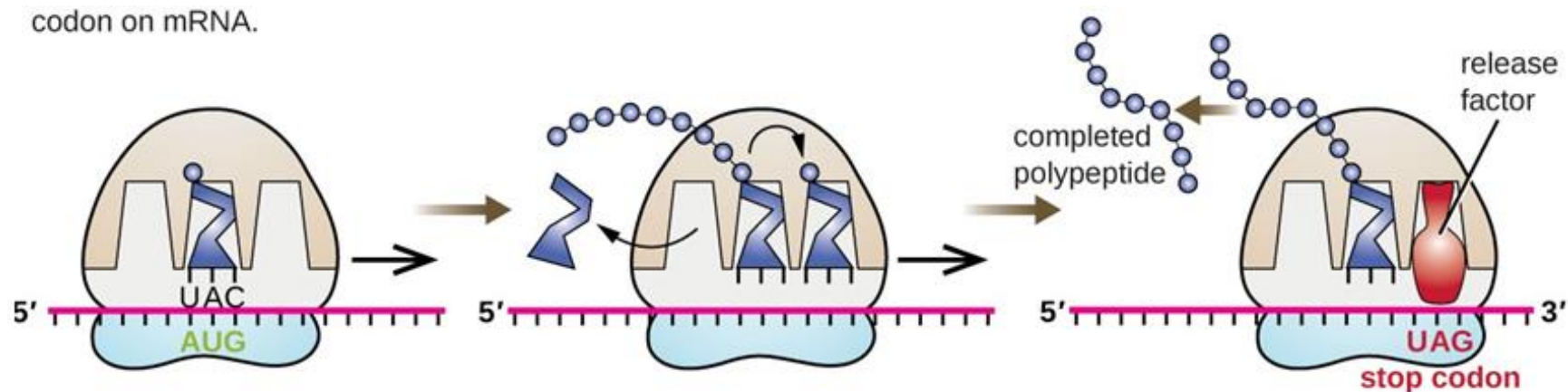
RNA TRANSPORTADOR



- Aminoacyl tRNA sintetases são as enzimas que adicionam um aminoácido no respectivo tRNA;
- Cada aminoacyl tRNA sintetase reconhece um tipo de aminoácido, que pode ter diferentes tRNAs;
- Então, essas enzimas reconhecem **regiões isoacceptoras** de tRNAs para um mesmo aminoácido, gerando **tRNAs cognatos**.
- Essa reação ocorre em duas etapas: 1º ocorre uma reação entre o ATP e o aminoácido e depois ele é unido ao tRNA;
- Quando o tRNA está ligado ao respectivo aminoácido diz-se que ele está **carregado**.

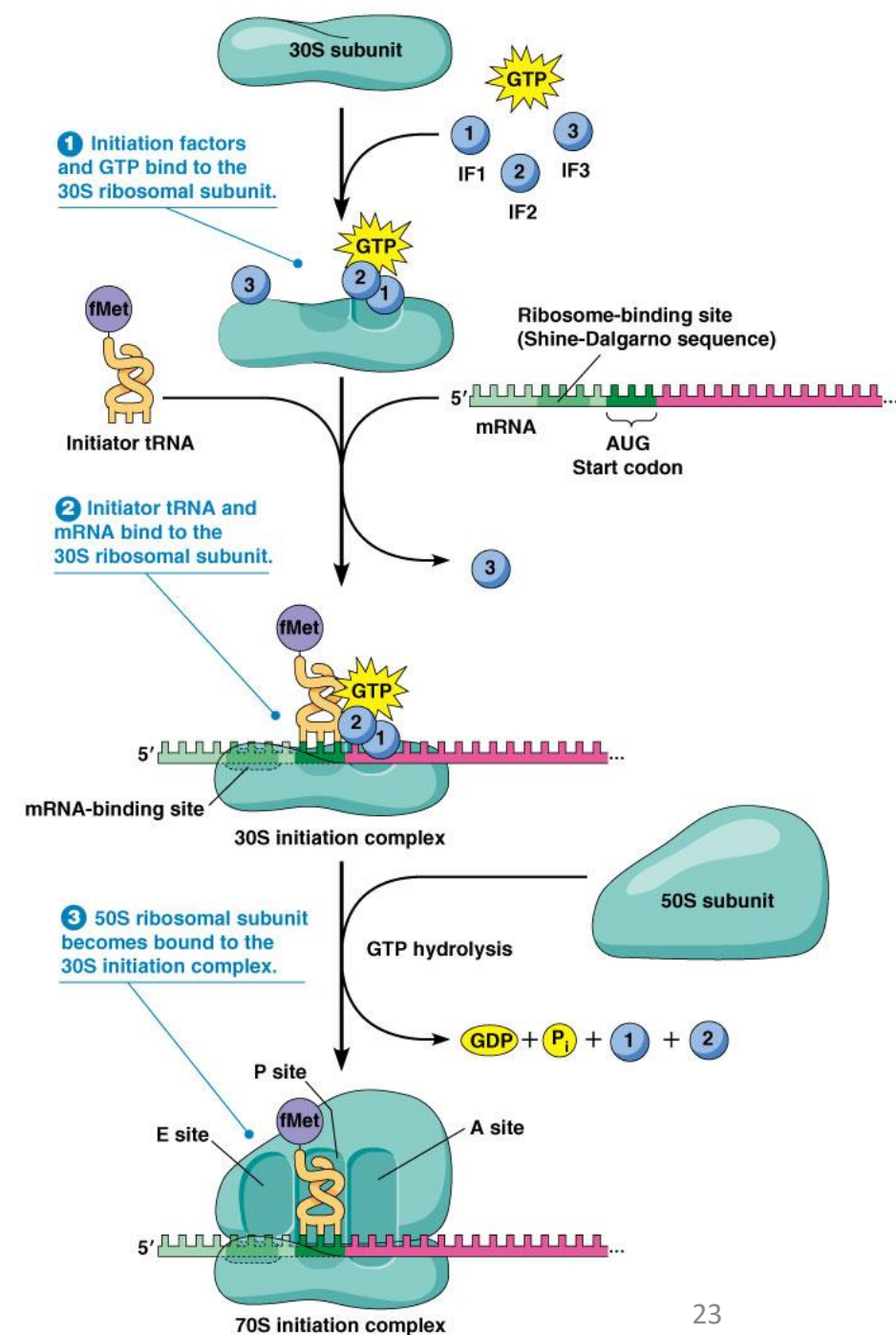
ETAPAS da TRADUÇÃO

- A tradução pode ser dividida em três etapas:
 - INICIAÇÃO – ALONGAMENTO - TERMINAÇÃO
- A iniciação envolve união do RNAm e subunidade menor, ligação do RNAt iniciador e ligação da subunidade maior;
- O alongamento vai da formação da primeira ligação peptídica até a incorporação do último aminoácido;
- A terminação envolve reconhecimento do códon de terminação, e desacoplamento das moléculas envolvidas;
- Em cada uma das etapas da tradução atuam proteínas acessórias que não fazem parte do ribossomo e atuam especificamente em uma única etapa.



