

Tradução e modificação de proteínas

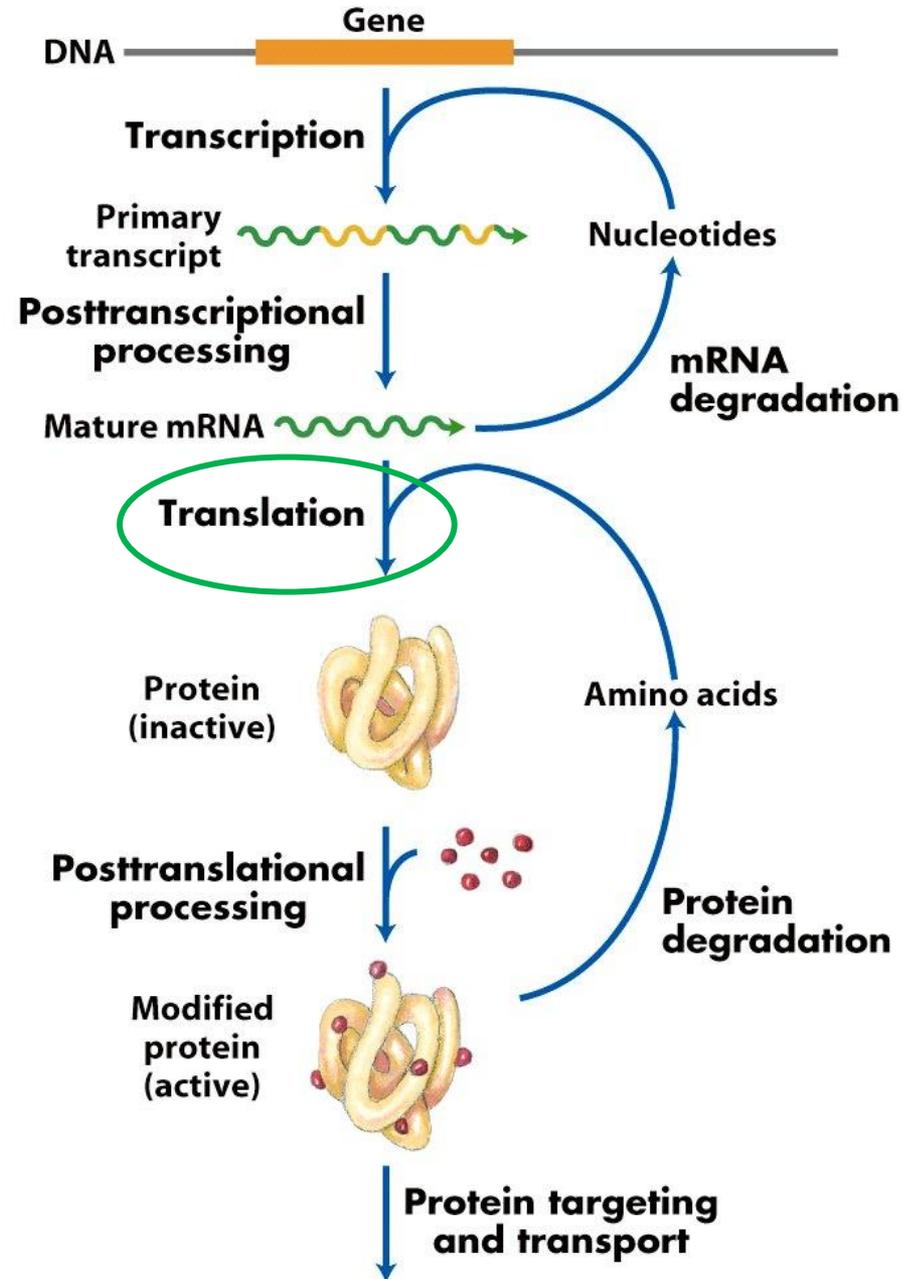
Prof. Eduardo Moraes Rego Reis
Instituto de Química – USP

QBQ1354 – Biologia Molecular

O fluxo da informação gênica depende da tradução para que proteínas possam ser sintetizadas e exercer sua função

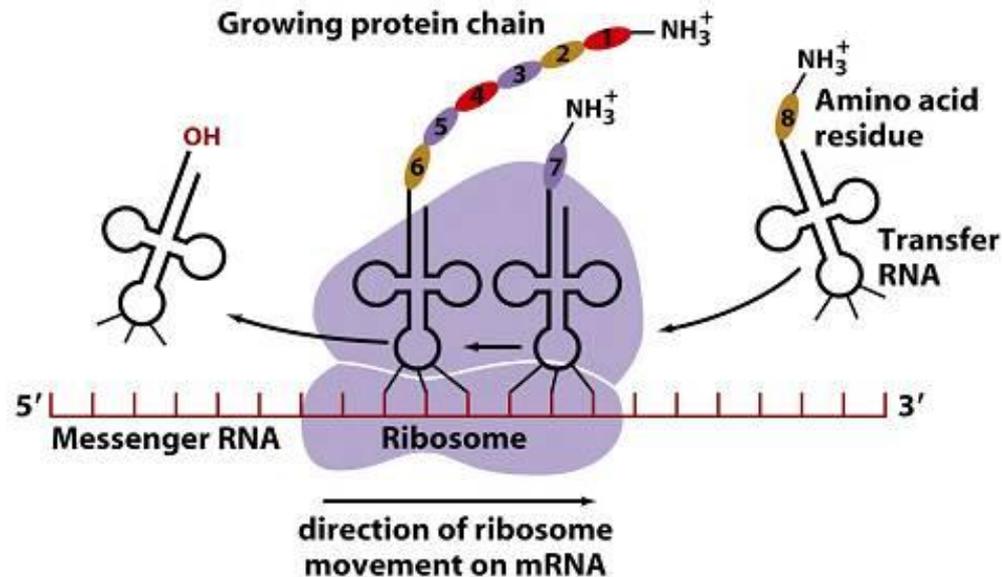
Ex:

- enzimas
- transportadores
- receptores
- anticorpos
- citoesqueleto



Tradução

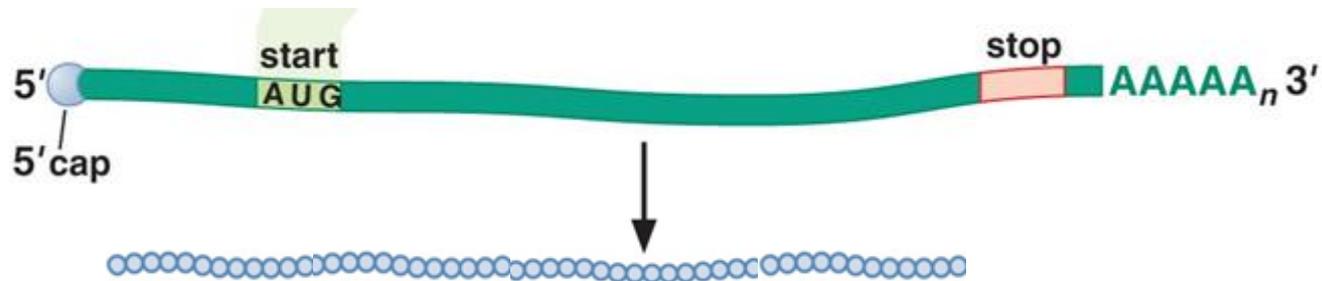
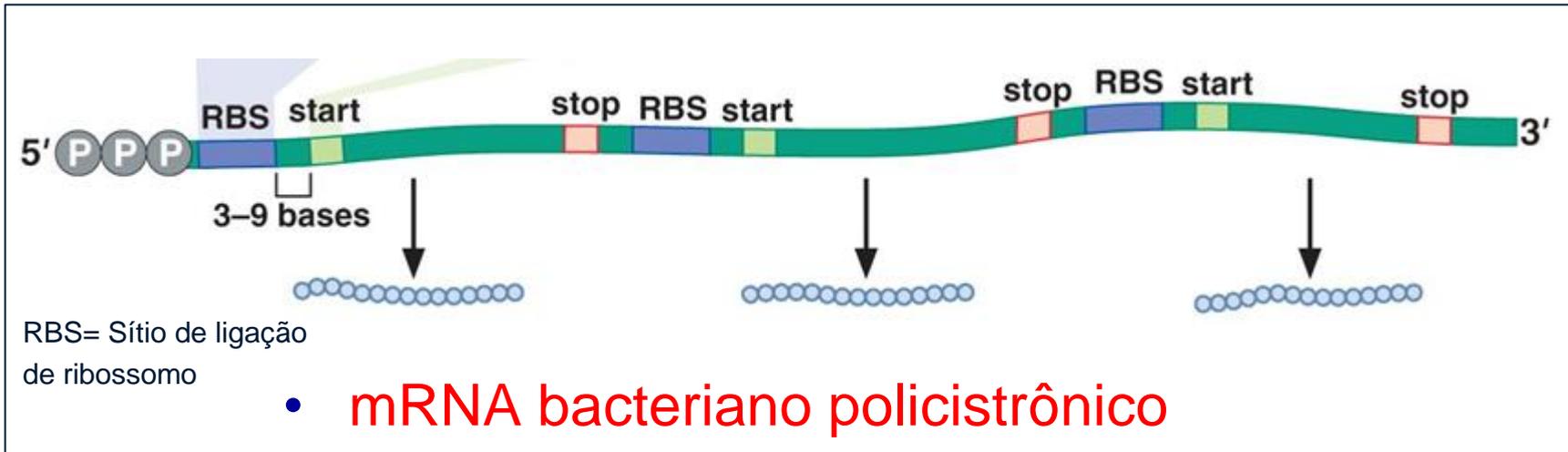
- Acontece nos **ribossomos**, que são grandes complexos de proteína e rRNA
 - citoplasma de eucariotos
 - catalisam a formação da ligação peptídica
- **mRNA** contém a mensagem, que é “lida” pelos **aminoacil-tRNAs**
- a mensagem é lida em trincas: **códon** no mRNA pareia com **anticódon** do tRNA



Quem participa da tradução?

- mRNA
- Ribossomos
- Aminoacil-tRNAs
- Fatores de tradução: proteínas com funções específicas em cada etapa do processo

Elementos estruturais de mRNAs necessários para a tradução

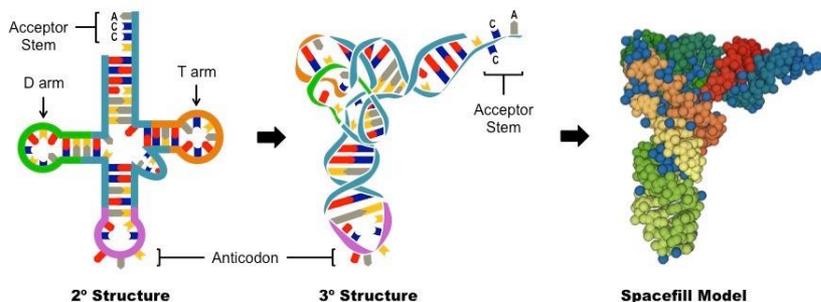
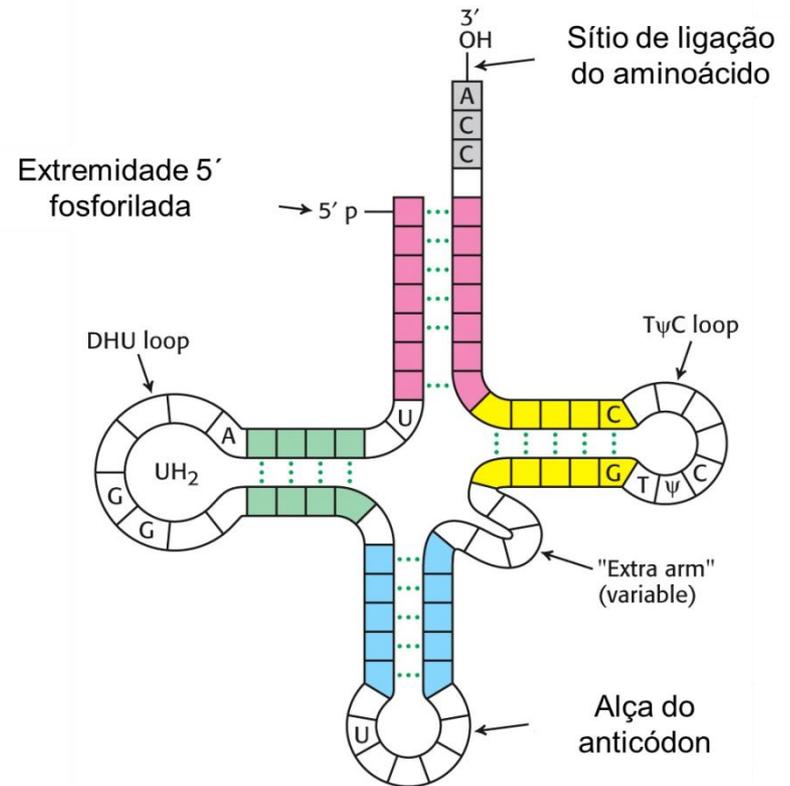


