

# Aula de **Bioquímica II**

**Tema:**

## **Tradução**

**Prof. Dr. Júlio César Borges**

*Depto. de Química e Física Molecular – DQFM*

*Instituto de Química de São Carlos – IQSC*

*Universidade de São Paulo – USP*

*E-mail: [borgesjc@iqsc.usp.br](mailto:borgesjc@iqsc.usp.br)*

## Síntese de Proteínas

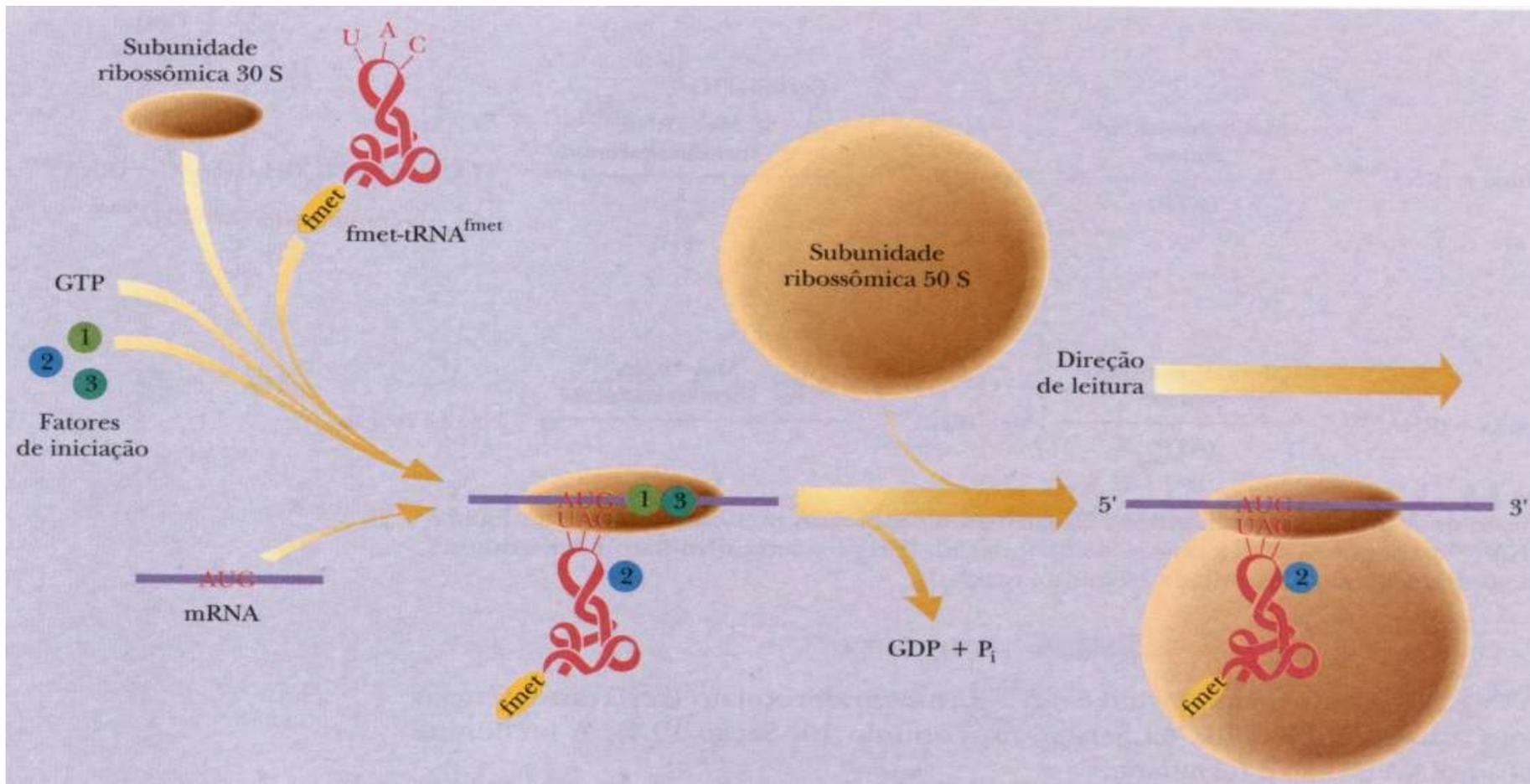
- Comum em todos os organismos conhecidos

→ Processo dependente de mRNA, aminoacil-tRNAs, GTP e várias proteínas acessórias

→ Ribossomo: Maquinaria de síntese de proteínas

Executa atividade catalítica tipo Peptidil-transferase

Formado por RNA ribossomais e Proteínas

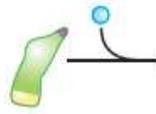


# Síntese de Proteínas

Dividida em 5 etapas → Tradução= Etapas 2-4

1

**Aivação de aminoácidos:** o tRNA é aminoacilado.



4

**Parada:** a tradução acaba quando um códon de parada é encontrado. O mRNA e a proteína dissociam-se e as subunidades do ribossomo são recicladas.

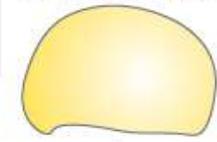
5

**Enovelamento da proteína**

2

**Iniciação:** o mRNA e o tRNA aminoacilado ligam-se à subunidade menor do ribossomo. Depois, a subunidade maior também se liga.

Subunidade maior



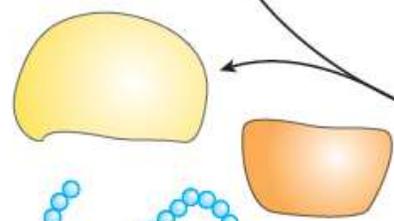
Aminoacil-tRNA

Subunidade menor

5'

3'

mRNA Início Término



3

**Alongamento:** ciclos sucessivos de ligação de aminoacil-tRNA e formação da ligação peptídica ocorrem até o ribossomo atingir um códon de parada.