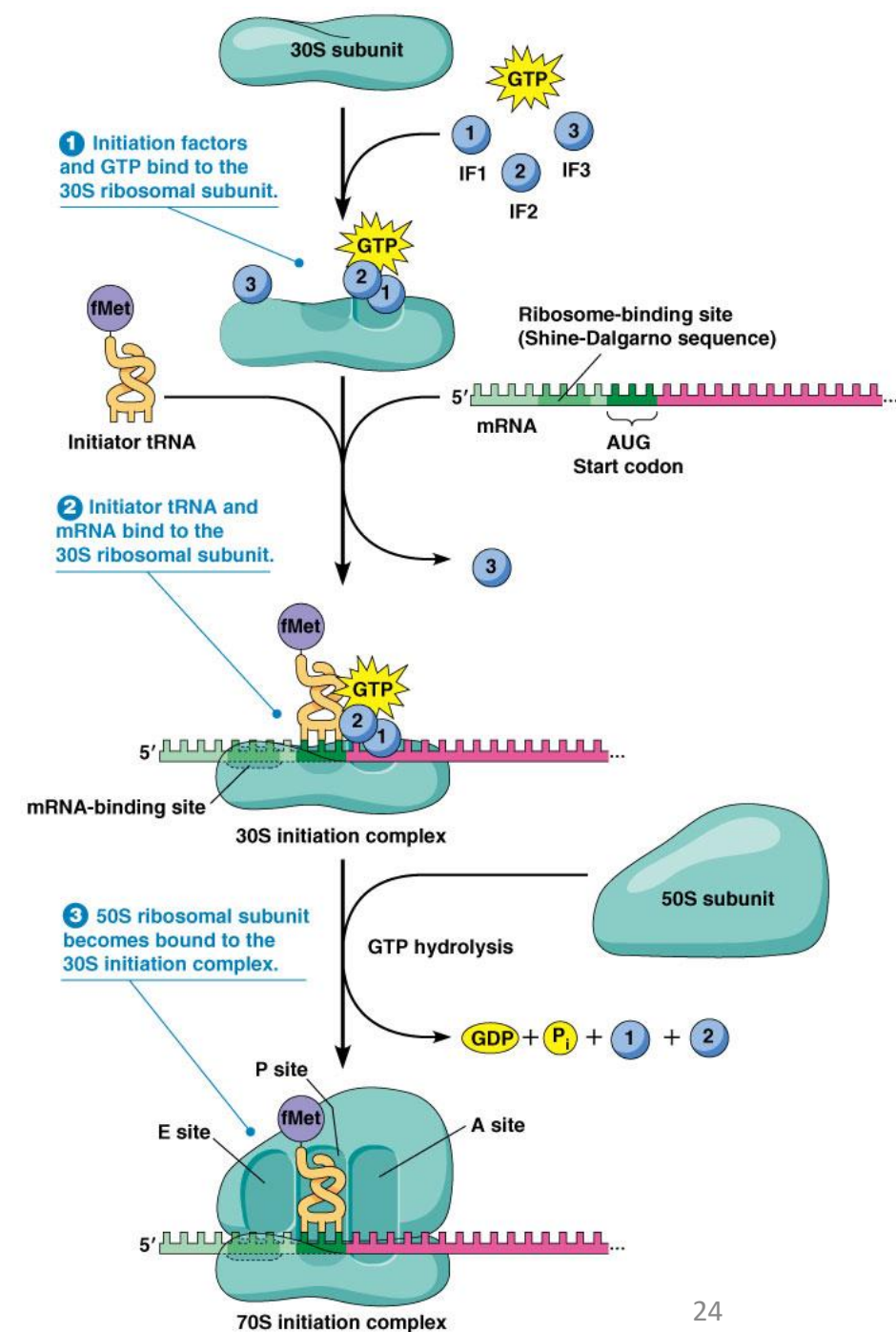
TRADUÇÃO – INICIAÇÃO bactéria

- A iniciação requer que as subunidades ribossomais estejam separadas;
- Para isso atua o fator de iniciação 3 (IF-3) que se liga na subunidade menor (30S) e impede a união do 50S;
- O fator IF-1 provavelmente tb impede a união do 50S e bloqueia o sítio A;



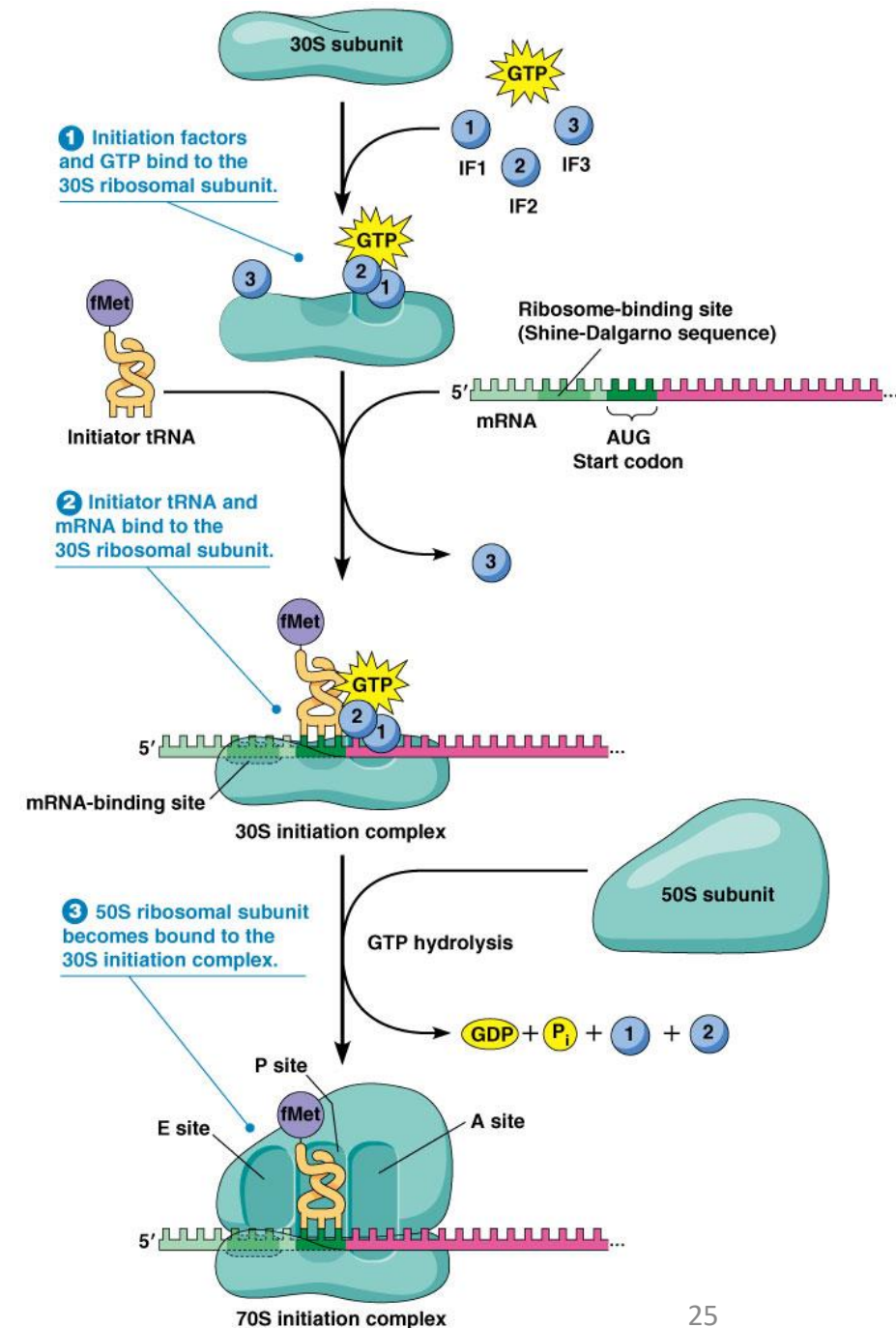
TRADUÇÃO – INICIAÇÃO bactéria

- IF3 também é importante para estabilizar a interação entre o RNAm e o 16S RNAr;
- A sequência de Shine Delgarno (**..AGGAGG...**) presente no 5'UTR do RNAm reconhece seq complementar na extremidade 3' do 16S RNAr;
- Já o fator IF-2 após se ligar à GTP reconhece o RNAt iniciador e o direciona para o sítio P;