- mRNA eucariotico maduro

Modificações importantes para a tradução: sem introns, com CAP e com poli-A

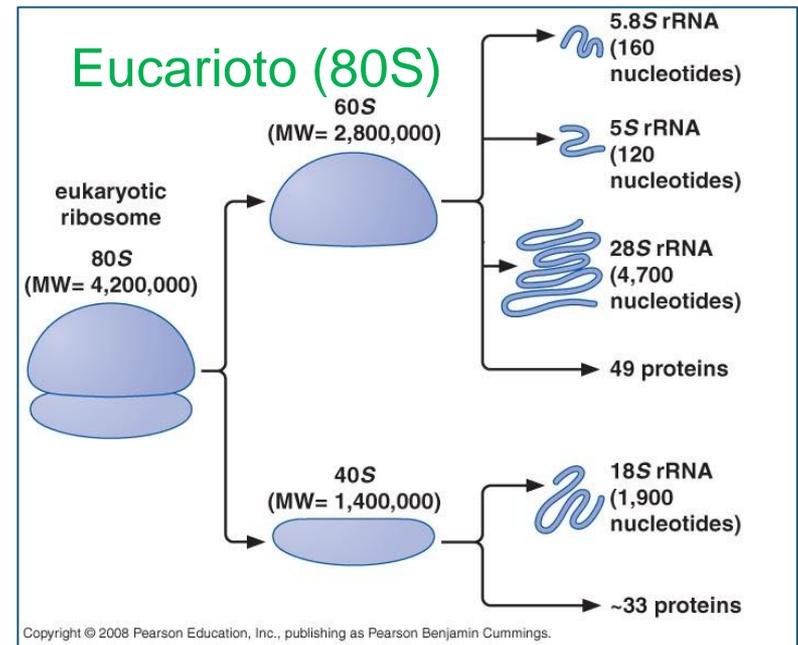
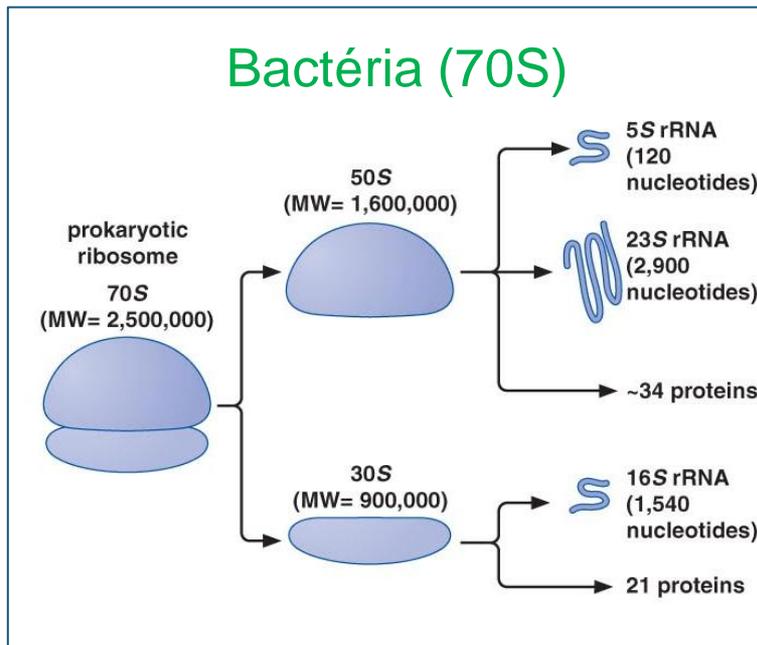
RNAs transportadores (tRNAs)

- Transporta aminoácidos para o ribossomo
- Estrutura secundária com grampos e alças, formando um trevo
- Bases modificadas após transcrição
- CCA no 3'
- 70-100 nt

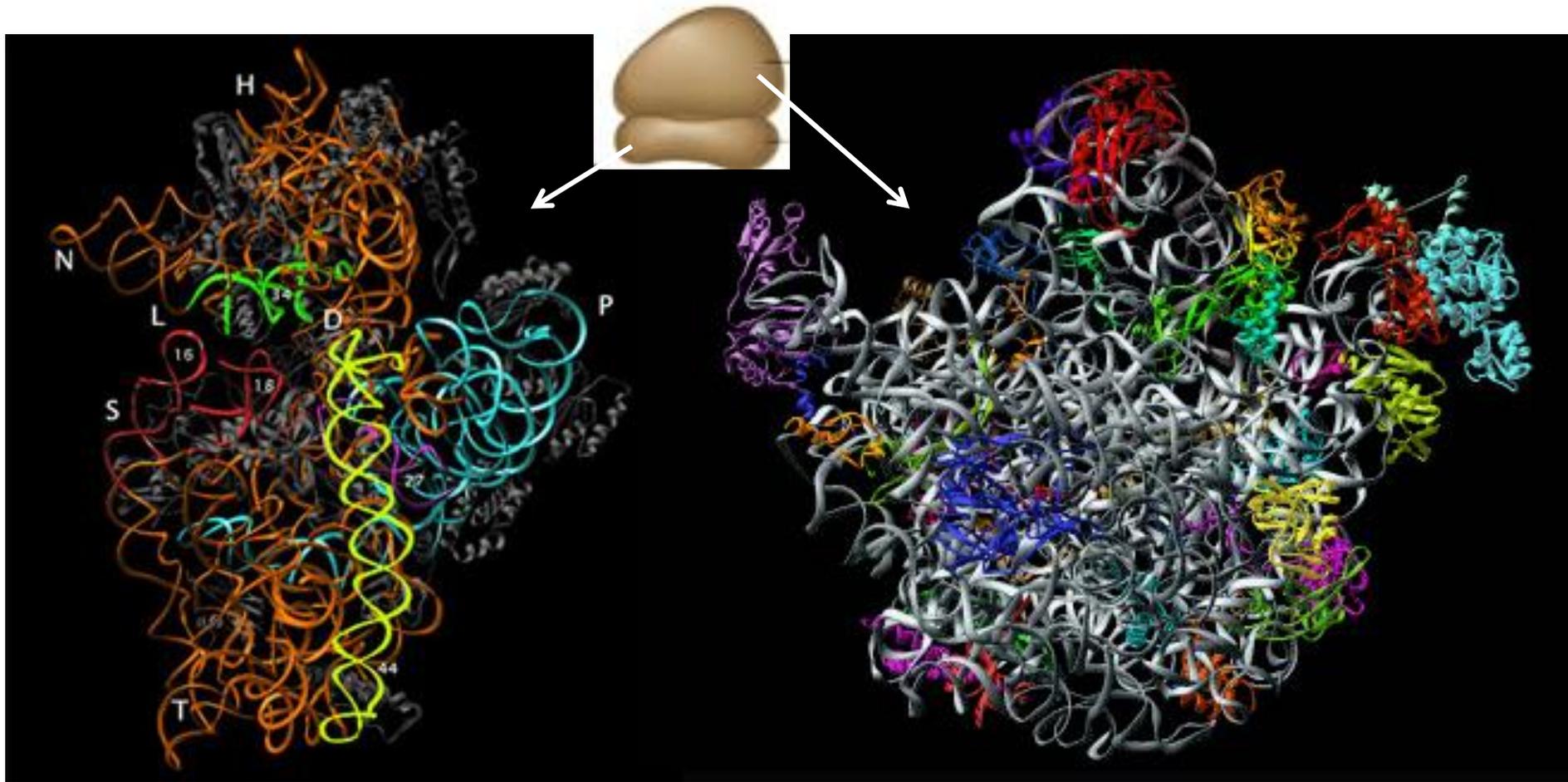


Ribossomos

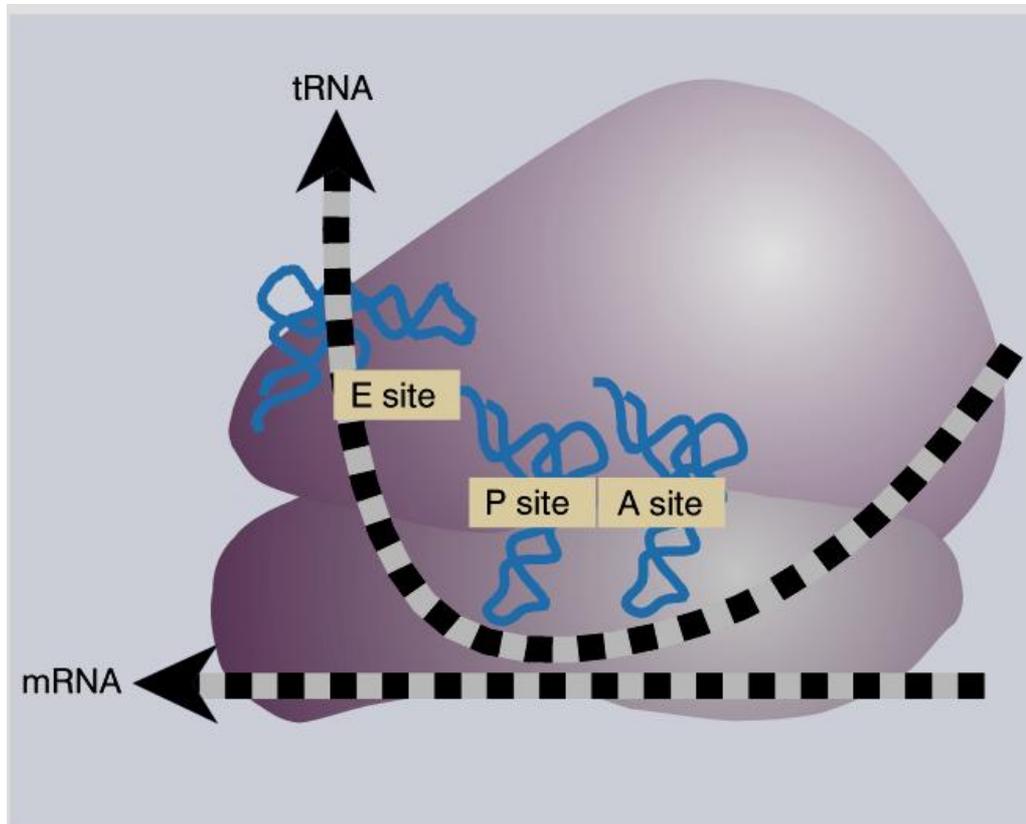
- Constituídos por RNAs e polipeptídeos
- Duas subunidades que só se reúnem durante a tradução
- Locais onde ocorre a síntese da ligação peptídica
- 10^3 /bactéria a 10^6 /célula eucariótica



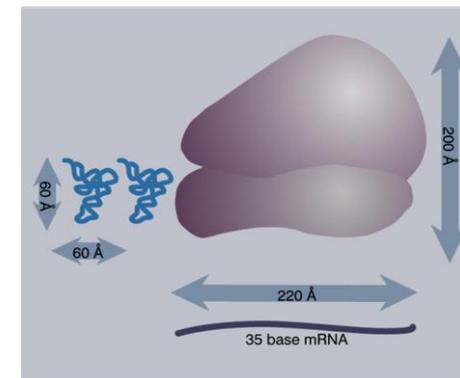
Ribossomo é formado por proteínas e rRNAs



Ribossomos têm três sítios para a ligação de tRNA



- Sítio A: tRNA-aa
- Sítio P: tRNA-peptídeo
- Sítio E: saída (*exit*)

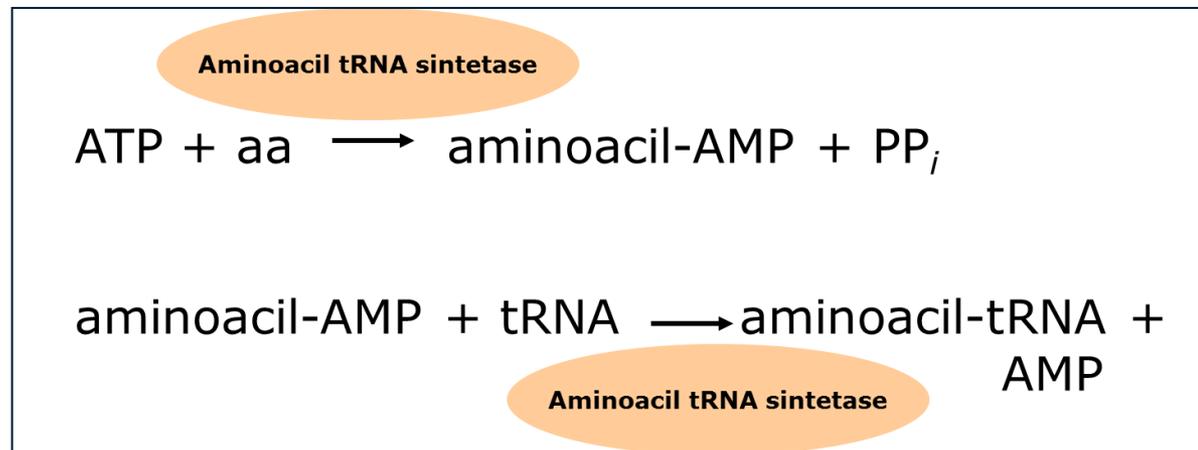


Etapas da síntese proteica

1. Ativação do aminoácido
 - Ligação ao tRNA
2. Início da tradução
3. Elongação
4. Terminação
5. Dobramento/processamento da proteína pós-tradução