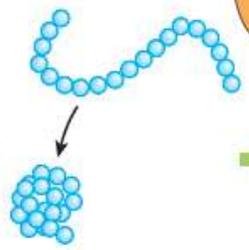
1) **Formação dos aminoacil-tRNAs**

2) **Iniciação**

3) **Alongamento**

4) **Término**

5) **Enovelamento**



## Síntese de proteínas

O processo envolve a mudança de alfabeto mRNA → polipeptídio

→ Aumenta a probabilidade de erros

→ Deve ser rápido o suficiente para a demanda celular: 50 aminoácidos/seg em *E. coli*

### Frequência de erro aceitável de síntese de proteínas

$p = (1-\epsilon)^n$

|  |             | Probability of synthesizing an error-free protein |       |         |
|--|-------------|---|-------|---------|
|  |             | $p$   |       |         |
|  |             | Number of amino acid residues                     |       |         |
| Frequency of inserting an incorrect amino acid |             | 100   | 300   | 1000    |
| $\epsilon$                                     | → $10^{-2}$ | 0.366   | 0.049 | 0.000   |
|  | $10^{-3}$   | 0.905   | 0.741 | 0.368 ← |
|  | $10^{-4}$   | 0.990   | 0.970 | 0.905   |
|  | $10^{-5}$   | 0.999   | 0.997 | 0.990   |

Frequência de erro menor do que  $<1 \times 10^{-4}$  é adequada

Parte desta acurácia é devido as *Aminoacil tRNA sintetases*

- Especificidade da síntese → capacidade de discriminar aminoácidos similares
- Atividade revisora direcionada

## O Ribossomo

→ São constituídos por duas subunidades

→ **Subunidade Menor** → plataforma para o pareamento entre o AA-tRNA e o mRNA

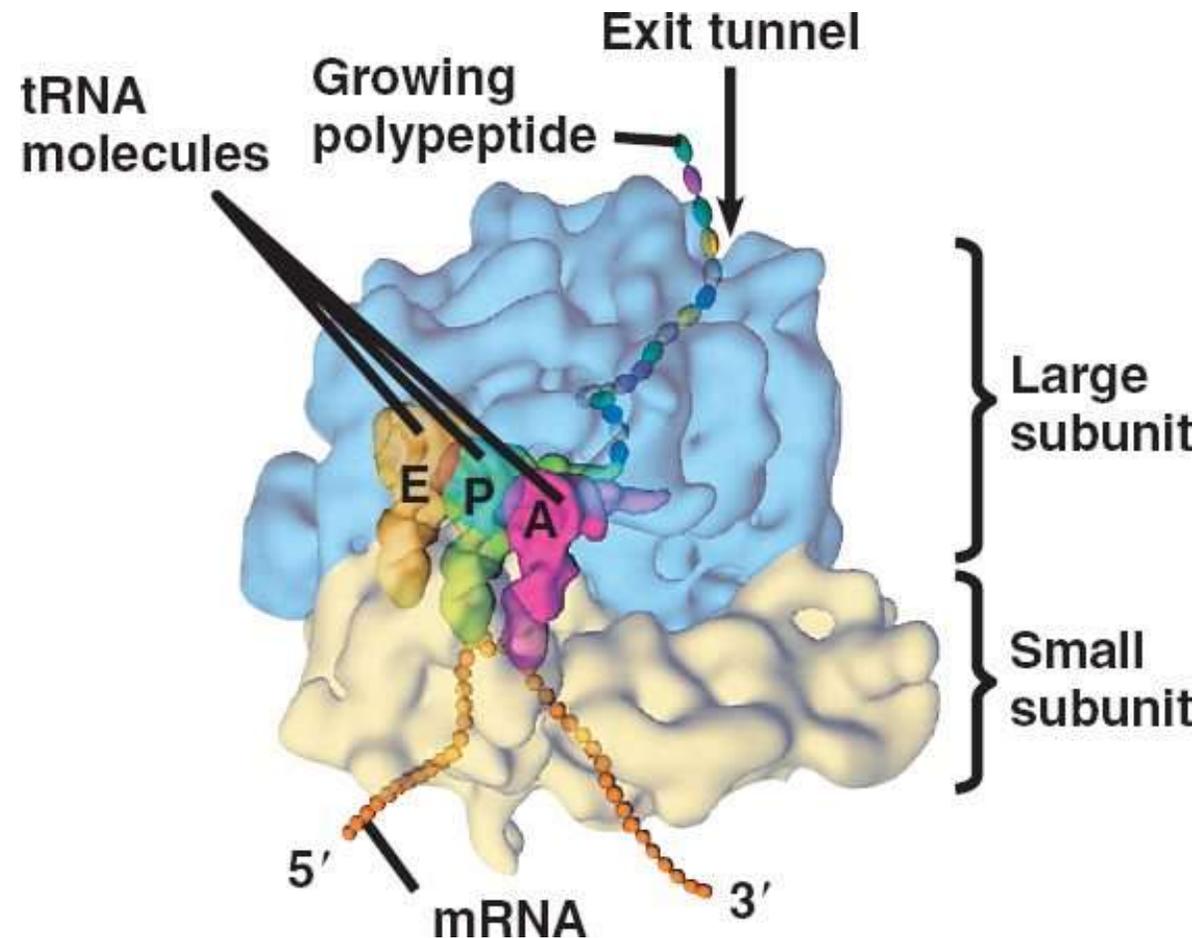
→ **Subunidade Maior** → Responsável pela atividade Peptidil-transferase  
- Formação da ligação peptídica

→ Se reúnem na presença de um mRNA

→ O mRNA é puxado conforme ocorre o pareamento com os adaptadores corretos de tRNAs

- Depende da interação + entre o tRNA com o códon e da atividade Peptidil-transferase

- Se ocorre o encontro de um códon de terminação e o fator de terminação → hidrólise da ligação aminoacil-tRNA



## O Ribossomo

**Os componentes gerais dos Ribossomos em procariotos**  
**→ 57 proteínas ribossomais (35%) e vários rRNAs (65%)**

RNAs e proteínas que compõem os ribossomos de *E. coli*

| Subunidade | Número de proteínas diferentes | Número total de proteínas | Denominação das proteínas | Número e tipos de rRNA |
|------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| 30S        | 21                             | 21                        | S1-S21                    | 1 (rRNA 16S)           |
| 50S        | 33                             | 36                        | L1-L36*                   | 2 (rRNA 5S e 23S)      |

**→ Os RNAs ribossomais são responsáveis:**

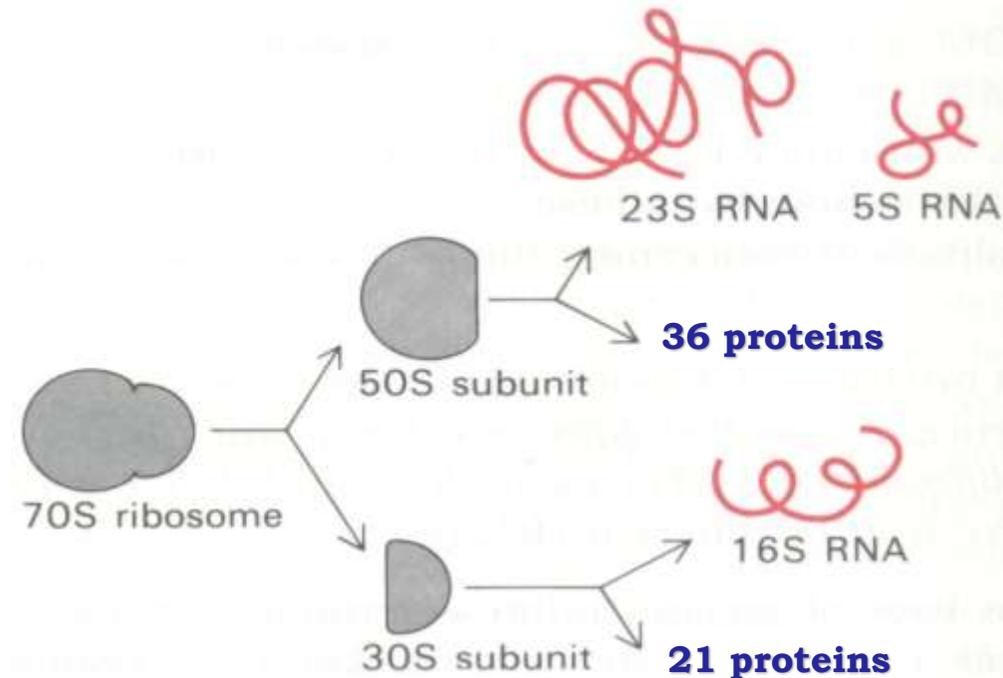
- pela estrutura geral do Ribossomo
- pelo posicionamento dos tRNAs sobre o mRNA