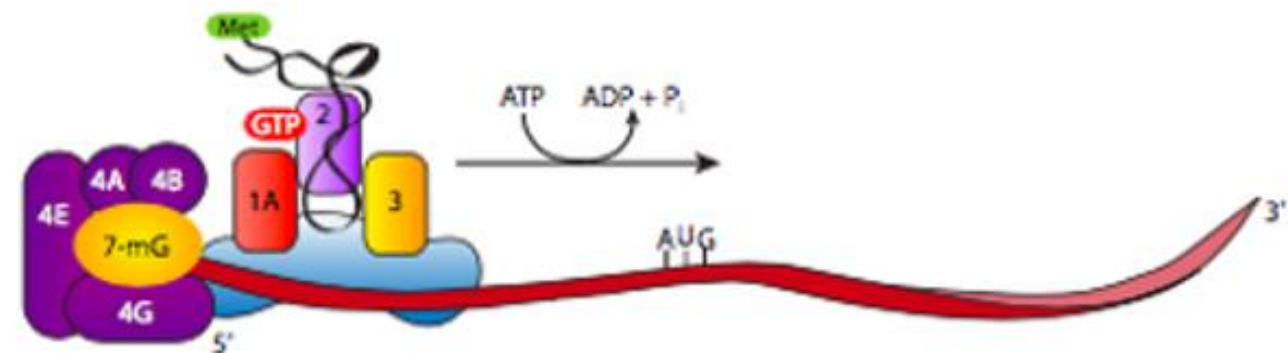
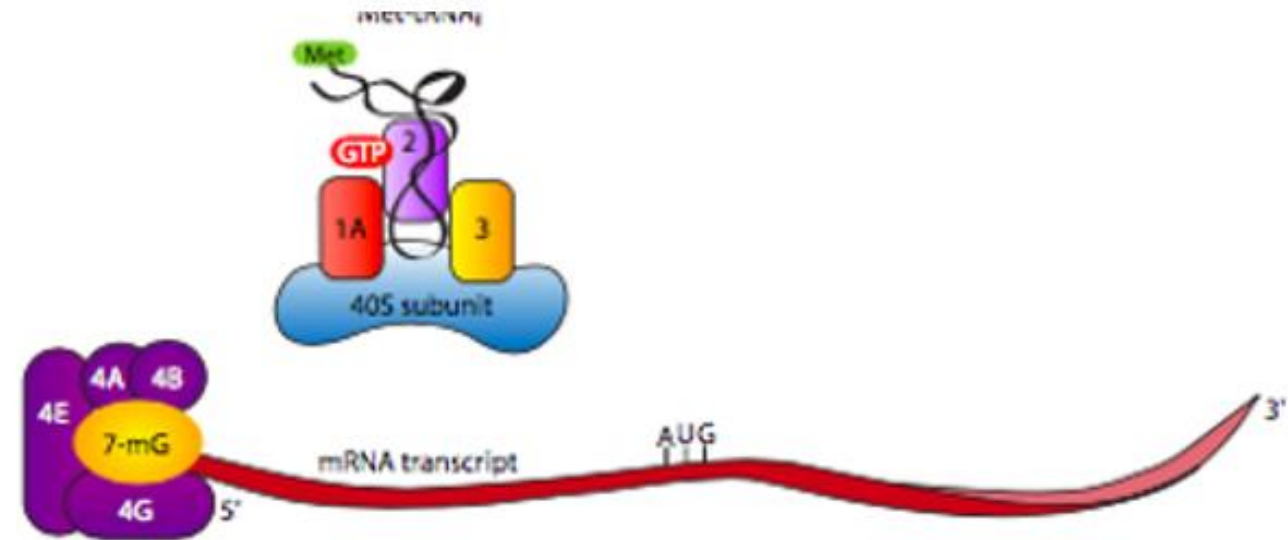
TRADUÇÃO – INICIAÇÃO bactéria

- O RNAt iniciador carrega uma formil-metionina que só é utilizada para iniciar a cadeia no sítio P;
- Em seguida, a subunidade maior interage na região do complexo de iniciação;
- Mas a montagem das subunidades só é estável após a hidrólise de GTP efetuado pela IF-2, que é uma GTPase;
- E a liberação dos IFs do ribossomo.

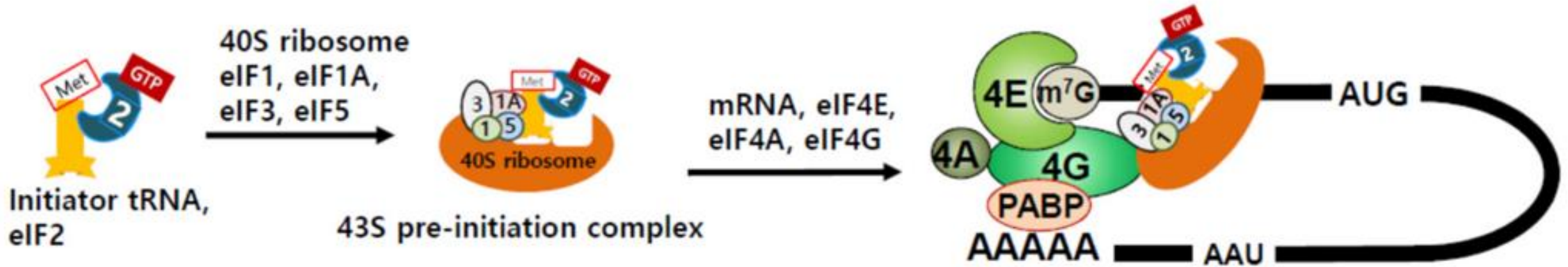


TRADUÇÃO – INICIAÇÃO eucarioto

- Semelhança entre iniciação de bactérias e eucariotos, mas com algumas diferenças;
- Como a ordem dos eventos e o número de eIFs envolvidos (maior em eucariotos ao menos 12 comparados aos 3 de *E coli*);
- Um grupo de eIFs (1, 2 e 3) GTP e RNAt iniciador interage com a subunidade menor;
- Outro grupo de eIFs com a região 5' CAP do RNAm;

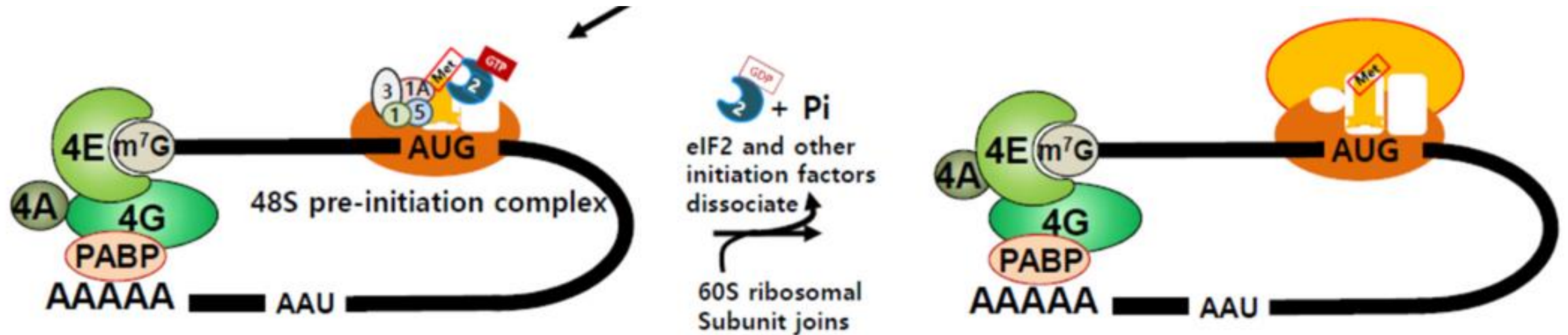


TRADUÇÃO – INICIAÇÃO eucarioto



- A montagem dos fatores do 5' cap também depende da interação dos fatores eIF4 com a PABP ligada na cauda 3' do RNAm;
- O RNAm forma uma alça pela aproximação do 3' na região 5';
- Nessa condição, a subunidade menor do ribossomo (43S) com o complexo de fatores reconhece e se liga com a região 5' do RNAm;