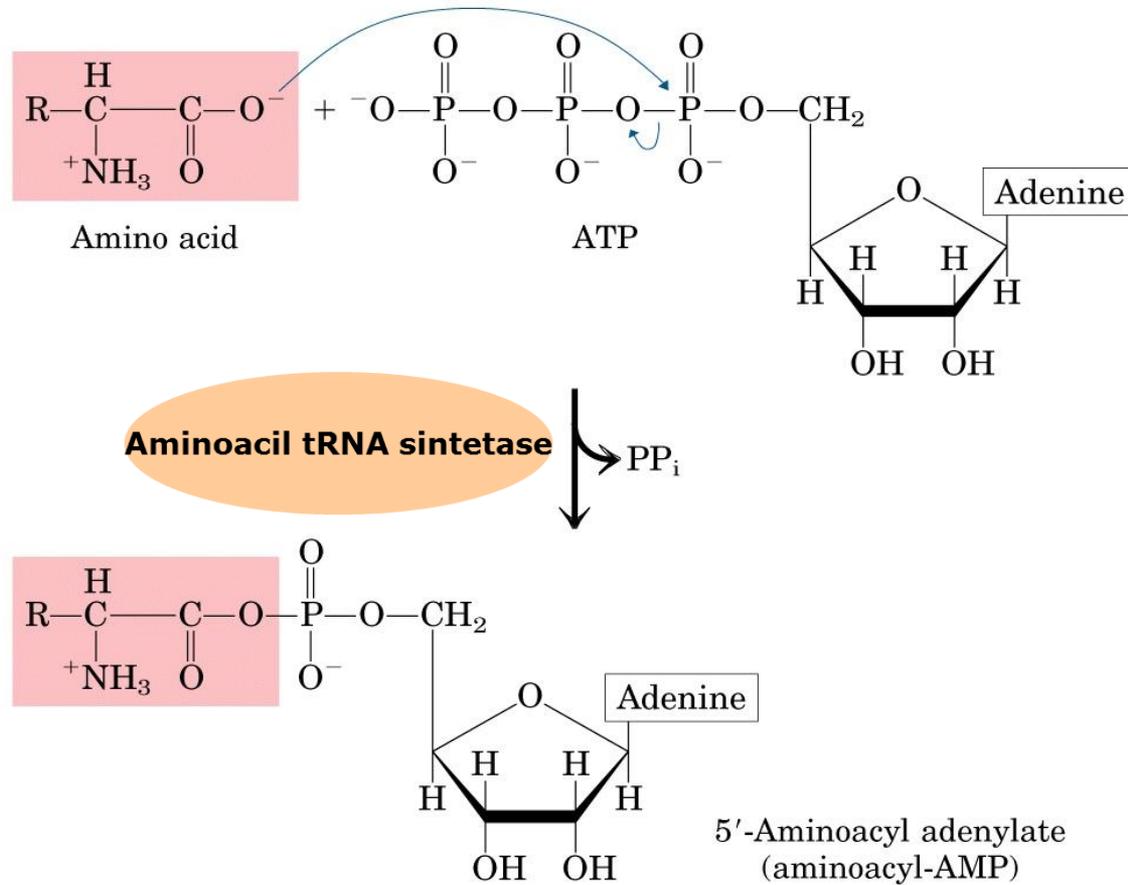
1ª etapa: Ativação do aminoácido (aa)

- Dois passos:
 - formação de AMP-aminoácido
 - Ligação do AMP-aa ao tRNA correspondente
- Enzimas responsáveis:
 - **aminoacil-tRNA sintetases**
 - Específicas para cada par tRNA-aa : **apenas 1 erro a cada 10^4 aminoácidos**
 - Algumas aminoacil-tRNA sintetases podem “corrigir” a ligação com um a.a errado



Aminoacyl-tRNA sintetases

passo 1: formação do AMP-aa



A etapa de ativação é determinante na fidelidade da tradução

- O aminoácido presente no aminoacil-tRNA não tem papel no reconhecimento códon-anticódon
- O ribossomo não discrimina tRNAs carregados incorretamente
- Portanto, a especificidade das aminoacil-tRNA sintetases são cruciais para que a tradução não tenha erros

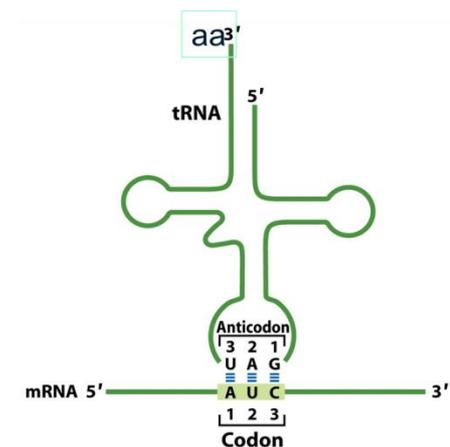


Figure 27-8a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Demais etapas da tradução

- **Início**
 - ligação do mRNA e do tRNA iniciador ao ribossomo (códon AUG → Met ou fMet) e primeira ligação peptídica
- **Elongação**
 - da segunda à última ligação peptídica
- **Terminação**
 - liberação do peptídeo e dissociação do mRNA do ribossomo

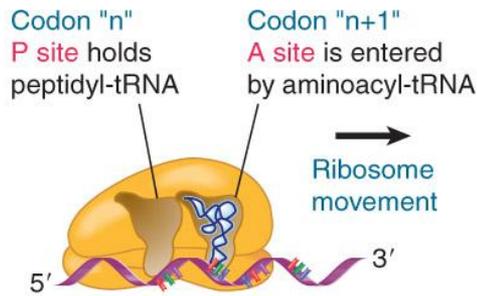
Ribossomo “caminha” ao longo do mRNA

Tradução – algumas questões

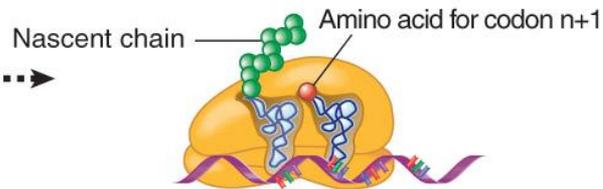
- **Início**
 - como o códon iniciador (AUG) no mRNA é reconhecido?
- **Elongação**
 - como a ligação peptídica é feita?
- **Término**
 - como o peptídeo é liberado do ribossomo?

Que fatores proteicos são necessários em cada fase?

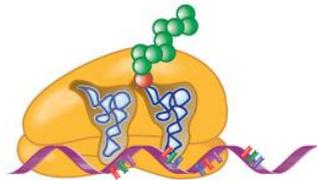
O ribossomo tem três sítios de ligação ao tRNA



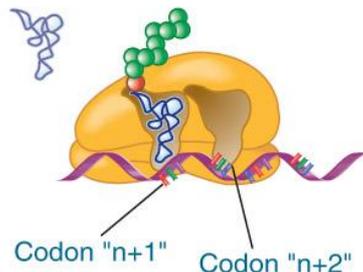
1 Before peptide bond formation peptidyl-tRNA occupies P site; aminoacyl-tRNA occupies A site



2 Peptide bond formation polypeptide is transferred from peptidyl-tRNA in P site to aminoacyl-tRNA in A site



3 Translocation moves ribosome one codon; places peptidyl-tRNA in P site; deacylated tRNA leaves via E site; A site is empty for next aa-tRNA



• Sítio A

➤ entrada do aminoacyl-tRNA

• Sítio P

➤ onde o peptidil-tRNA se liga (peptídeo nascente ligado ao tRNA)

• Sítio E

➤ saída do tRNA descarregado (exit)

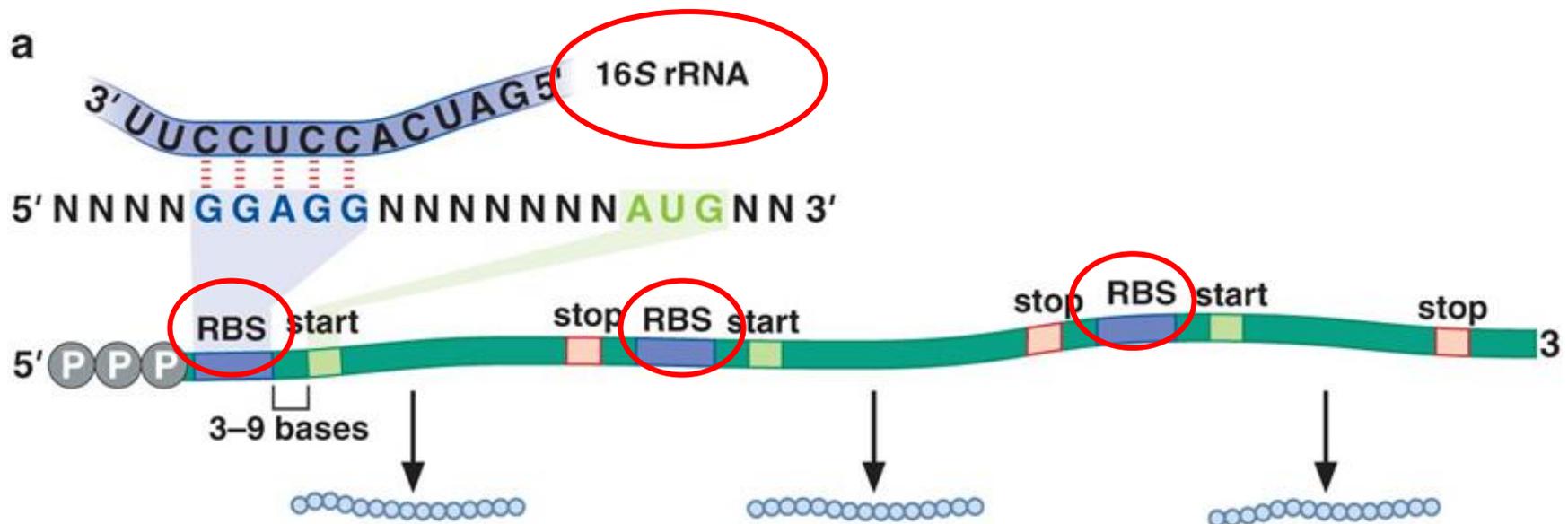
➤ Subunidade maior

Como o ribossomo reconhece qual o códon AUG iniciador?

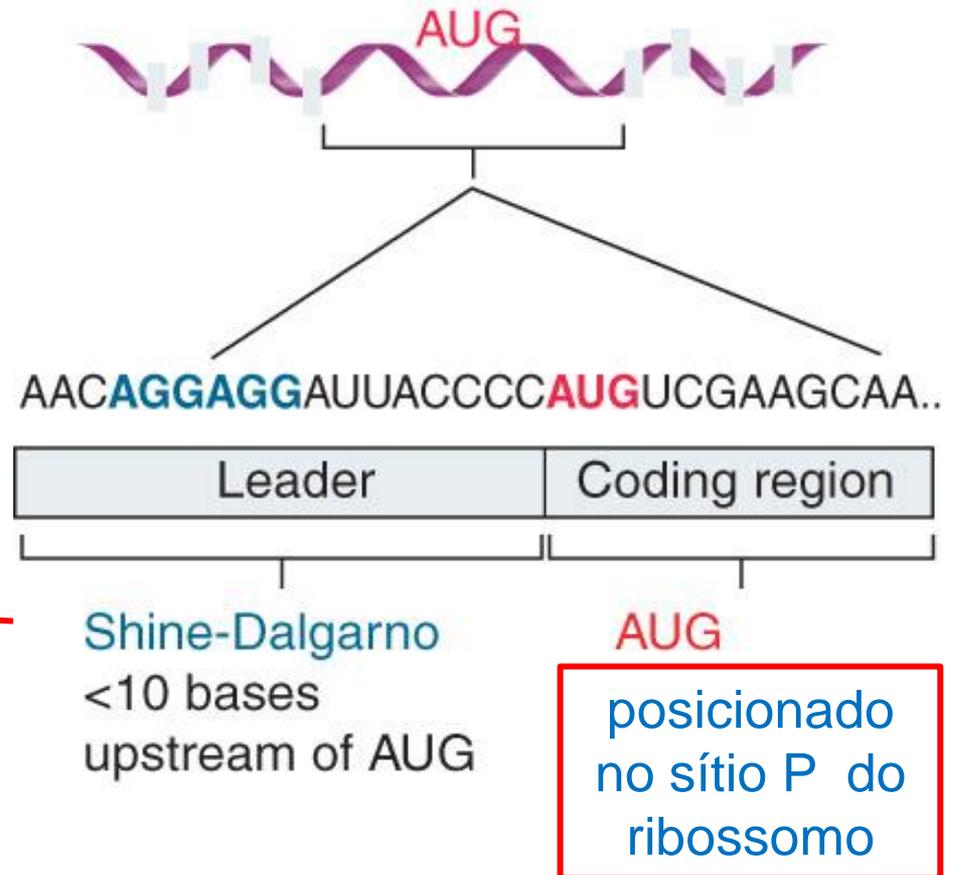
- outros AUGs podem existir ao longo de todo o mRNA
- A leitura deve começar no quadro correto
- Há diferenças entre bactérias e eucariotos!