- pela atividade catalítica Peptidil-transferase

**→ são Ribozimas**

**→ As proteínas ribossomais são responsáveis:**

- pela estabilidade do Ribossomo
- pelas mudanças conformacionais do rRNA necessárias para o ciclo reacional

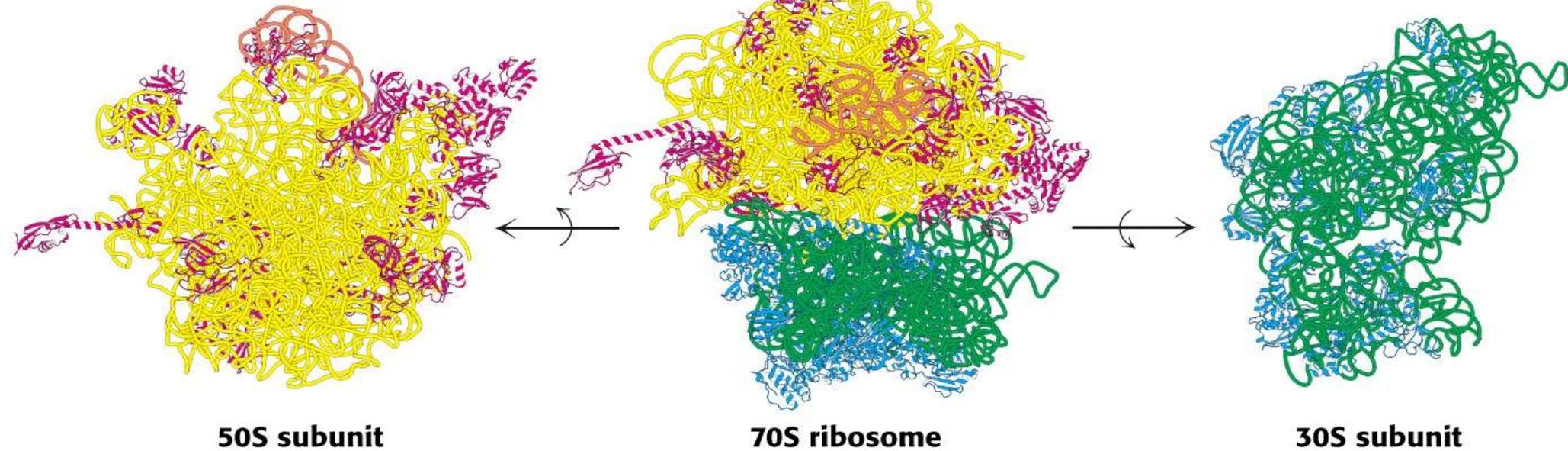


# O Ribossomo

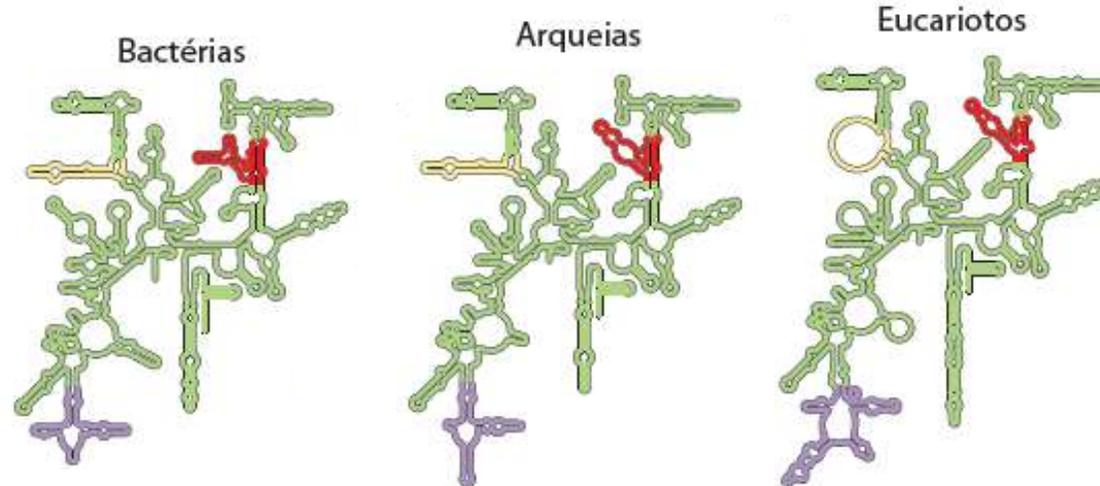
## Estrutura do Ribossomo em procarionto

Verde e Amarelo = rRNA

Azul e Vermelho = Proteínas



**Estrutura 2ndaria da rRNA da subunidade menor**  
→ Padrão de enovelamento conservado principalmente em regiões com função chave



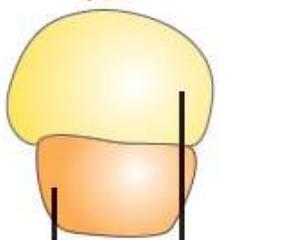
# O Ribossomo

## Diferenças entre os Ribossomos em Procariotos e em Eucariotos

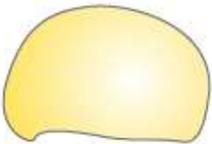
**S = Svedberg**  
**S = Coeficiente de Sedimentação**  
**Relacionado ao tamanho da partícula**