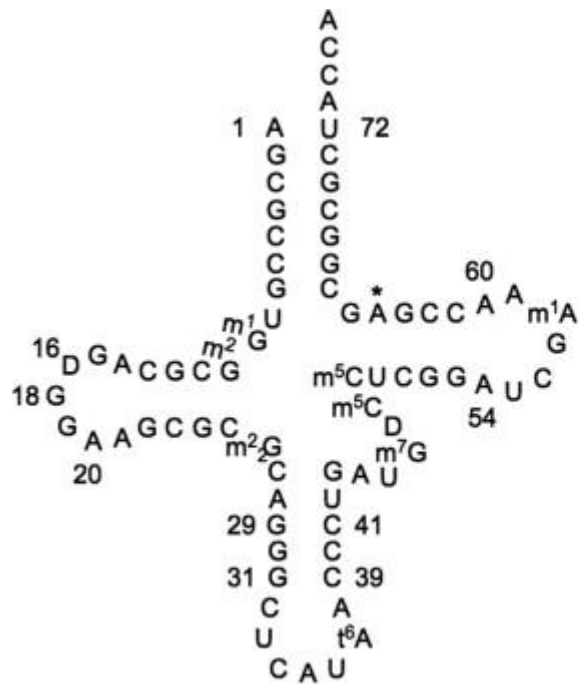
TRADUÇÃO – INICIAÇÃO eucarioto



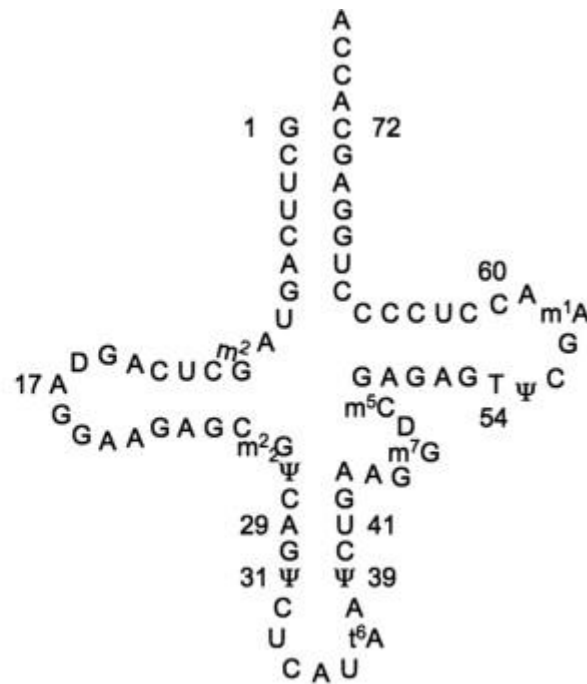
- Com a interação entre o RNAm e a subunidade menor e com gasto de energia;
- O 43S e seus eIFs deslizam no RNAm da extremidade 5' até localizarem o códon iniciador (primeiro códon de metionina), pelo anticódon do RNAt (*scanning*);
- Localizado o códon iniciador, a hidrólise de GTP pelo eIF2, promove a liberação dos eIFs e a junção da subunidade maior (60S).

TRADUÇÃO – INICIAÇÃO eucarioto

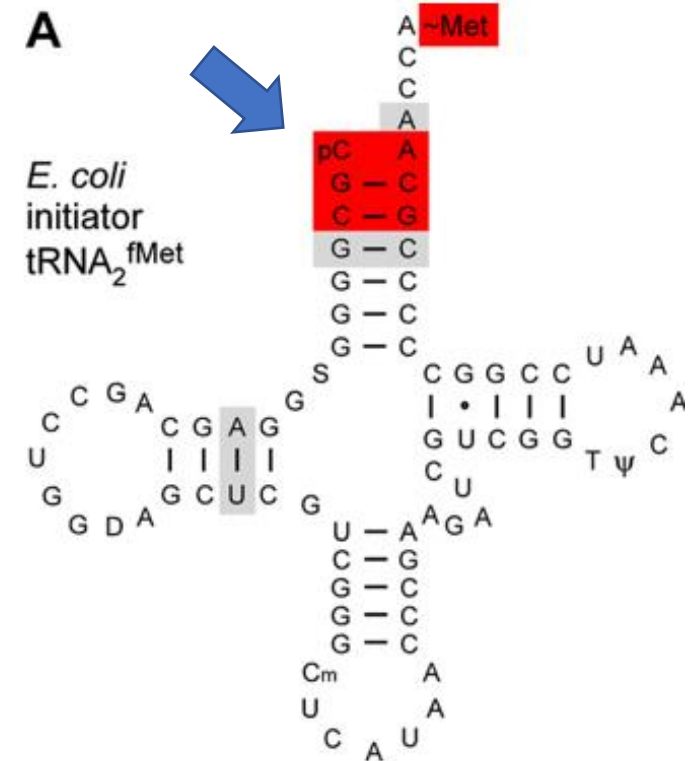
- O RNAt_{MET} iniciador é o códon para metionina AUG que não é formilada (como na bactéria);
- Mas, existe um RNAt estruturalmente diferente que torna possível ele ser o único RNAt a ocupar o sítio P no início do complexo de tradução, diferente do RNAt_{MET} de alongamento.