Bactérias: presença no mRNA de **sequência de ligação ao ribossomo (RBS)** ou Shine-Dalgarno (**SD**)

- Localizada na região 5' UTR do mRNA na vizinhança de cada codon AUG onde há início de tradução (podem existir vários locais de início de tradução no mesmo mRNA)
- complementar a um trecho na sequência do 16S rRNA (subunidade menor do ribossomo)



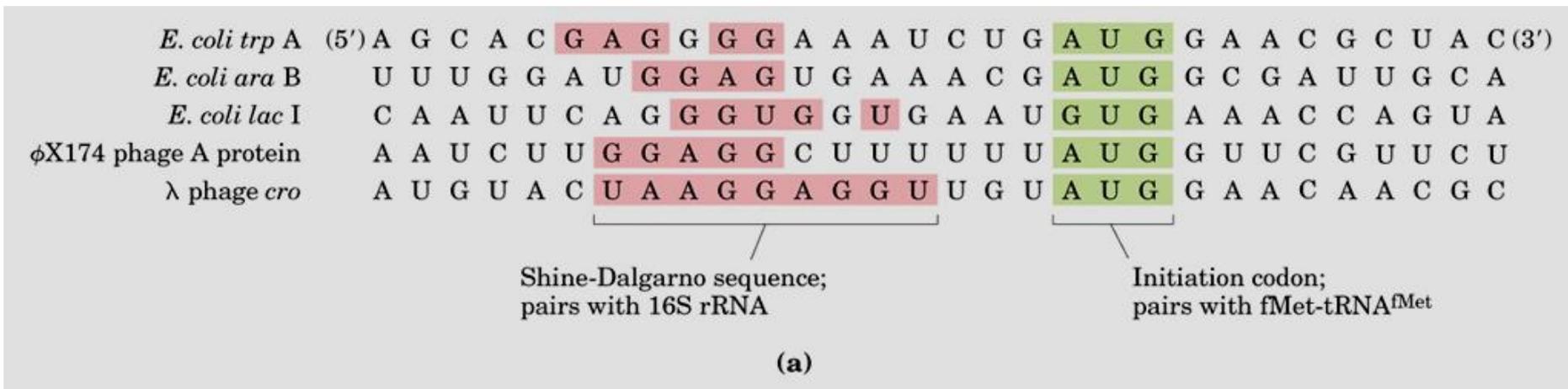
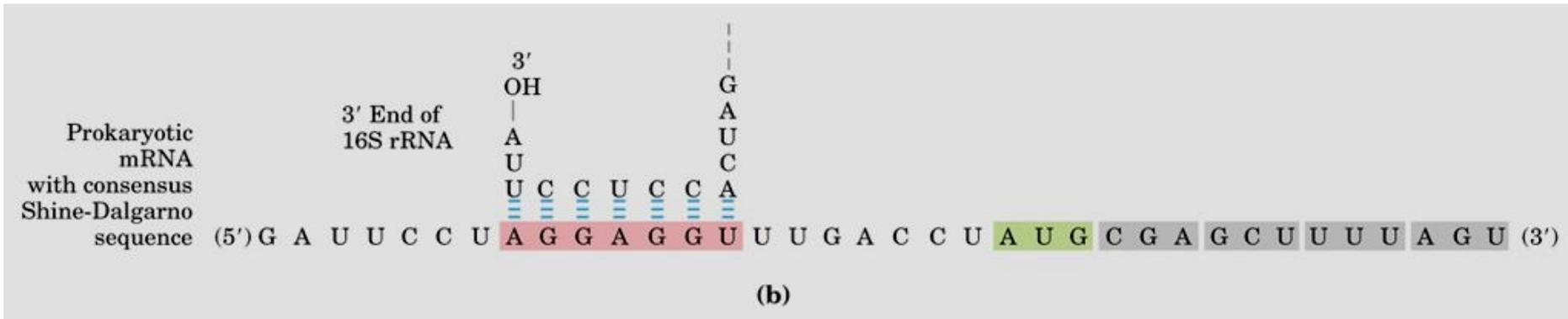
mRNA bacteriano tem sítio de ligação ao ribossomo (=Shine-Dalgarno)



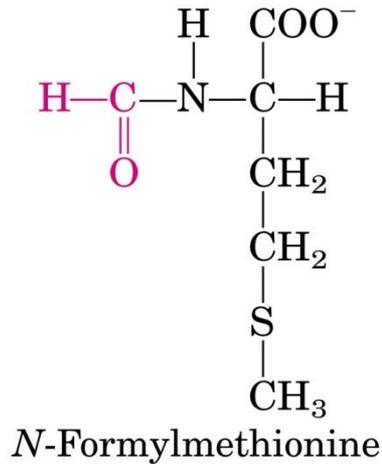
pareia com sequência complementar no rRNA

posicionado no sítio P do ribossomo

Bactérias: sequência de ligação ao ribossomo (RBS) ou Shine-Dalgarno (SD) ou Shine-Dalgarno (SD)

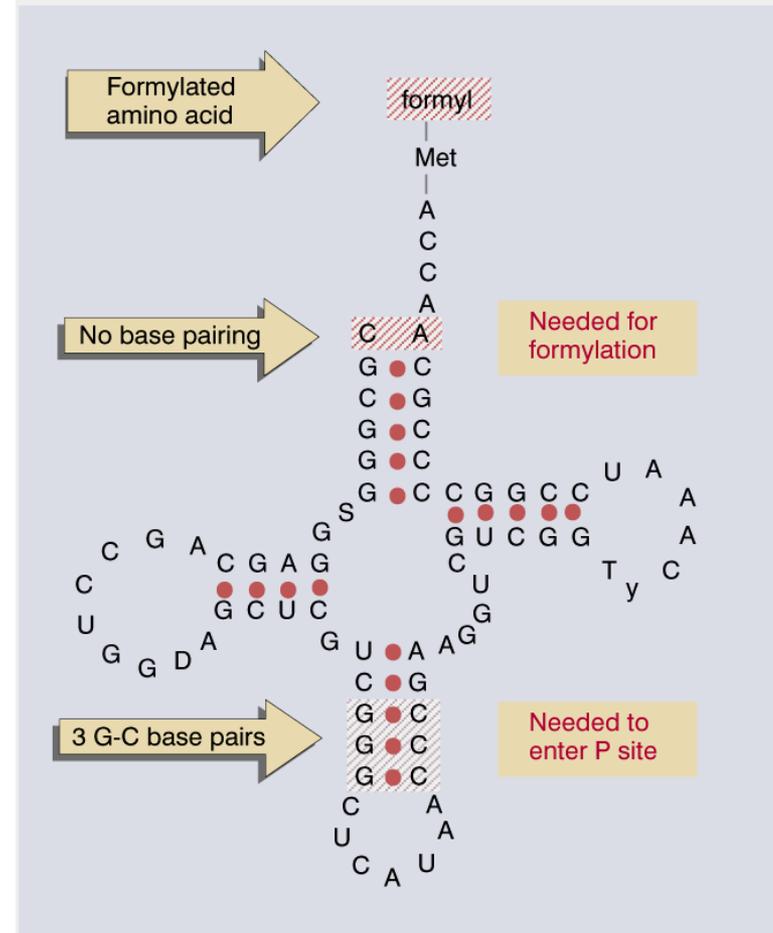


Em bactérias, o primeiro a.a. a ser adicionado é sempre N-formil-Met

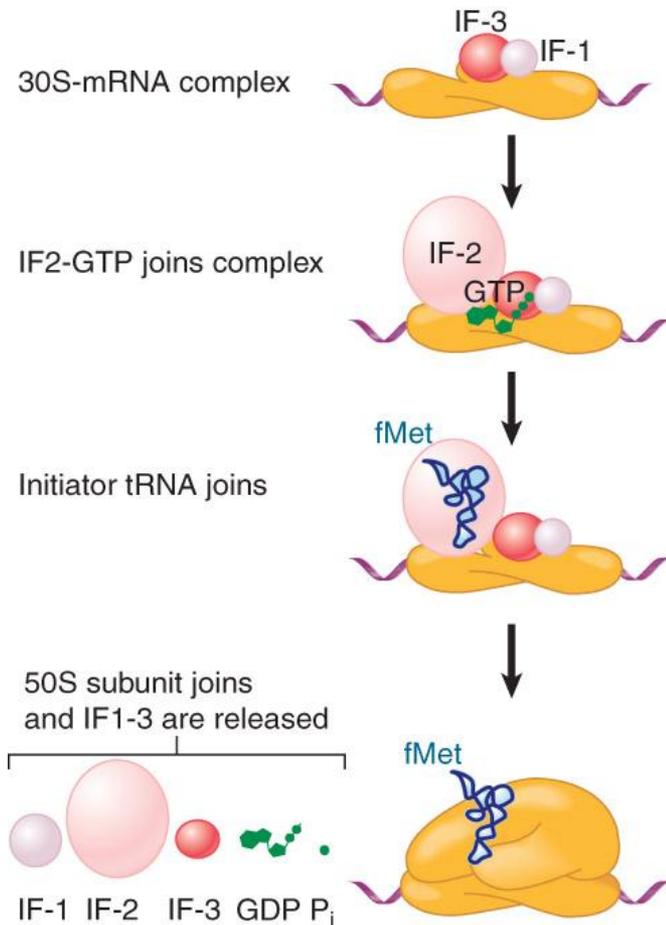


- **fMet-RNA** tem características únicas que o distinguem como tRNA iniciador: só ele pode se ligar ao sítio P no início da tradução

Figure 6.11 fMet-tRNA_f has unique features that distinguish it as the initiator tRNA.



Sequencia de eventos no início da tradução - bactérias



- Ribossomo dissociado
- Subunidade menor ligada a **IF-3** e **IF-1** e ao mRNA
 - AUG inicial posicionado no sítio P parcial
- Ligação de **IF-2-GTP**
- Ligação de fMet-tRNA
- IFs liberados, **hidrólise de GTP**, subunidade maior se une e o ribossomo completo se forma

Início em bactérias

fatores de iniciação de tradução envolvidos

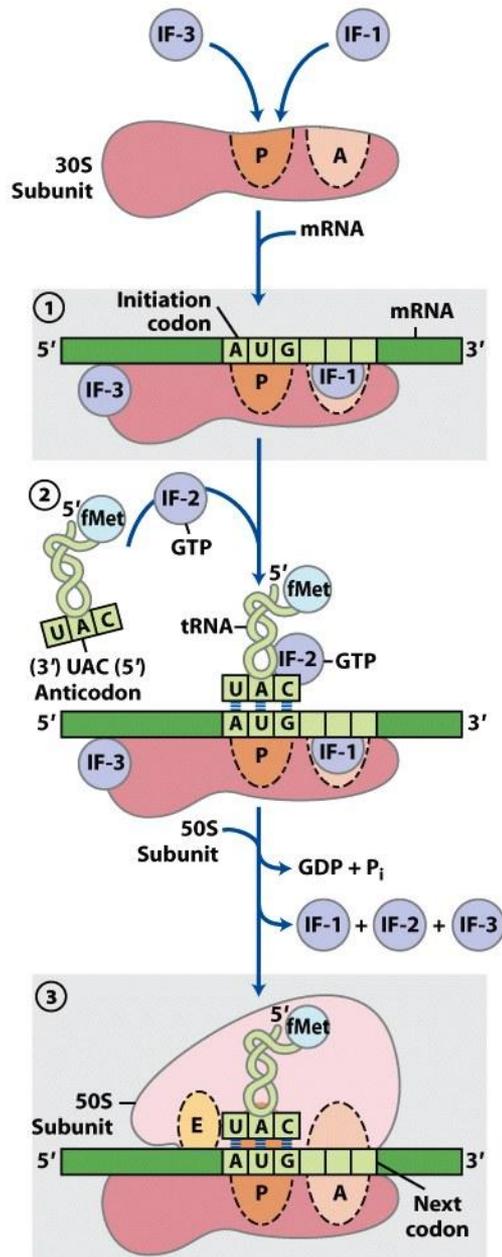


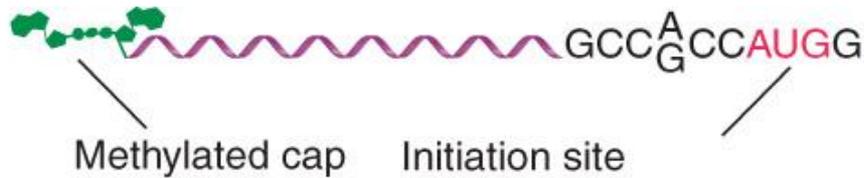
Figure 27-25

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

- IF-3
 - Estabiliza 30S livre
 - Capacita 30S a ligar mRNA
 - Checa acurácia do 1^o. aa (fMet)
- IF-1
 - Liga próximo ao sítio A parcial
 - Previne entrada de um aa-tRNA qualquer
- IF-2
 - Interage com fMet-tRNA
 - Associa com Sítio P parcial
 - Liga/hidrolisa GTP, fornecendo energia para liberação dos IFs

Próximo aa se liga ao sítio A

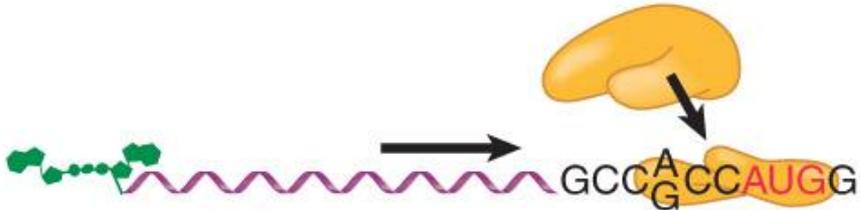
Início da tradução em eucariotos



1 Small subunit binds to methylated cap



2 Small subunit migrates to initiation site



3 If leader is long, subunits may form queue



Subunidade menor dos ribossomos de eucariotos reconhece o 5'CAP e se desloca até o sítio de início da tradução.