**Ribossomo bacteriano**  
**70S**

$M_r 2,7 \times 10^6$



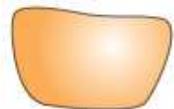
50S



$M_r 1,8 \times 10^6$

rRNA 5S  
(120 nucleotídeos)  
rRNA 23S  
(3.200 nucleotídeos)  
36 proteínas

30S

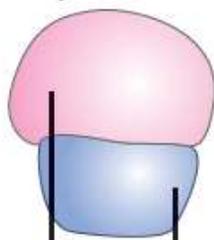


$M_r 0,9 \times 10^6$   
rRNA 16S  
(1.540 nucleotídeos)  
21 proteínas

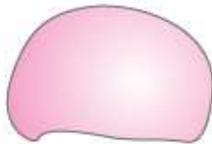
**Ribossomo eucariótico**

**80S**

$M_r 4,2 \times 10^6$



60S



$M_r 2,8 \times 10^6$

rRNA 5S  
(120 nucleotídeos)  
rRNA 28S  
(4.700 nucleotídeos)  
rRNA 5,8S  
(160 nucleotídeos)  
47 proteínas

40S

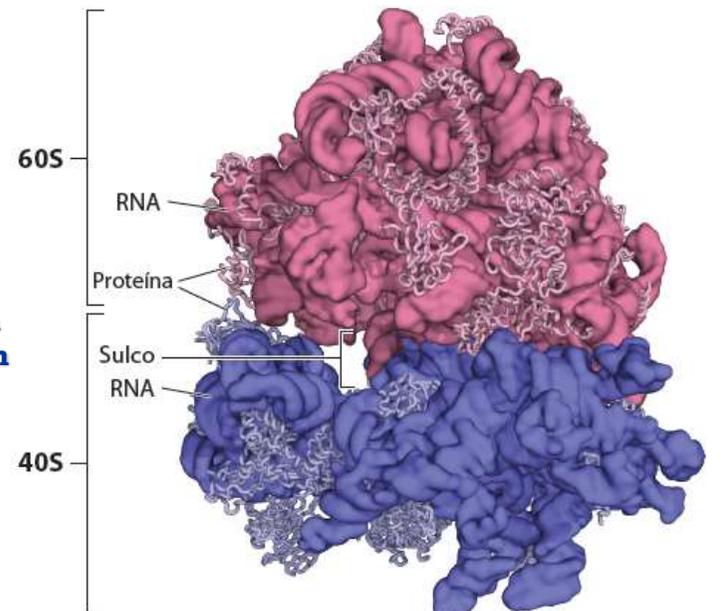
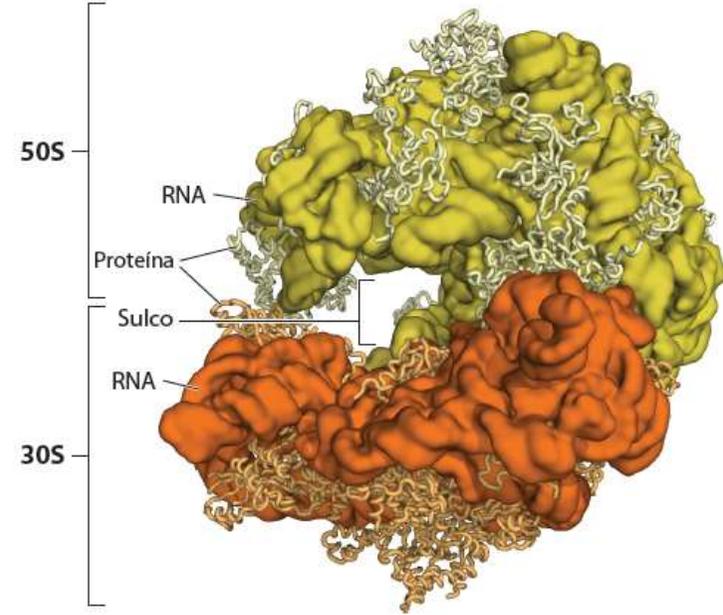


$M_r 1,4 \times 10^6$   
rRNA 18S  
(1.900 nucleotídeos)  
33 proteínas



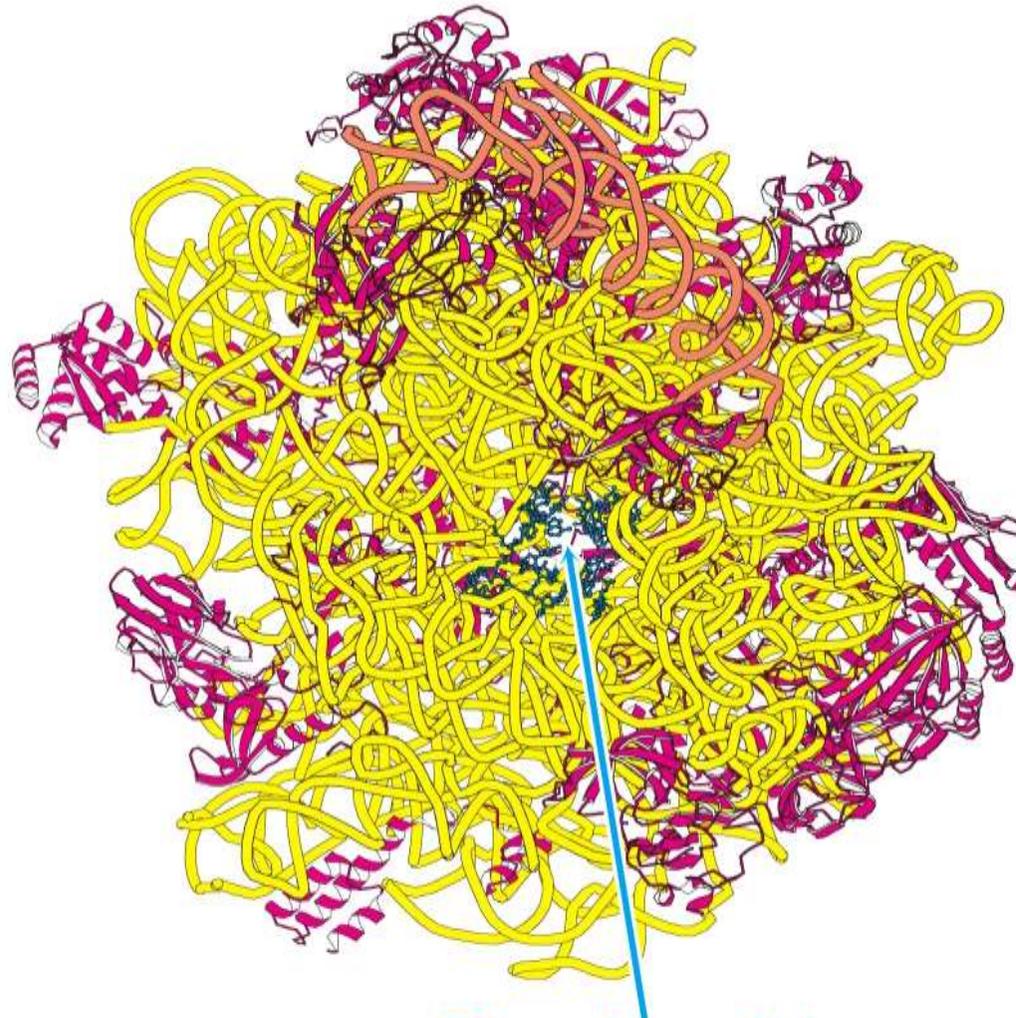
**Ada E. Yonath** **Thomas Steitz** **Venkatraman Ramakrishnan**