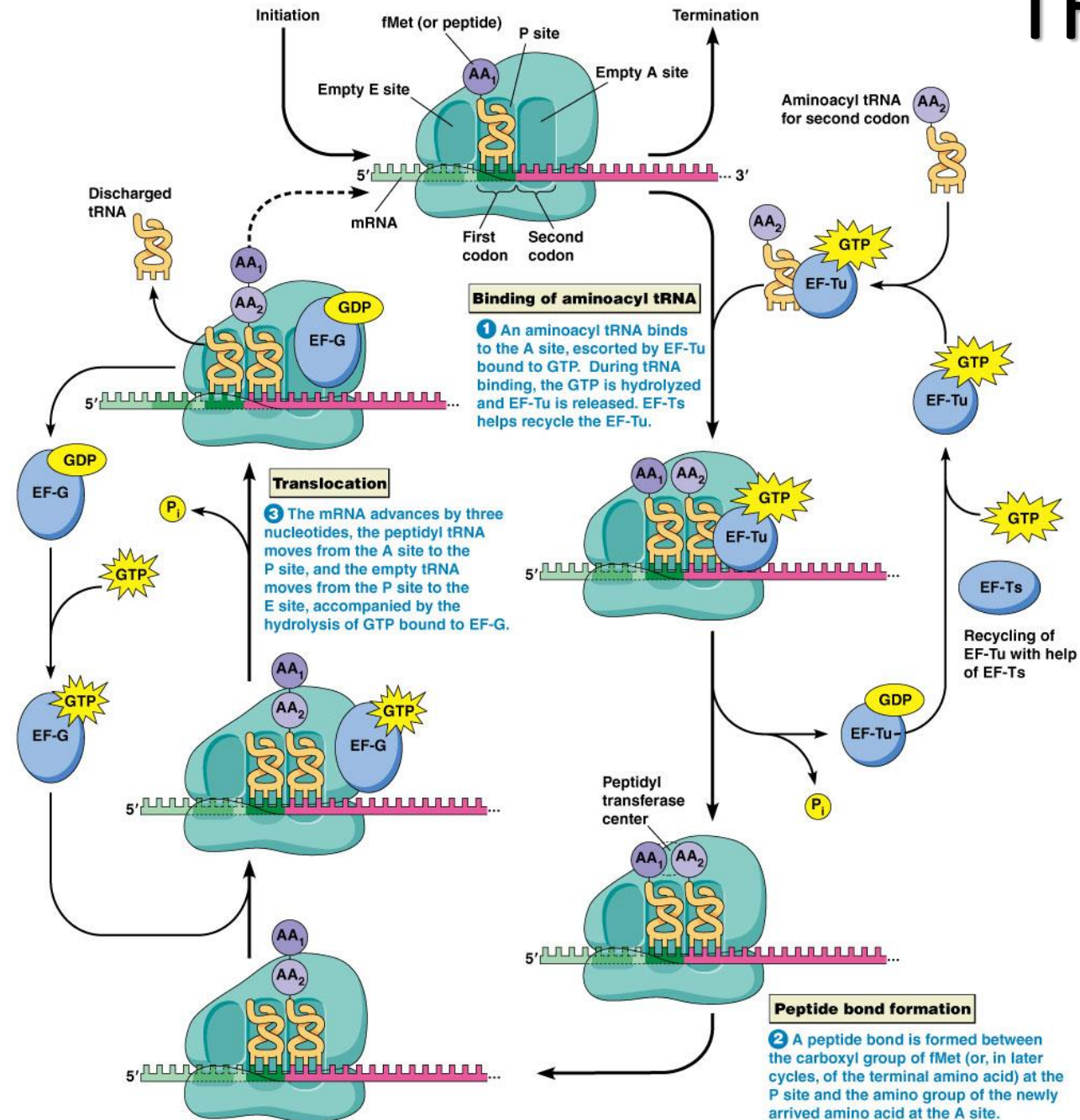
S. cerevisiae initiator tRNA^{Met}



S. cerevisiae elongator tRNA^{Met}



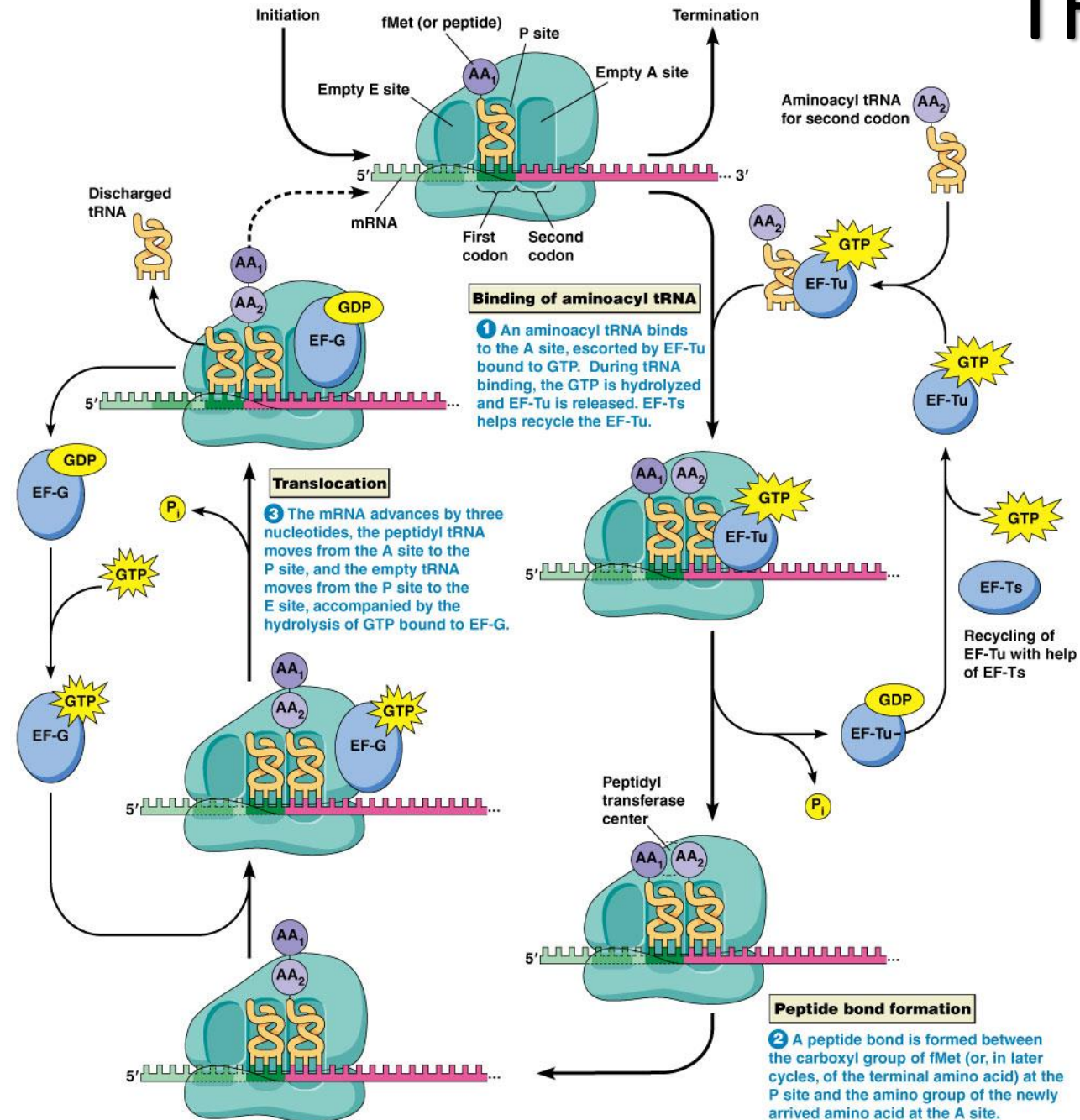
TRADUÇÃO ALONGAMENTO bactéria



- Com a montagem do ribossomo, o sítio P está com Met-RNAt e o sítio A está posicionado no segundo códon e apto a receber um aminoacil-RNAt;
- A entrada do aminoacil-RNAt no sítio A é mediada pelo fator de alongamento Tu (EF-Tu);
- EF-Tu é uma GTPase monomérica que forma um complexo binário com GTP antes de se ligar a um aminoacil-RNAt (gerando um complexo terciário);