Contem um motivo de sequência característico que tem complementaridade com o 18S rRNA

(Sequencia de Kozak)

5'(gcc)gccRccAUGG-3'

purina

Vários ribossomos podem traduzir o mesmo mRNA simultaneamente: polissomos ou poli-ribossomos

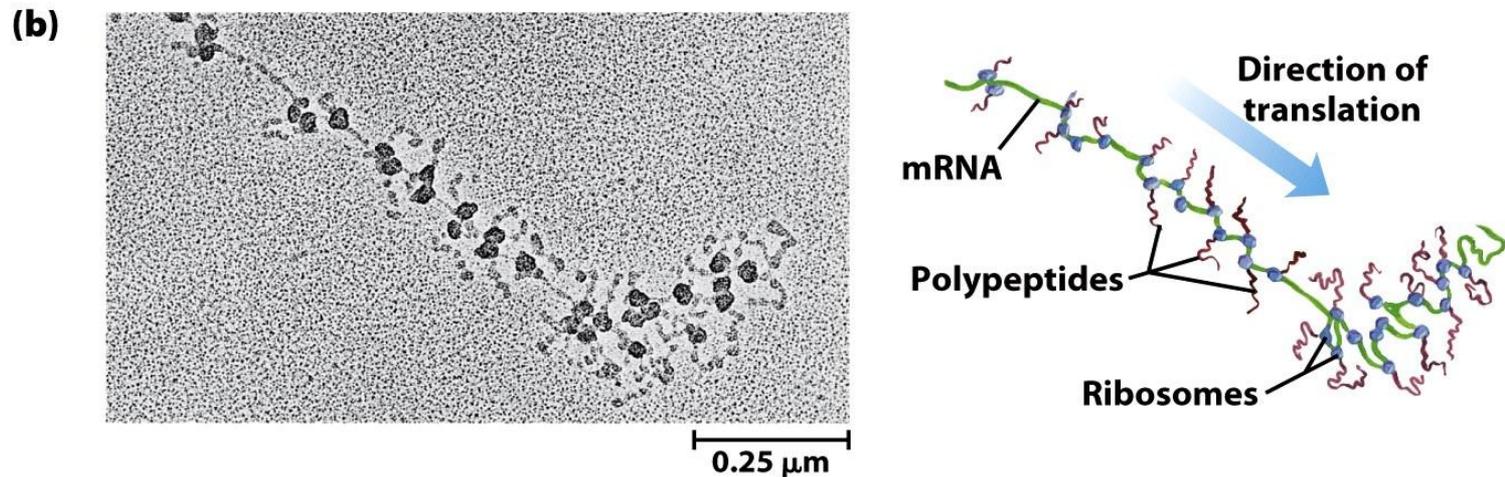
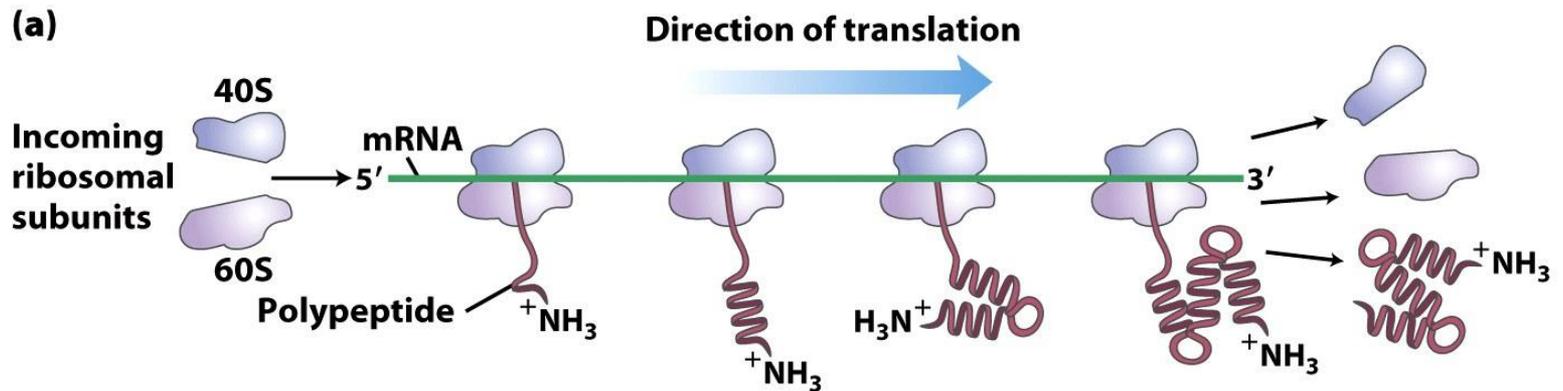
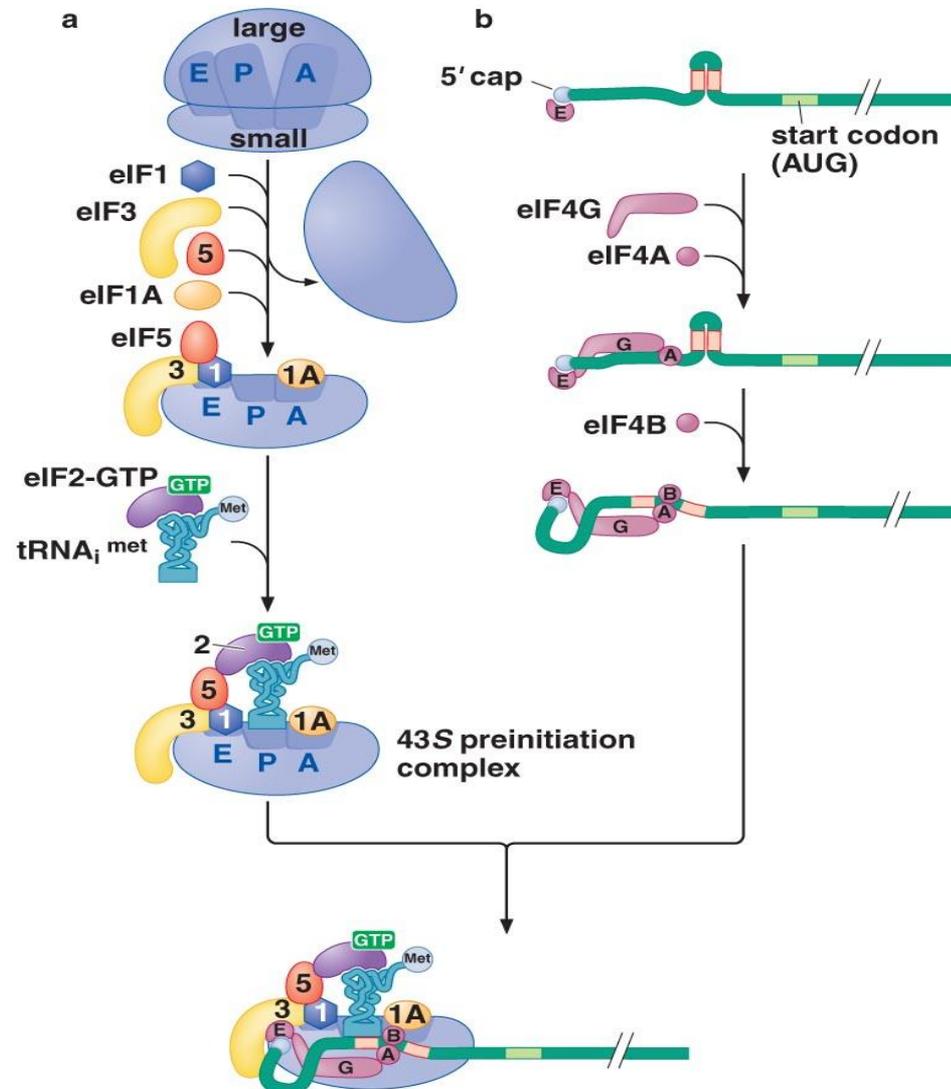


Figure 27-32
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Fatores de início da tradução em eucariotos

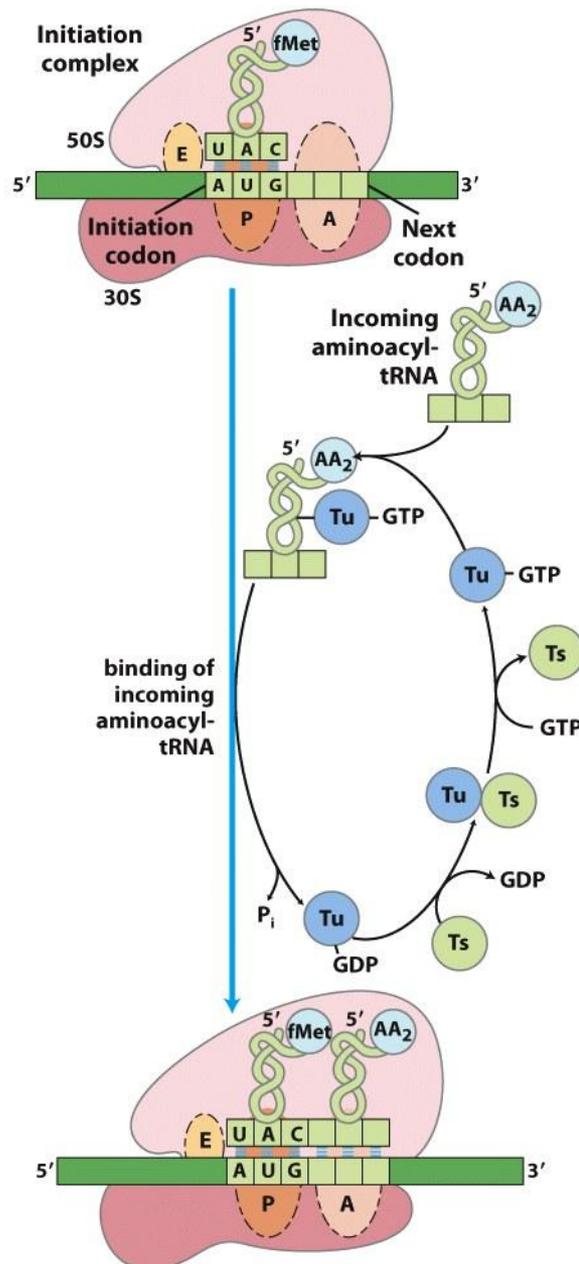


Voltando para as bactérias...

- Elongação e terminação em bactérias e eucariotos seguem os mesmos princípios
- Fatores proteicos diferentes e maior complexidade em eucariotos

Elongação em bactérias

1º passo



- fMet-tRNA no sítio P
- entrada de segundo aa-tRNA:
 - ligado a **EF-Tu-GTP**
 - Entra no sítio A
 - **Hidrólise de GTP**
- EF-Ts recicla EF-Tu, o religando com GTP

EF = fator de elongação

Figure 27-28

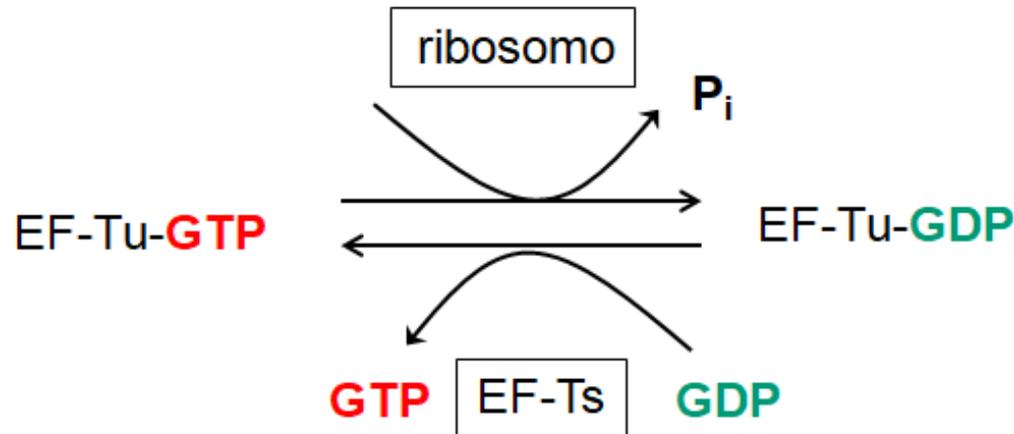
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Fator de alongação EF-Tu contribui para a fidelidade da tradução

- **Hidrólise lenta do GTP** ligado a EF-Tu (milisegundos) permite a verificação do pareamento códon-anticodon e a dissociação de tRNAs incorretos.
- contribui para aumentar a fidelidade da tradução

Formação do par codon-anticodon correto
induz mudanças conformacionais e a
hidrólise do GTP pelo ribossomo



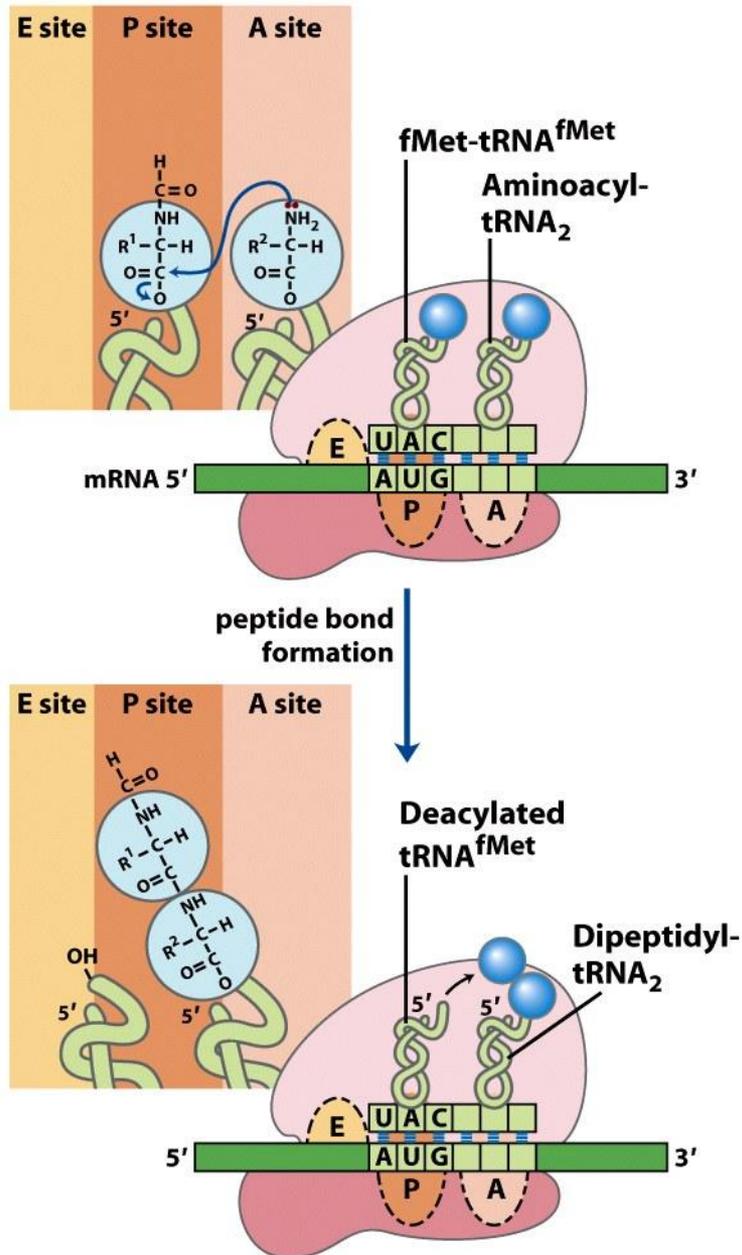
Se liga ao aminoacil-tRNA e favorece sua associação com o sítio A do ribossomo

Se dissocia do ribossomo, ativando a formação da ligação peptídica

Regeneração de EF-Tu-GTP

Elongação em bactérias

2º passo



- **Formação da ligação peptídica**

- fMet é transferida para o NH₂ do aa2

- Catalisada pelo 23S rRNA (ribosima!)