**Nobel Prize Winners, Chemistry, 2009**



## O Ribossomo

→ **Sítio ativo da peptidil-transferase**



Site of peptide  
bond formation

- **Sítio ativo da Peptidil-transferase está localizado no rRNA 23 S**
- **Possui as características gerais do sítio ativo das enzimas protéicas**
- **Catalisador ácido-base → anel da base nitrogenada adenina age como base e retira um próton do grupo  $\text{NH}_2$  → Ativação do nucleófilo**
- **pKa da adenina depende do sítio ativo como faz o anel imidazólico da Histidina**

## O Ribossomo

O Ribossomo possuem contém 4 sítios de ligação de moléculas de RNAs

→ 1 sítio para o mRNA

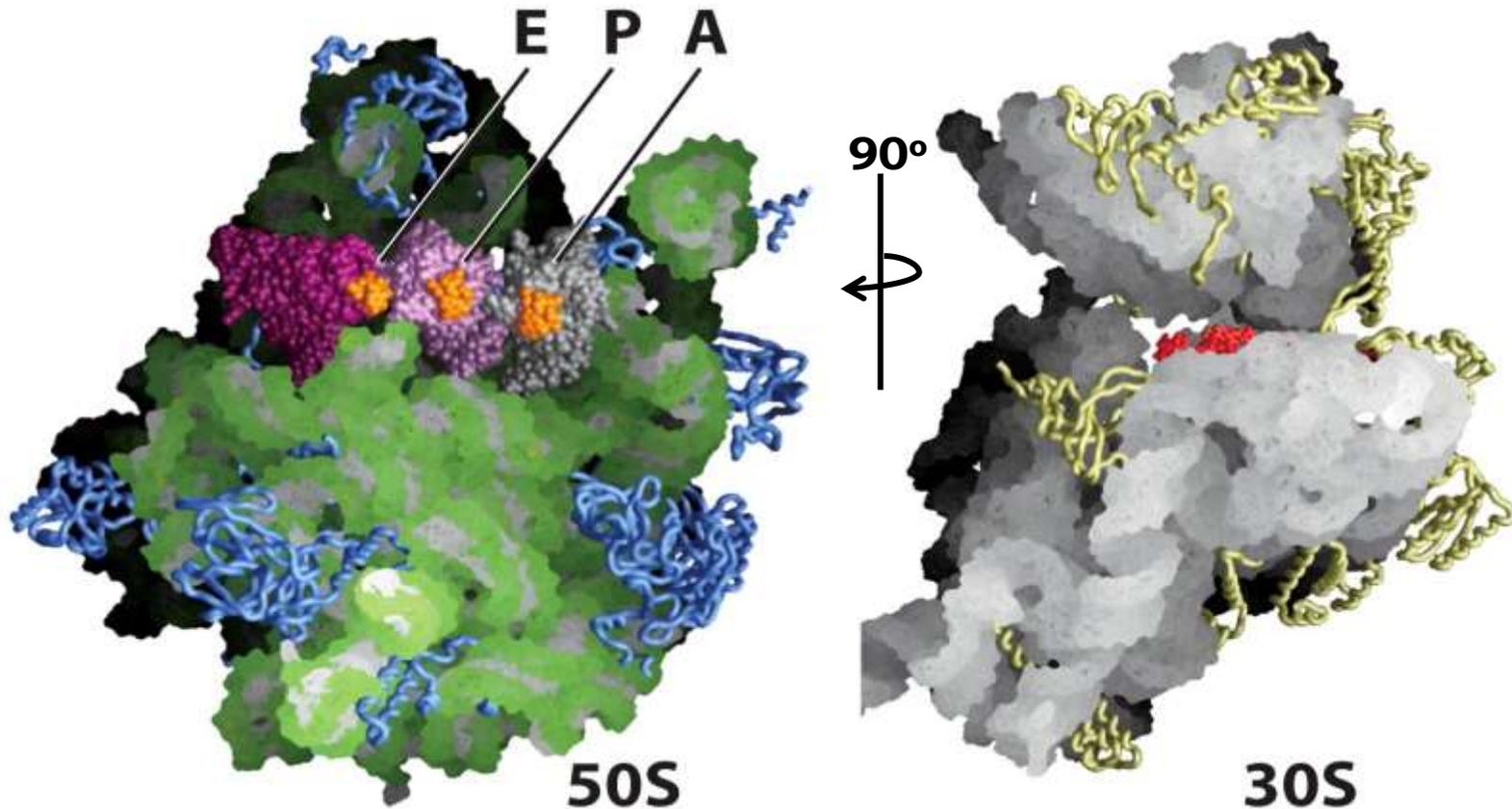
→ Sítio P (Peptidil)

→ Sítios A, P e E são específicos para tRNAs e formados de rRNAs

→ → Sítios A e P são específicos para aminoacil-tRNAs

→ Sítio A (Acesso)

→ Sítio E (Exit = Saída)