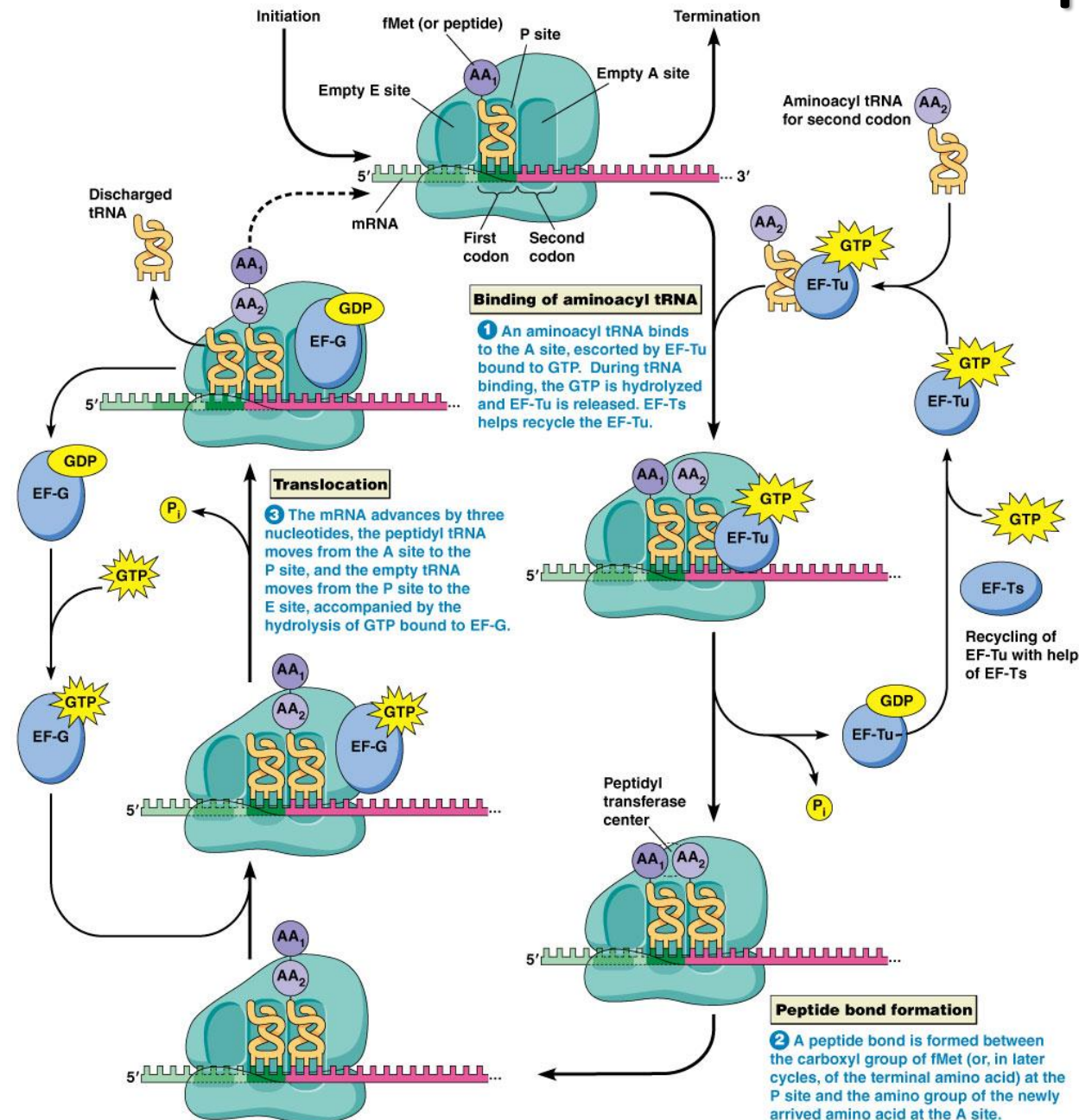
TRADUÇÃO ALONGAMENTO bactéria

- Então, o aminoacil-RNAt EF-Tu GTP pareia com o anticódon no respectivo códon no sítio A da subunidade menor;
- Uma alteração conformacional induz a hidrólise de GTP e a extremidade CCA do RNAt se move e é estabilizada no sítio A da subunidade maior;
- Simultaneamente o complexo binário EF Tu-GDP é liberado e recicla imediatamente.

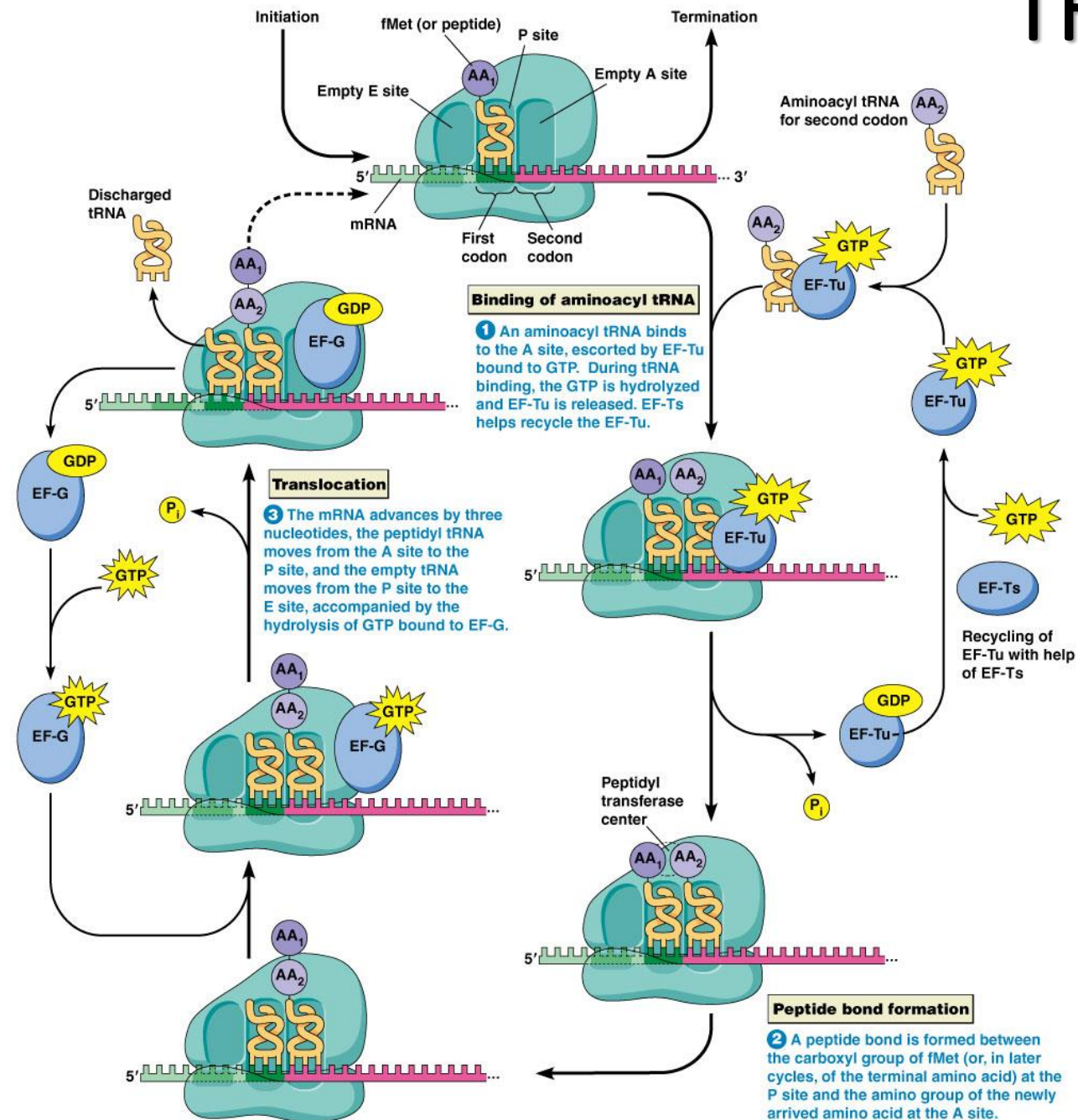


TRADUÇÃO ALONGAMENTO bactéria

- Uma ligação peptídica é formada entre o formil metionina do RNAt iniciador;
- Com o aminoacil RNAt do sítio A, iniciando a cadeia;
- Essa ligação é catalisada pelo RNAr 23S e proteínas da subunidade maior;
- O passo seguinte depende de outro fator de alongamento, EF-G;
- EF-G também é uma GTPase que se liga ao ribossomo depois de ligar GTP;