- tRNA iniciador sem fMet fica no sítio P

- tRNA₂-fMet-aa2 no sítio A

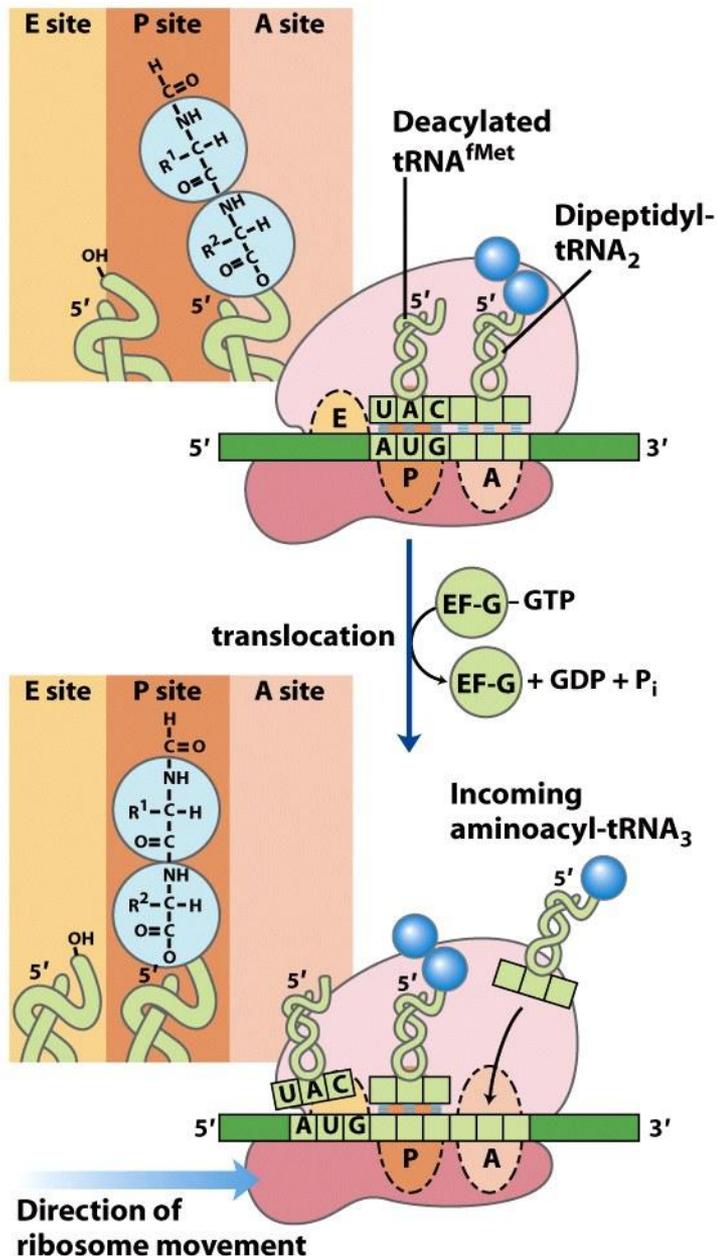
Figure 27-29

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

Elongação em bactérias

3º passo



- **Translocação:** Ribossomo se move
 - **EF-G- GTP** se liga e **hidrolisa GTP**
 - tRNA iniciador sem fMet passa para o sítio E e sai do ribossomo
 - tRNA₂-fMet-aa₂ passa para o sítio P
- Um novo aa-tRNA liga no sítio A
- *Ciclo se repete...*

Direction of ribosome movement

Figure 27-30a

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

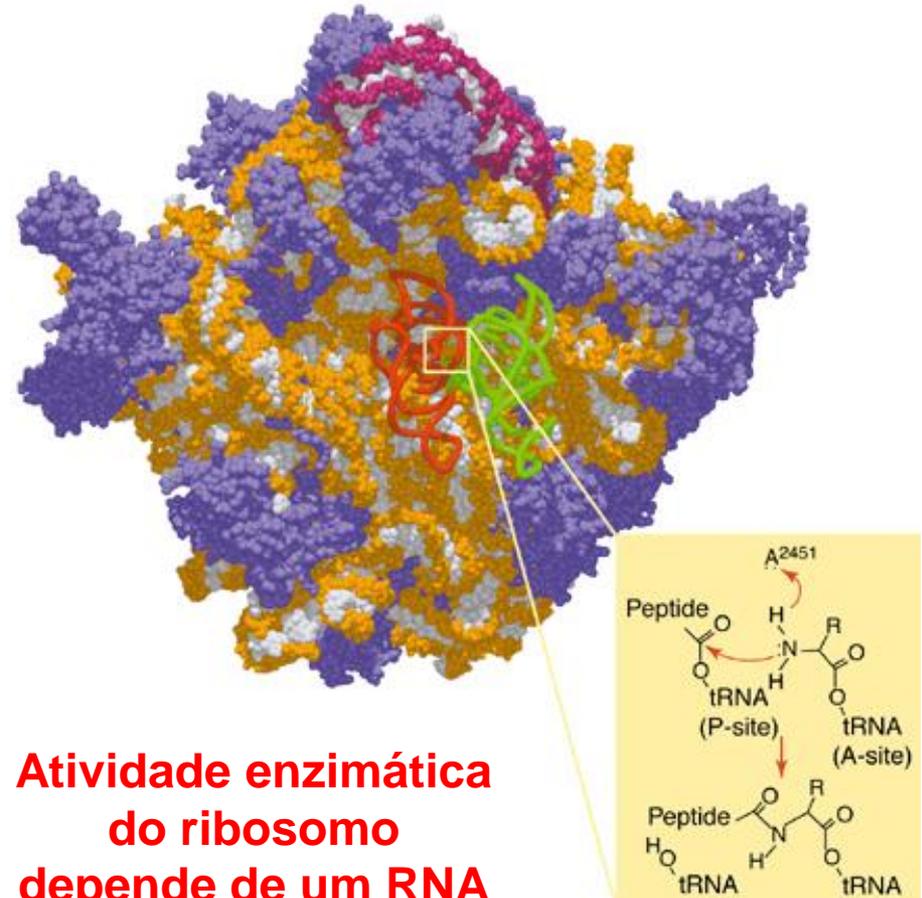
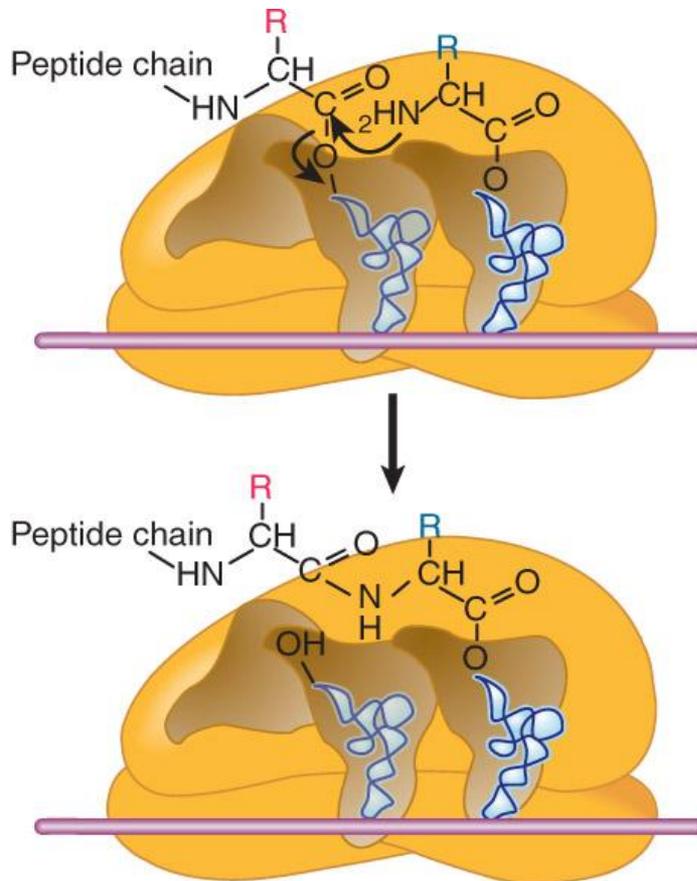
© 2008 W. H. Freeman and Company

EF = fator de alongação

50S (23S RNA) tem atividade de peptidil-transferase (**ribosima**)

Steitz, Ramakrishnan e Yonath
Prêmio Nobel de Química - 2009

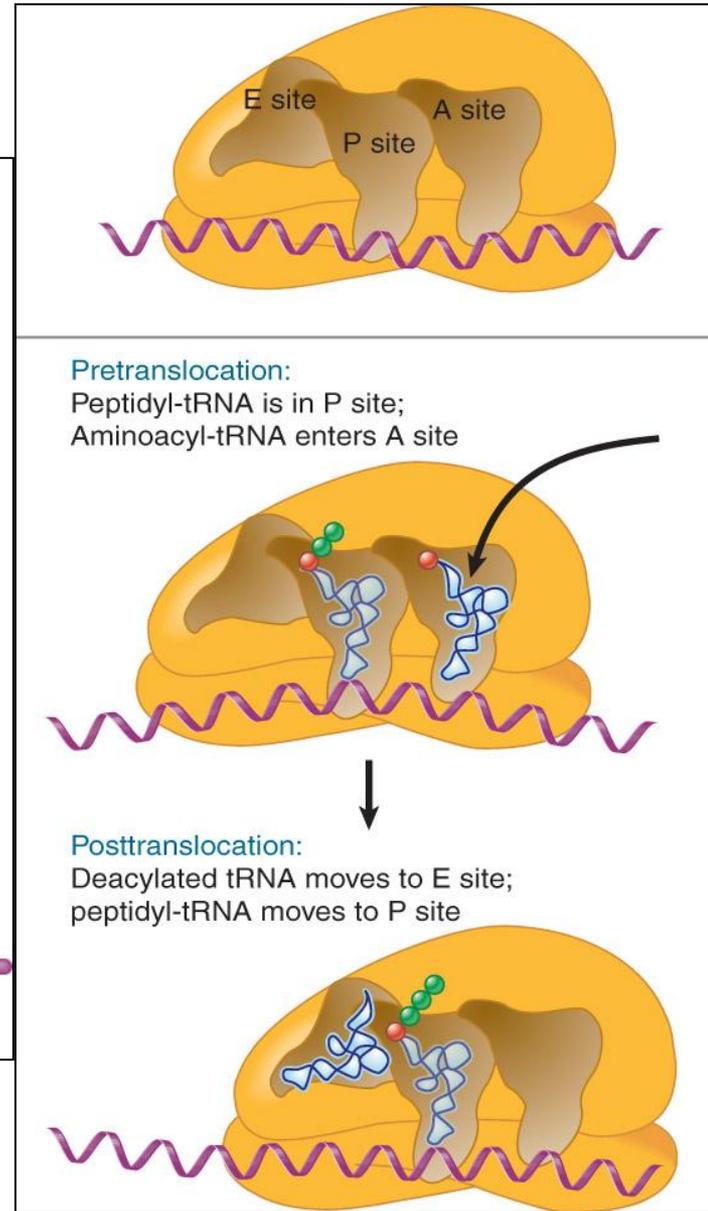
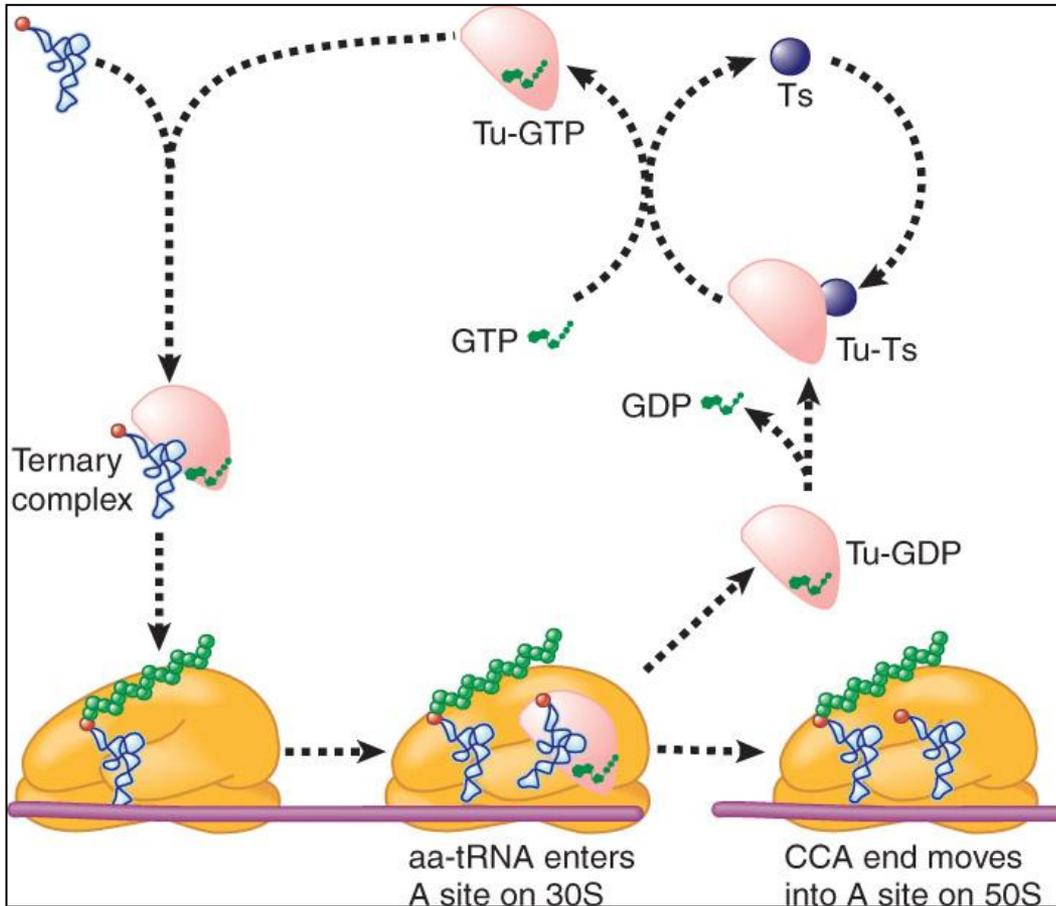
RNAs com papel catalítico em um processo primordial para o surgimento das enzimas!