## O Ribossomo

→ Os sítios A, P e E estão localizados na Subunidade Maior

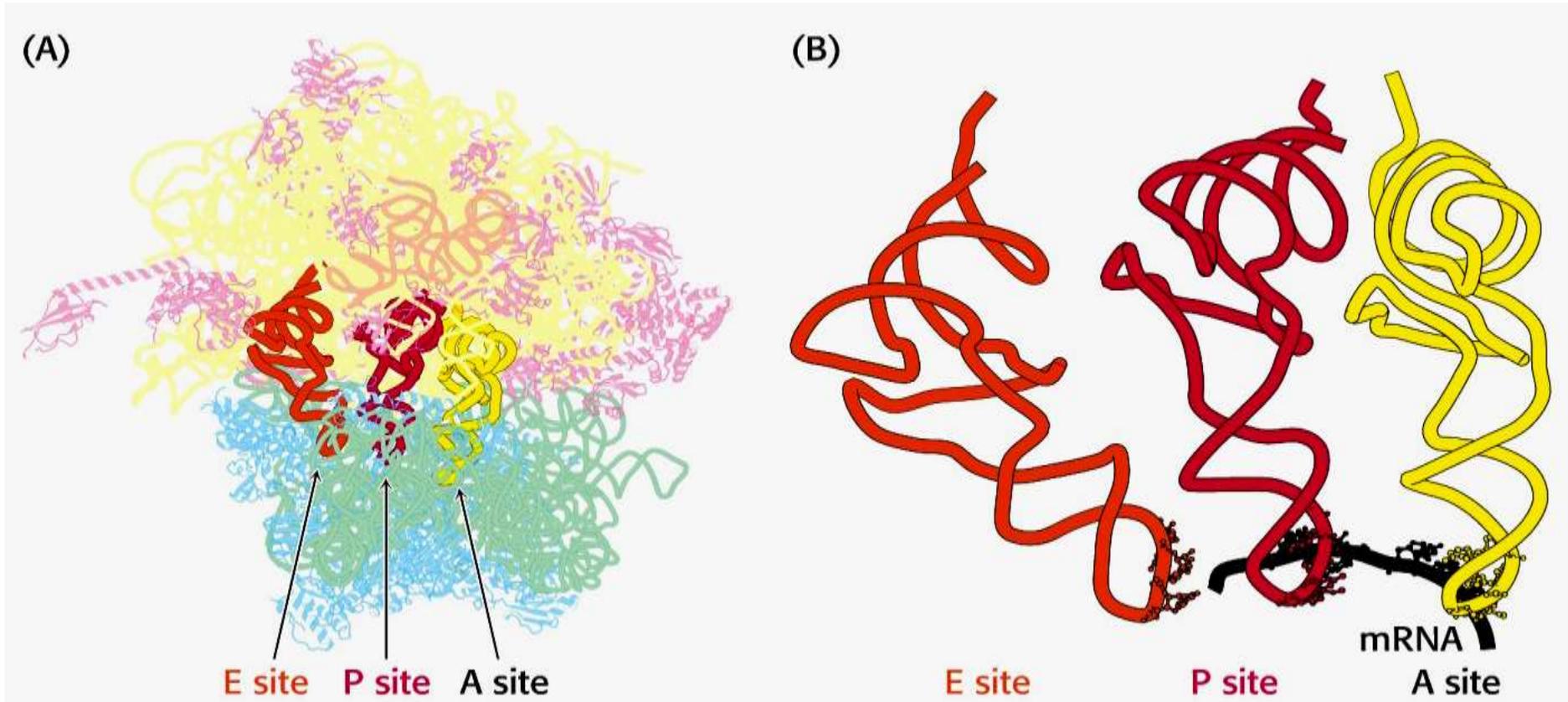
- Sítios A e P se projetam na Subunidade Menor

→ O mRNA fica ligado à Subunidade Menor → Plataforma para o mRNA

Os sítios estão muito próximos no complexo → mantêm a fase de leitura adequada

→ Os sítios A e P mantêm o tRNA ligado ao mRNA

- pareamento complementar códon-anticódon

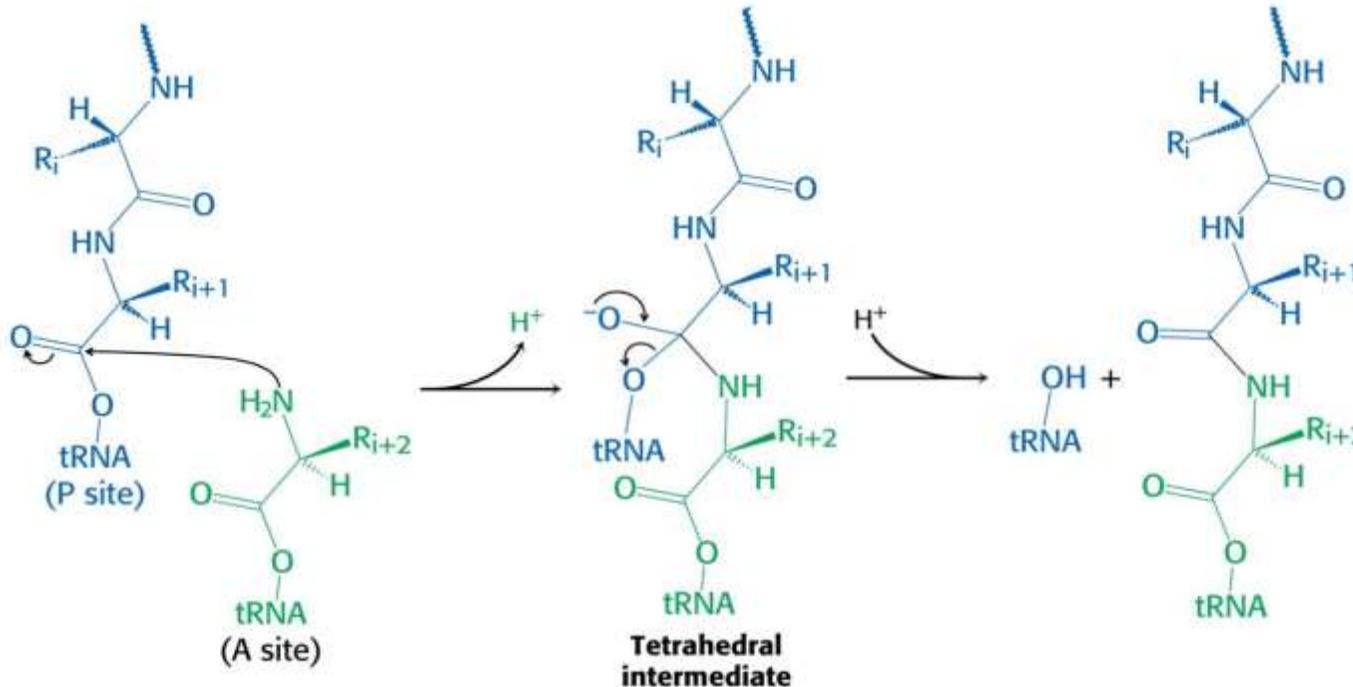


## O Ribossomo

→ A Reação Catalisada pela Peptidil-transferase

- Mecanismo reacional envolve uma substituição nucleofílica em acilas
- Transferência de um Eletrófilo de um tRNA abandonador para outro tRNA

→ Síntese da cadeia polipeptídica crescente da extremidade  $\text{NH}_2$ -terminal livre para a extremidade  $\text{COOH}$ -terminal ligado ao tRNA.