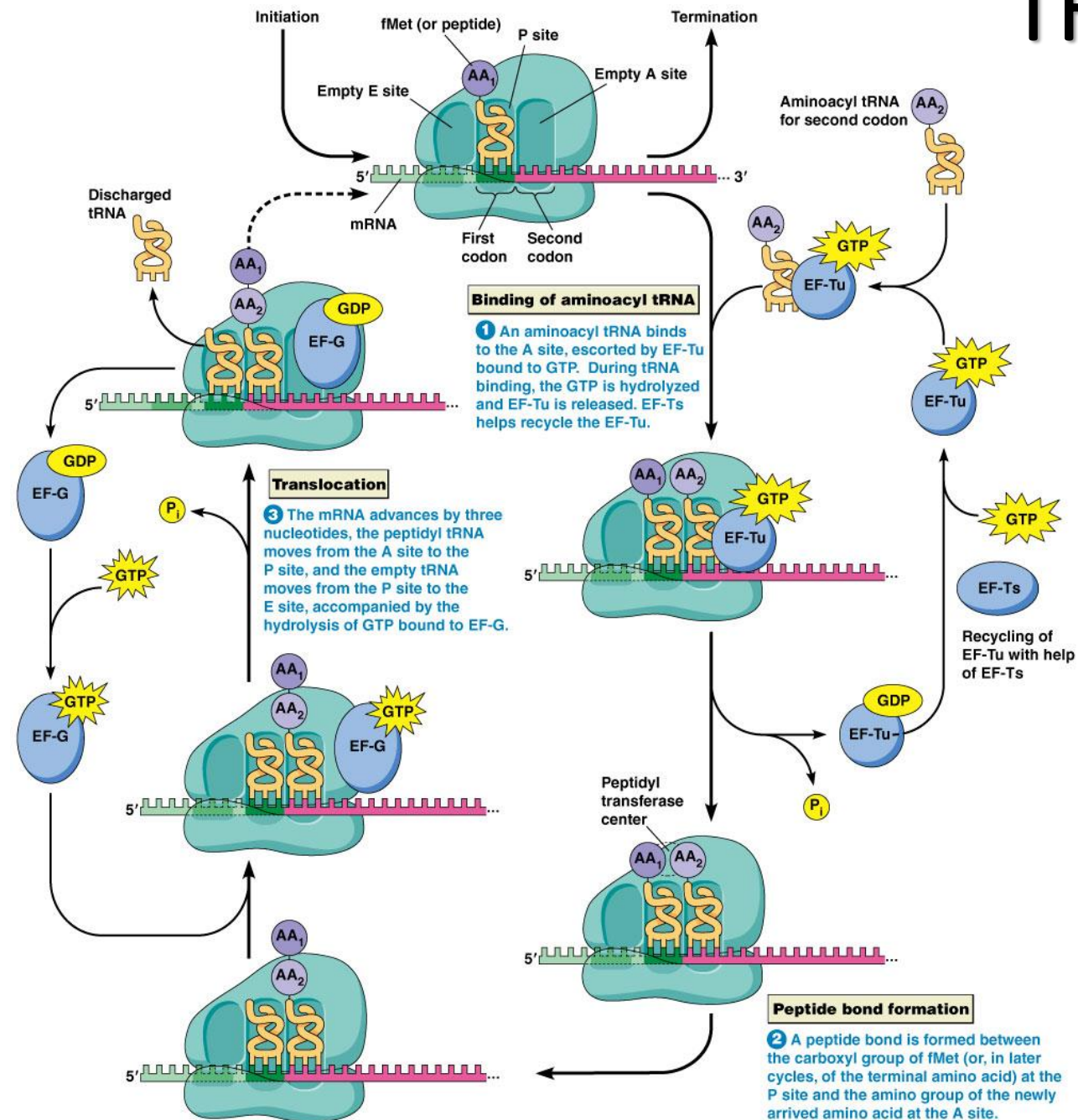


TRADUÇÃO ALONGAMENTO bactéria



- A hidrólise do GTP possibilita a translocação;
- Translocação é o movimento coordenado entre o RNAm e as subunidades ribossomais;
- O movimento de 3 nucleotídeos ocorre por um desligamento temporário das subunidades para mudança de posição;

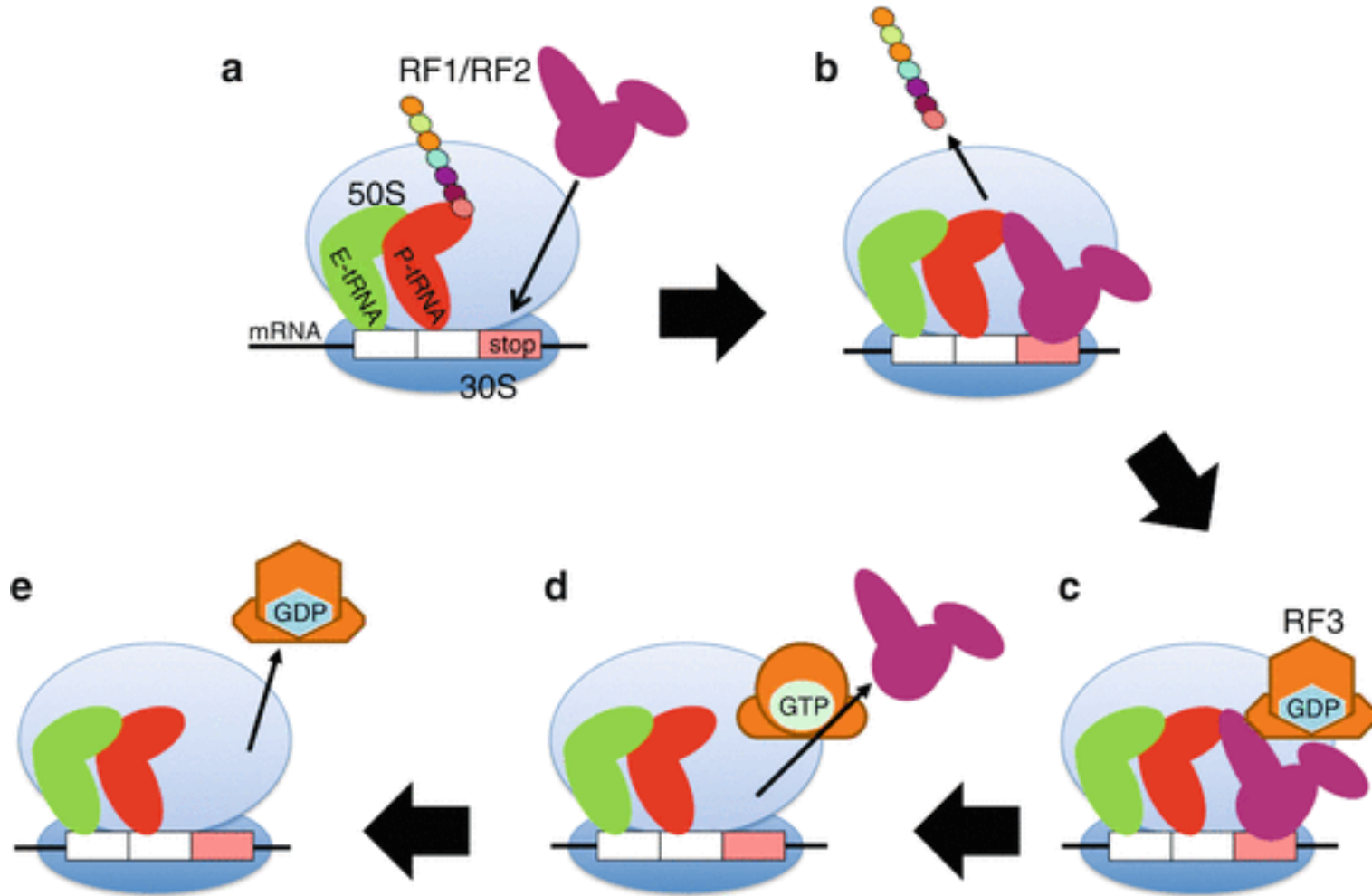
TRADUÇÃO ALONGAMENTO bactéria



- O peptil- RNAt passa a ocupar o sítio P e o sítio A fica vago;
- EF-G GDP é desligado do ribossomo;
- O RNAt que descarregou seu aminoácido deixa o ribossomo pelo sítio E;
- Processo muito semelhante nos eucariotos.