Elongação em bactérias

- mRNA se mantém ligado ao ribossomo
- Ligação peptídica catalisada por rRNA
- A cada ciclo, ribossomo se move 1 códon no mRNA
- aa-tRNA entra no sítio A, liga o polipeptídeo nascente, passa para o sítio P e depois para o E, quando descarregado
- Gasto de 2 GTP por aa adicionado: EF-Tu/EF-Ts (ligação peptídica) e EF-G (translocação do ribossomo)

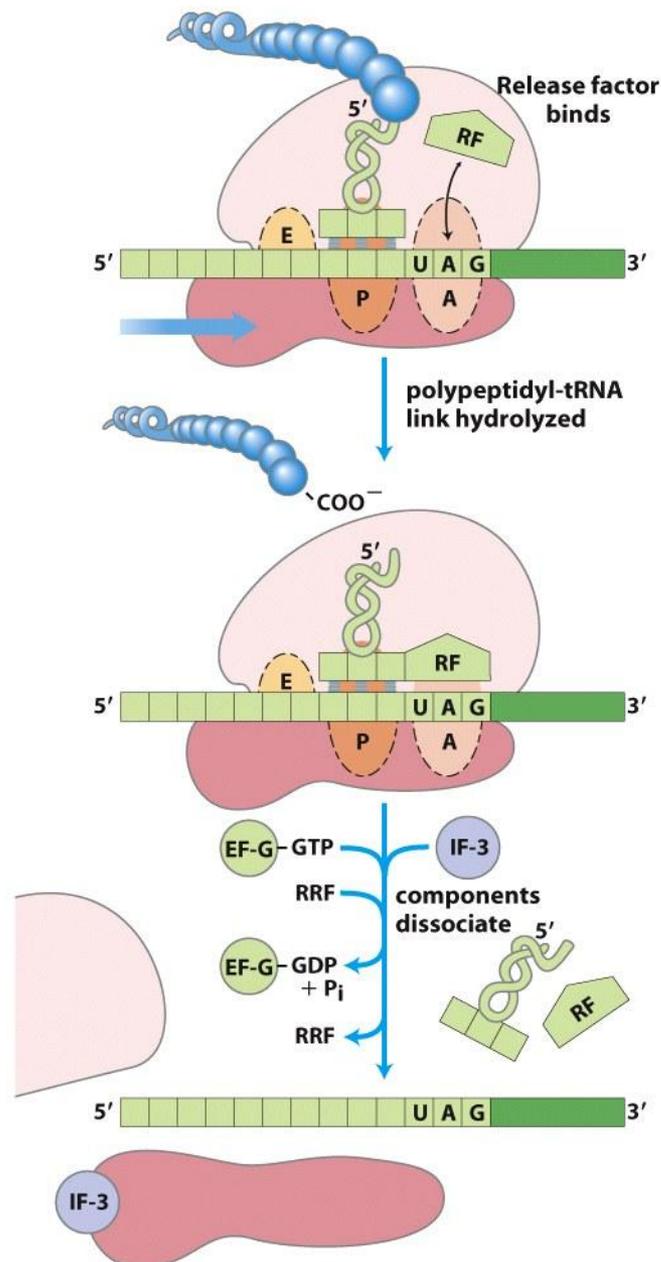
Elongação em bactérias



Terminação em bactérias

- stop codons
 - UAA (**ochre**)
 - UGA (**opal**)
 - UAG (**amber**)
- Igual para eucariotos
- Reconhecidos por fatores de liberação que se ligam no sítio A
- RF = *release factor*
- Não tem tRNA correspondente

Terminação em bactérias



- Fatores de liberação (RF) se ligam ao sítio A quando um códon de parada está presente
- Ligação entre polipeptídeo e tRNA é quebrada
- Ribossomo é translocado e complexo é desfeito

Figure 27-31

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

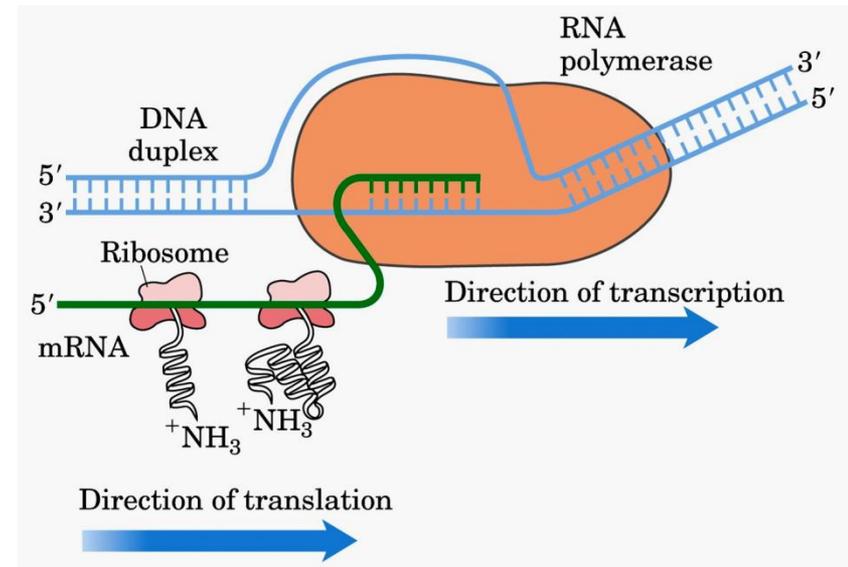
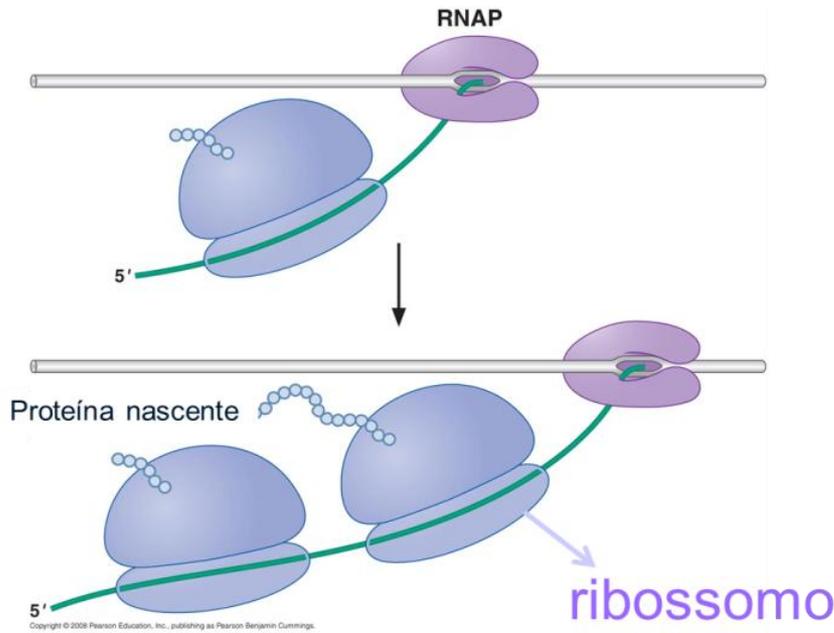
Quais as principais diferenças e semelhanças na tradução em bactérias e eucariotos?

	Bactérias	Eucariotos	
Códon inicial	AUG	AUG	=
Primeiro aminoácido	N-formil-Met (fMet)	Met	≠
Ligação do ribossomo	Sequência Shine-Dalgarno (SD ou RBS), que pareia com rRNA 16S	Reconhecimento do CAP e busca pelo início	≠
Sítios de ligação do tRNA no ribossomo	A, P e E	A, P e E	=
Catálise da ligação peptídica	rRNA catalítico	rRNA catalítico	=
Stop codons	UAA, UAG e UGA	UAA, UAG e UGA	=

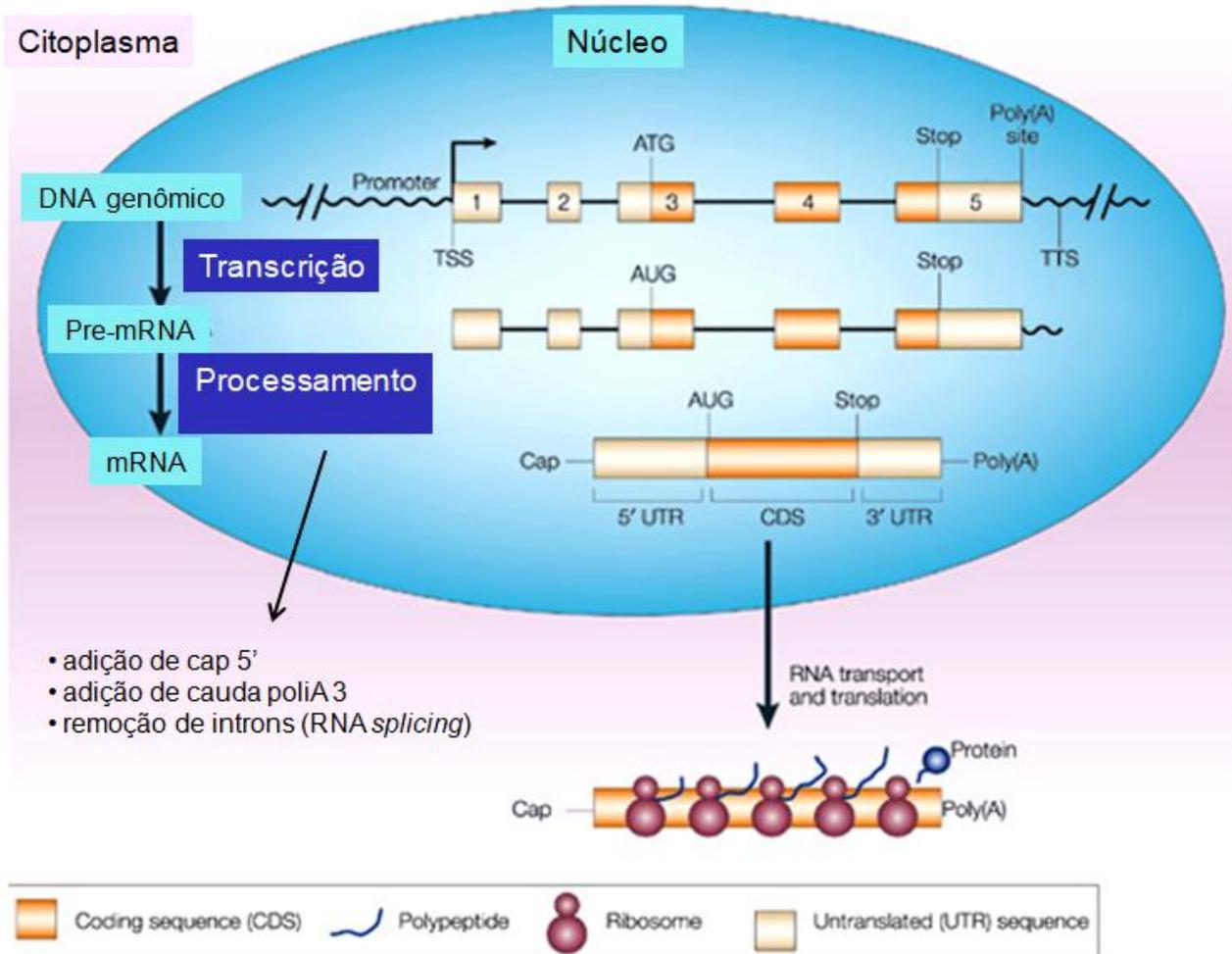
Animação mostrando a tradução de proteína nos
ribosomos