→ Grupo  $\text{NH}_2$  do AA-tRNA  $n+1$  livre ataca o grupo  $\text{COOH}$  da extremidade do polipeptídio → liberação o tRNA  $n$  → grupo Abandonador

→ Formação do Polipeptídio alongado em mais 1 AA ligado ao último tRNA

→ o AA  $n$  carrega a energia necessária para a reação  $n + 1$

→ Extremidade Carboxil permanece ativada com o tRNA

## Fases da síntese de proteínas

### Components Required for the Five Major Stages of Protein Synthesis in *E. coli*

| Stage                                       | Essential components   |
|---|--|
| 1. Activation of amino acids                | 20 amino acids<br>20 aminoacyl-tRNA synthetases<br>20 or more tRNAs<br>ATP<br>Mg <sup>2+</sup>   |
| 2. Initiation                               | mRNA<br>N-Formylmethionyl-tRNA<br>Initiation codon in mRNA (AUG)<br>30S ribosomal subunit<br>50S ribosomal subunit<br>Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3)<br>GTP<br>Mg <sup>2+</sup>   |
| 3. Elongation                               | Functional 70S ribosome (initiation complex)<br>Aminoacyl-tRNAs specified by codons<br>Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G)<br>GTP<br>Mg <sup>2+</sup>  |
| 4. Termination and release                  | Termination codon in mRNA<br>Polypeptide release factors (RF <sub>1</sub> , RF <sub>2</sub> , RF <sub>3</sub> )<br>ATP   |
| 5. Folding and posttranslational processing | Specific enzymes, cofactors, and other components for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, and attachment of phosphate, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups |

### Fases do ribossomo

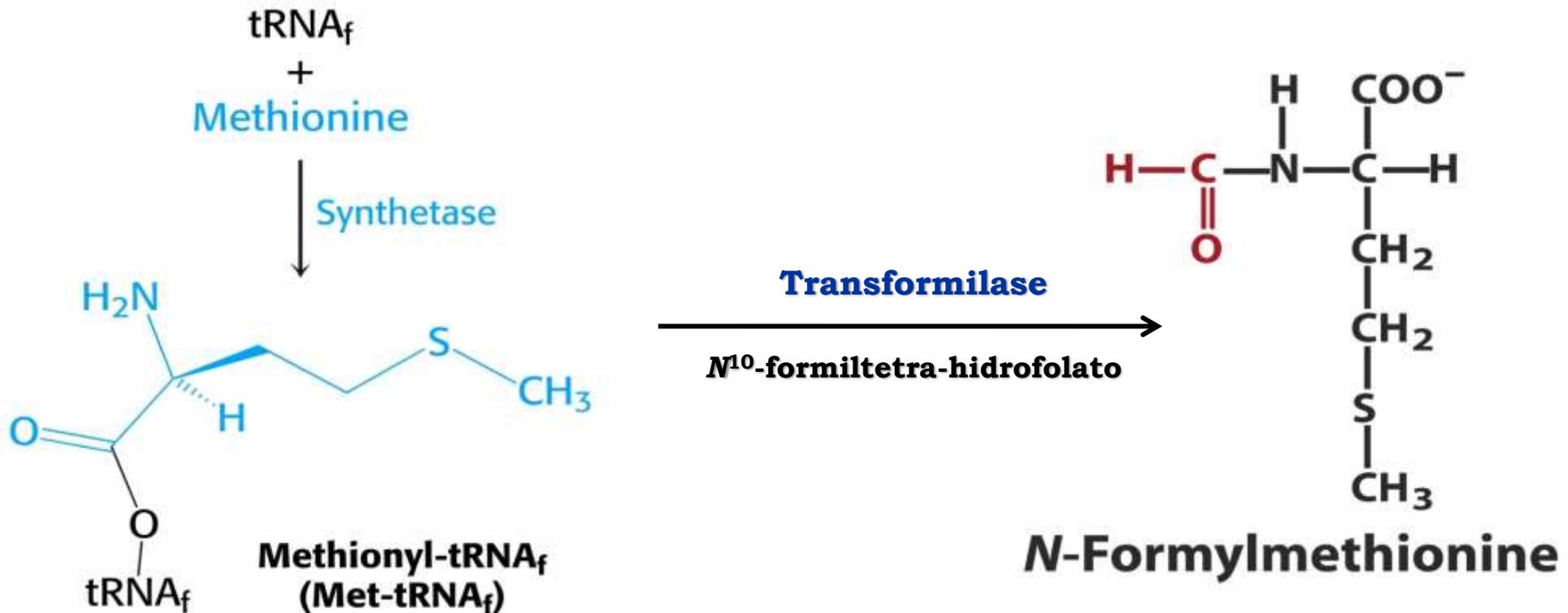
## Iniciação da síntese protéica

- A definição da fase de leitura é essencial para a tradução correta
- representa o último passo passível de regulação na expressão de proteínas

→ Para procariontos

- códon AUG → Metionina → Formil-metionina

- tRNA iniciador especial → diferente do Met-tRNA para AUG do interior da proteína

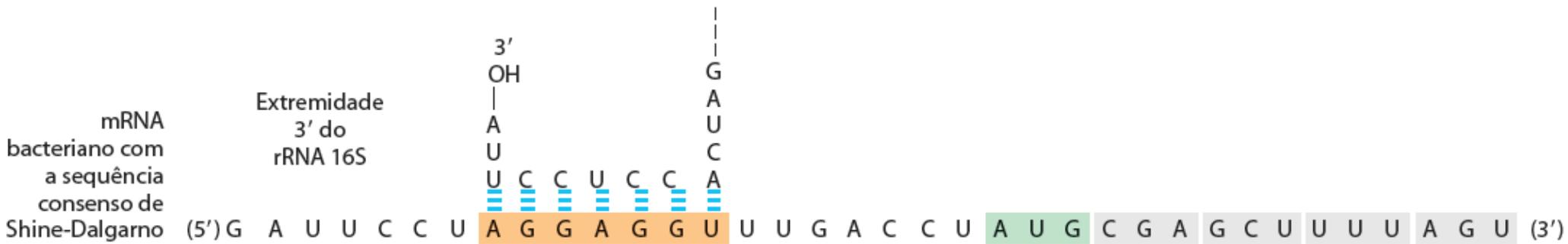
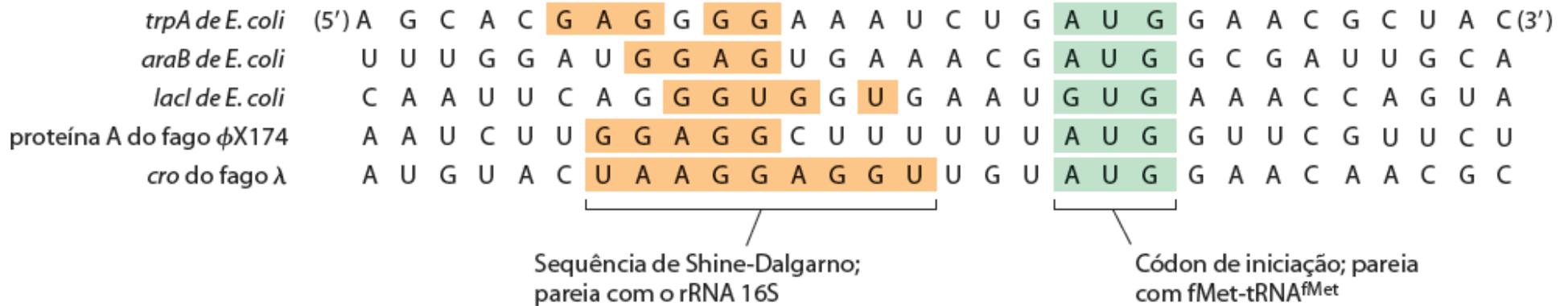