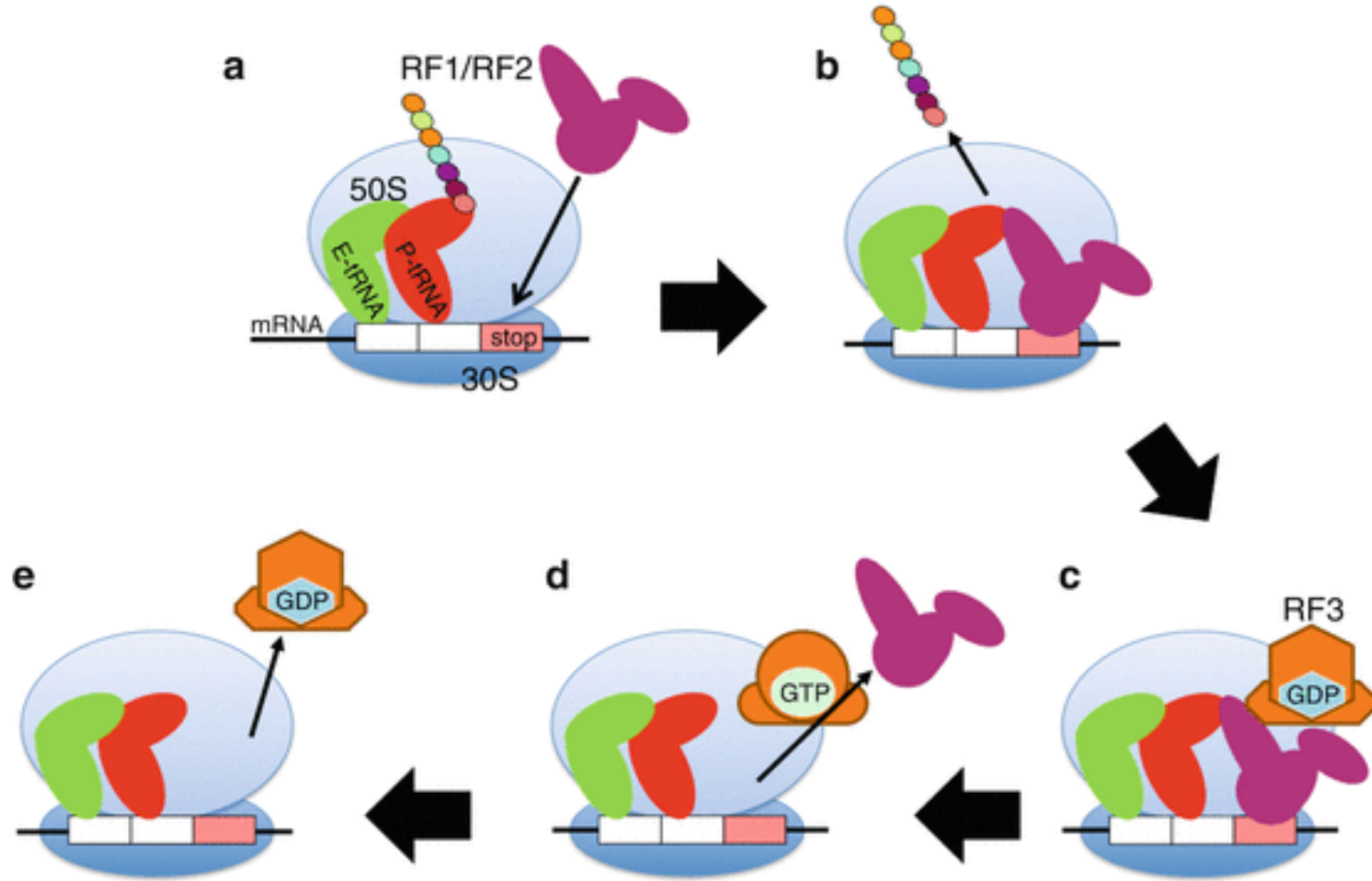
TRADUÇÃO TERMINAÇÃO bactéria

- Quando o sítio A é ocupado por um códon de terminação, não existe nenhum RNAt com anticódon correspondente;
- Esse sítio é ocupado ou pelo fator de terminação RF-1 ou RF-2, dependendo do códon de terminação;
- RF1 e RF-2 são assistidos por RF-3 também presente no sítio A;



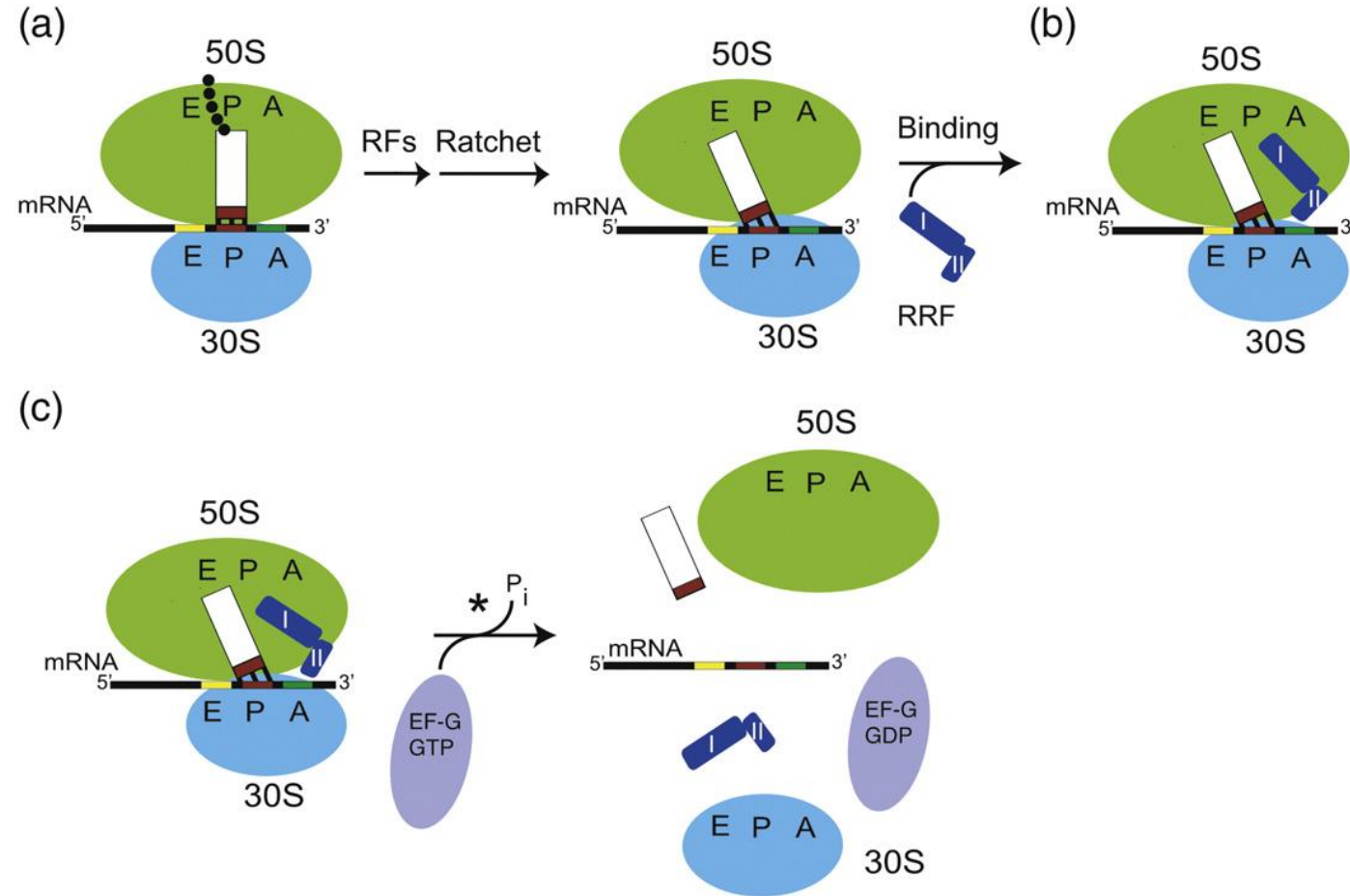
TRADUÇÃO TERMINAÇÃO bactéria

- A ligação desses fatores desencadeia a reação de terminação conduzida pelo 23S RNAr que cliva o peptídeo do último RNAt, liberando a cadeia;
- RF-3 que é uma GTP-ase, ao hidrolisar GTP libera os RFs do ribossomo.



TRADUÇÃO TERMINAÇÃO bactéria

- A desmontagem das subunidades, liberação do RNAt e do RNAm é realizada em um segundo estágio, com a participação do fator de reciclagem do ribossomo (RRF);
- RRF tb é uma GTPase
- Em eucariotos, essa etapa tb é muito semelhante, mas com um apenas um RF reconhecendo os 3 códons de terminação.



ACURÁCIA da TRADUÇÃO

- Erro na tradução pode ocorrer em momentos diferentes, mas existem mecanismos de reparo que checam a acurácia nessas etapas;
- Então, erros são pouco frequentes;
- Além disso, o fato de várias cópias serem sintetizadas;
- Torna o risco de erros na tradução gerarem problemas na célula, desprezível;
- O maior risco na tradução na verdade seria consequência de um erro da transcrição,
- Pelo fato do RNAm servir de molde para síntese de várias moléculas de proteína;
- Mas a taxa de erro aí tb é muito baixa; pelos vários mecanismos de checagem e reparo.