https://www.youtube.com/watch?v=TfYf_rPWUdY

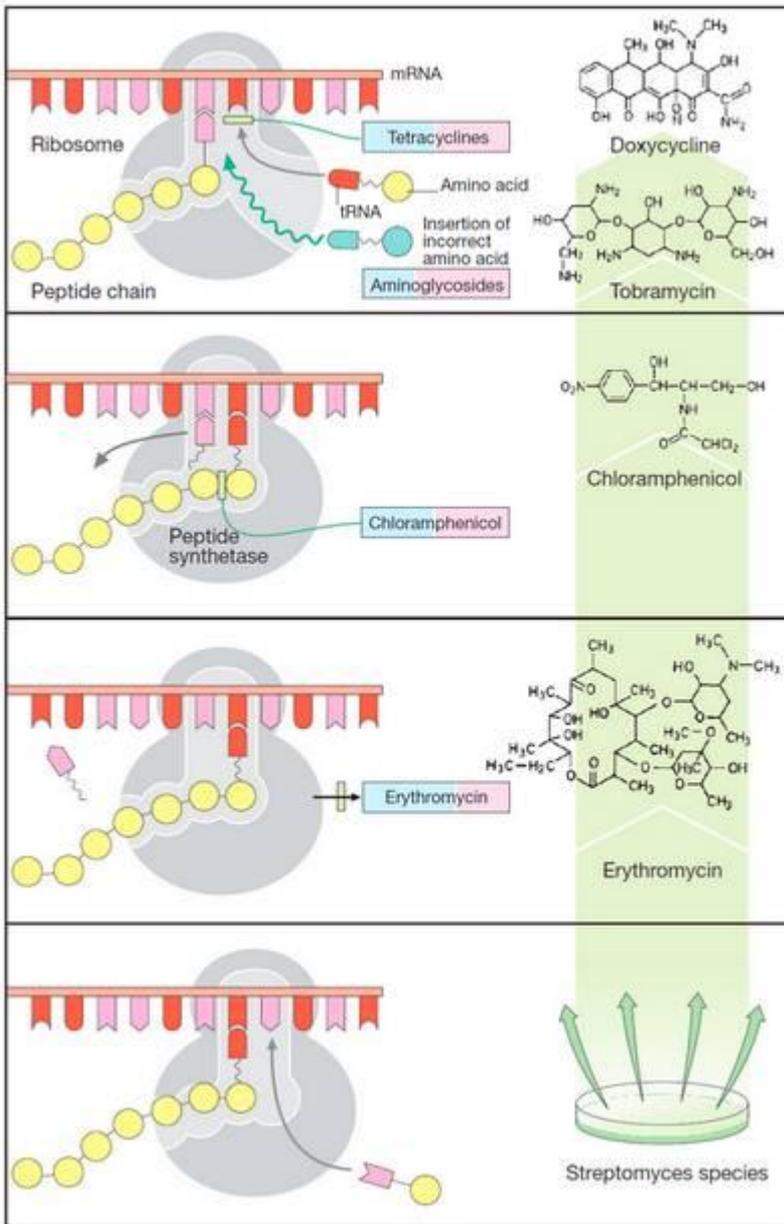
Bactérias: transcrição e tradução são acopladas



Em eucariotos, a transcrição acontece no núcleo e a tradução no citoplasma

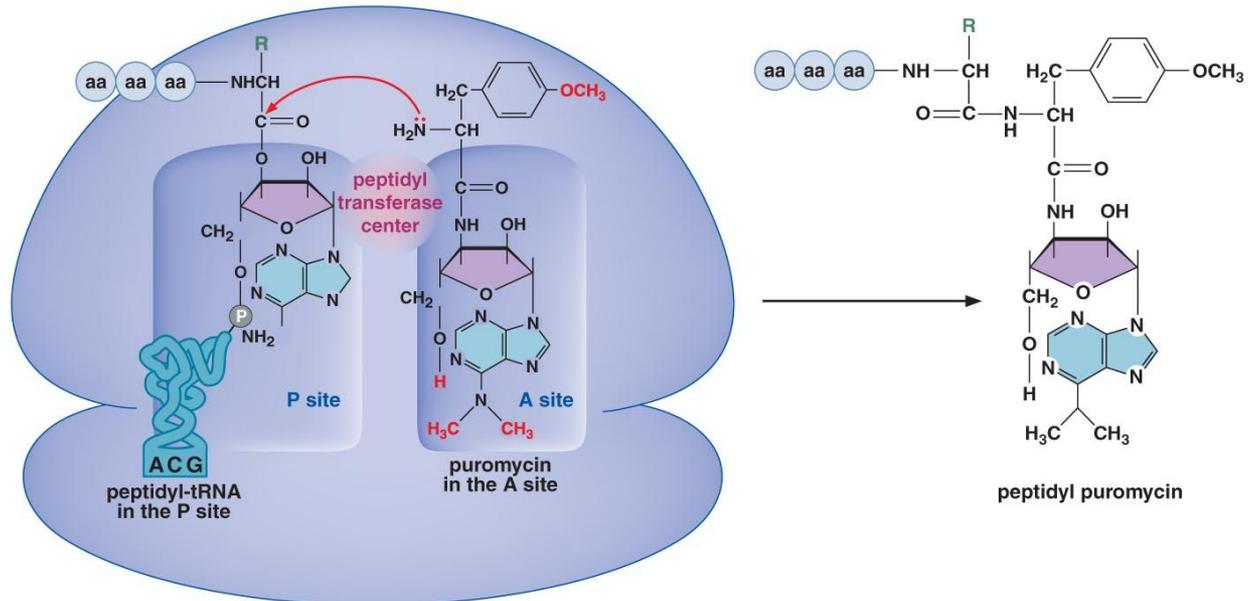


Vários antibióticos têm a tradução como alvo



- Tetraciclina
 - Bloqueio sítio A
- Estreptomicina
 - Leitura incorreta dos códons
- Cloranfenicol
 - Inibe peptidil-transferase
- Eritromicina
 - Bloqueia translocação

Inibidores de tradução de eucariotos



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

- Puromicina

- Similar ao aa-tRNA, liga-se ao peptídeo nascente

Modificações pós-traducionais são essenciais para a estrutura e função das proteínas

- **Dobramento (“Folding”)**
- **Direcionamento celular**
- **Clivagem proteolítica**
- **Modificações covalentes nos aminoácidos (ex. fosforilação, metilação, acetilação)**
- **Degradação**

Proteínas podem sofrer modificações, precisam ter dobramento correto e estar no local certo para desempenhar suas funções, além de serem degradadas quando não são mais necessárias

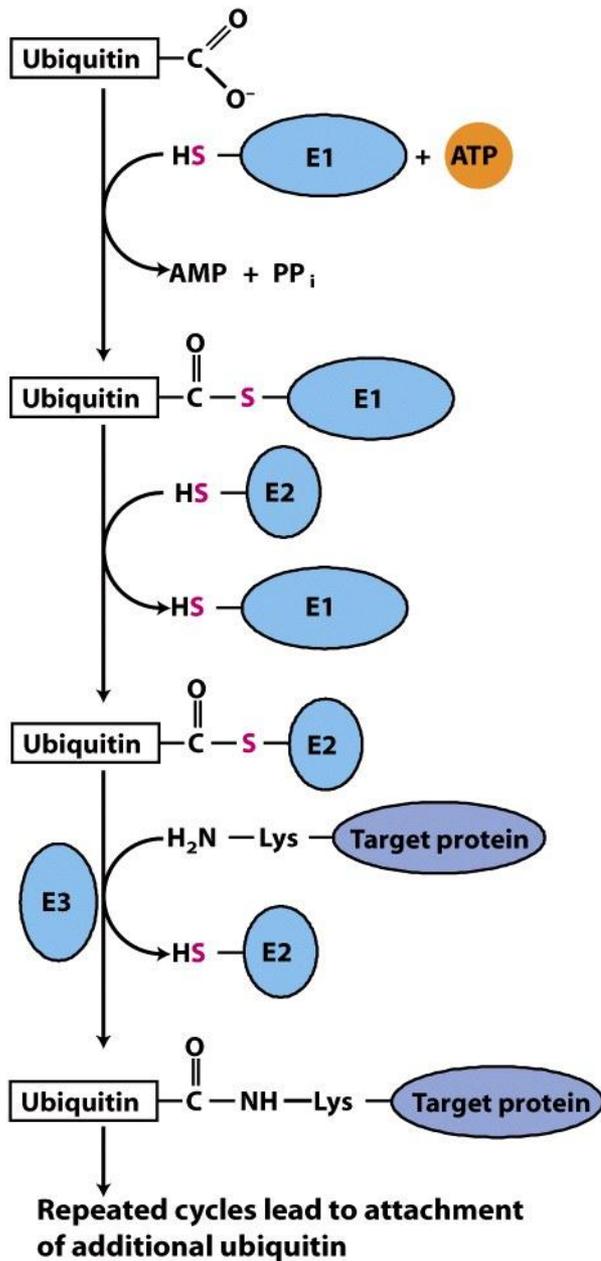
Meia-vida de proteínas é variável

Tabela 17.1 Meia-vida de proteínas

Proteína	Meia-vida ¹ (dias)
Hemoglobina falciforme	12 minutos
Ornitina descarboxilase	12 minutos
HMG-CoA redutase	3 horas
Fosfoenolpivurato carboxiquinase	5 horas
Glicoquinase	1,25
Acetil-CoA carboxilase	2
Alanina transaminase	2,5
Arginase	4
Aldolase	5
Citocromo b	5,4
Lactato desidrogenase	6
Citocromo c	6,3
Hemoglobina	120

¹Meia-vida de uma proteína é o tempo após o qual metade das moléculas é degradada. Proteínas defectivas e enzimas reguladoras têm, em geral, meia-vida muito curta.

Proteínas são marcadas para degradação através da modificação covalente com ubiquitina



- 76 aa; altamente conservada
- Liga-se covalentemente a proteínas a serem degradadas
- Processo requer quebra de ATP

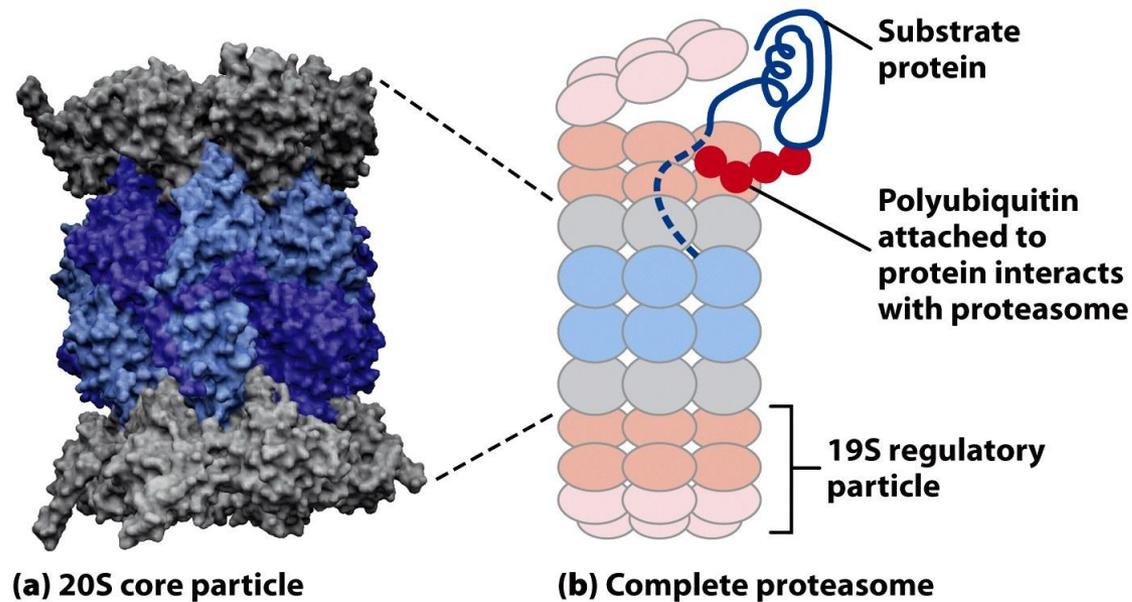
Figure 27-47

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Proteínas ubiquitinadas são degradadas no proteassomo

- $2,5 \times 10^6$ Da
- 2 x 32 subunidades polipeptídicas
- Subunidades com atividades proteolíticas de especificidades diferentes no anel



Diferentes partículas regulatórias agem em condições celulares específicas

A descoberta da via ubiquitina-proteosoma e seu papel na regulação de processos biológicos

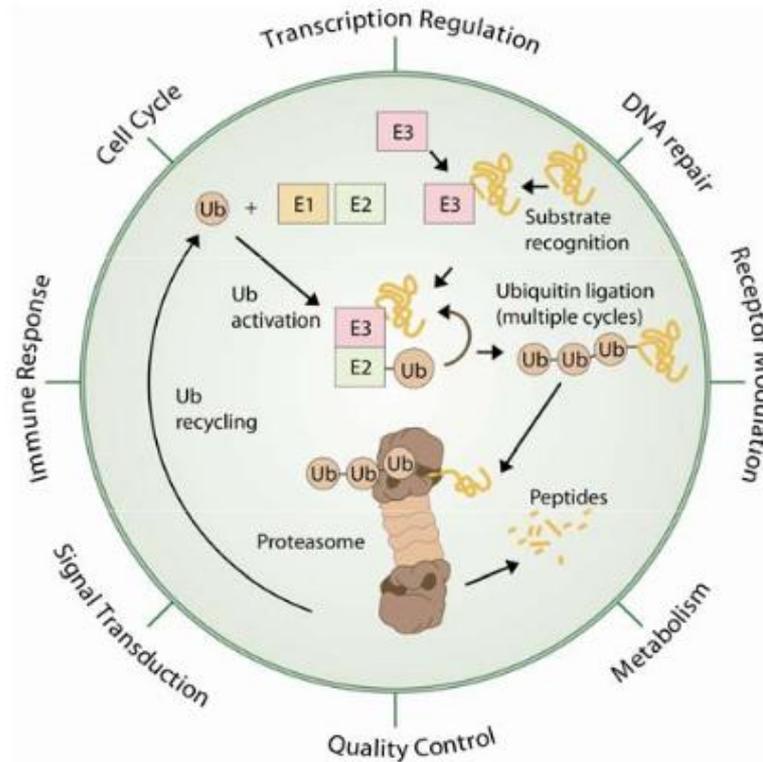


Fig. 1 Ubiquitin-mediated proteolysis and its many biological functions

Nobel da Química, 2004, pela descoberta da degradação de proteínas mediada por ubiquitina

https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/press.html