# Iniciação da síntese protéica

→ Para procariotos

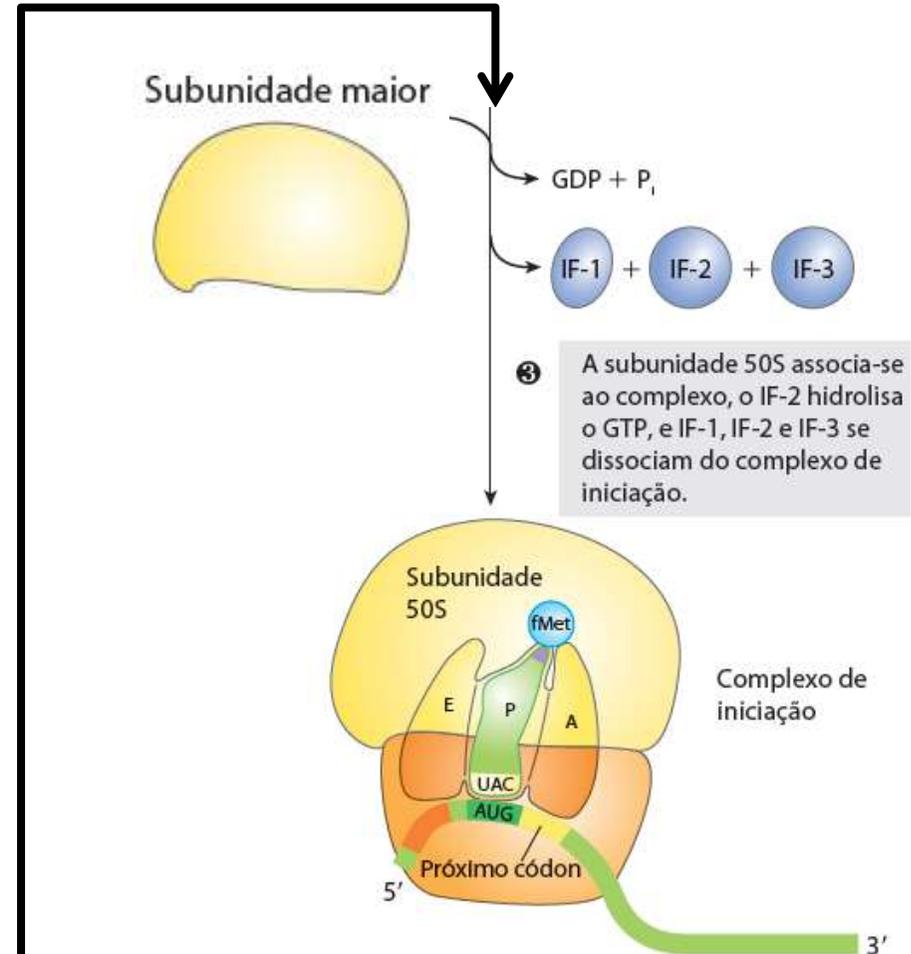
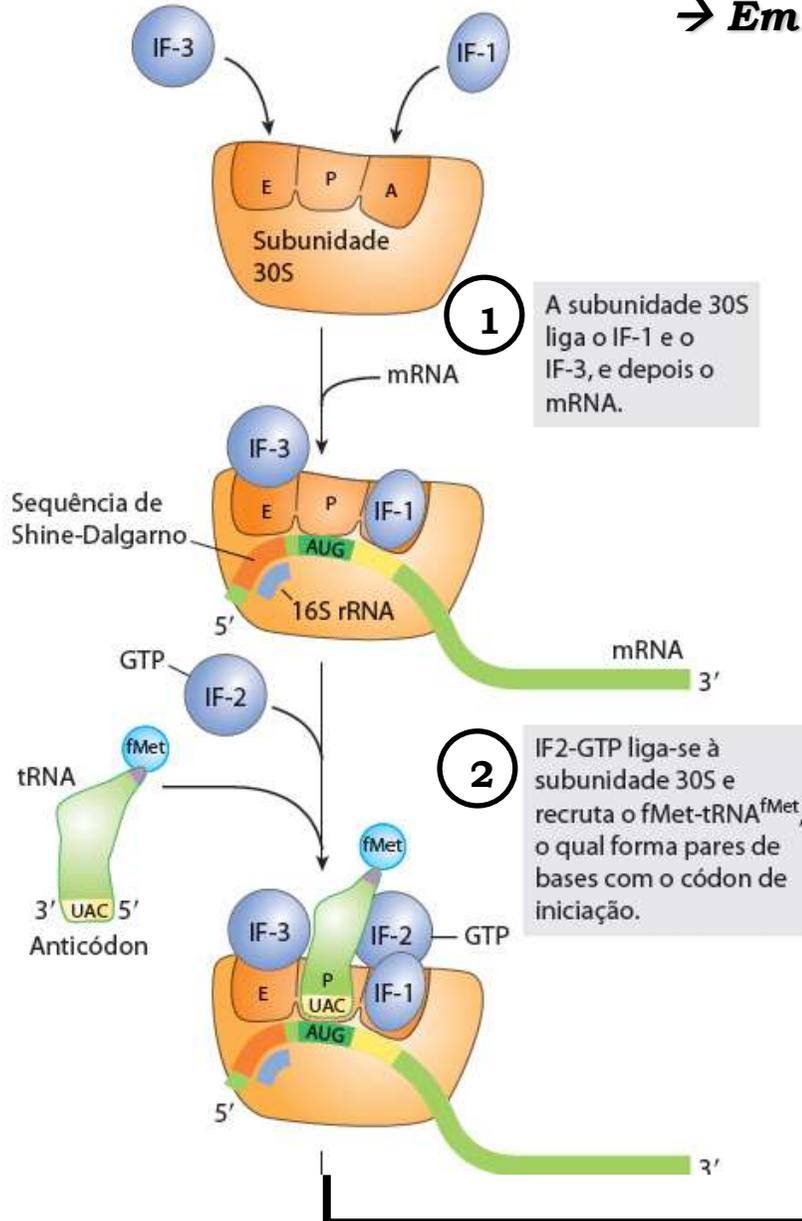
→ Depende da Sequência de Shine-Dalgarno

- Sequência rica em purinas a ~ -10 do códon de iniciação
- forma pareamento com a Sequência UCCUCCA do rRNA 16S na subunidade menor
- posiciona o códon AUG na posição adequada
- possibilita a tradução em mRNAs policistrônicos



# Iniciação da Síntese Proteica

→ Em procariontos



→ Somente o fMet-tRNA<sup>fMet</sup> liga diretamente no sítio P

→ Todos os demais AA-tRNAs ligam no sítio A

## Iniciação da Síntese Protéica

→ Para eucariotos → Requer pelo menos 12 fatores de iniciação em eucariotos (eIFs)

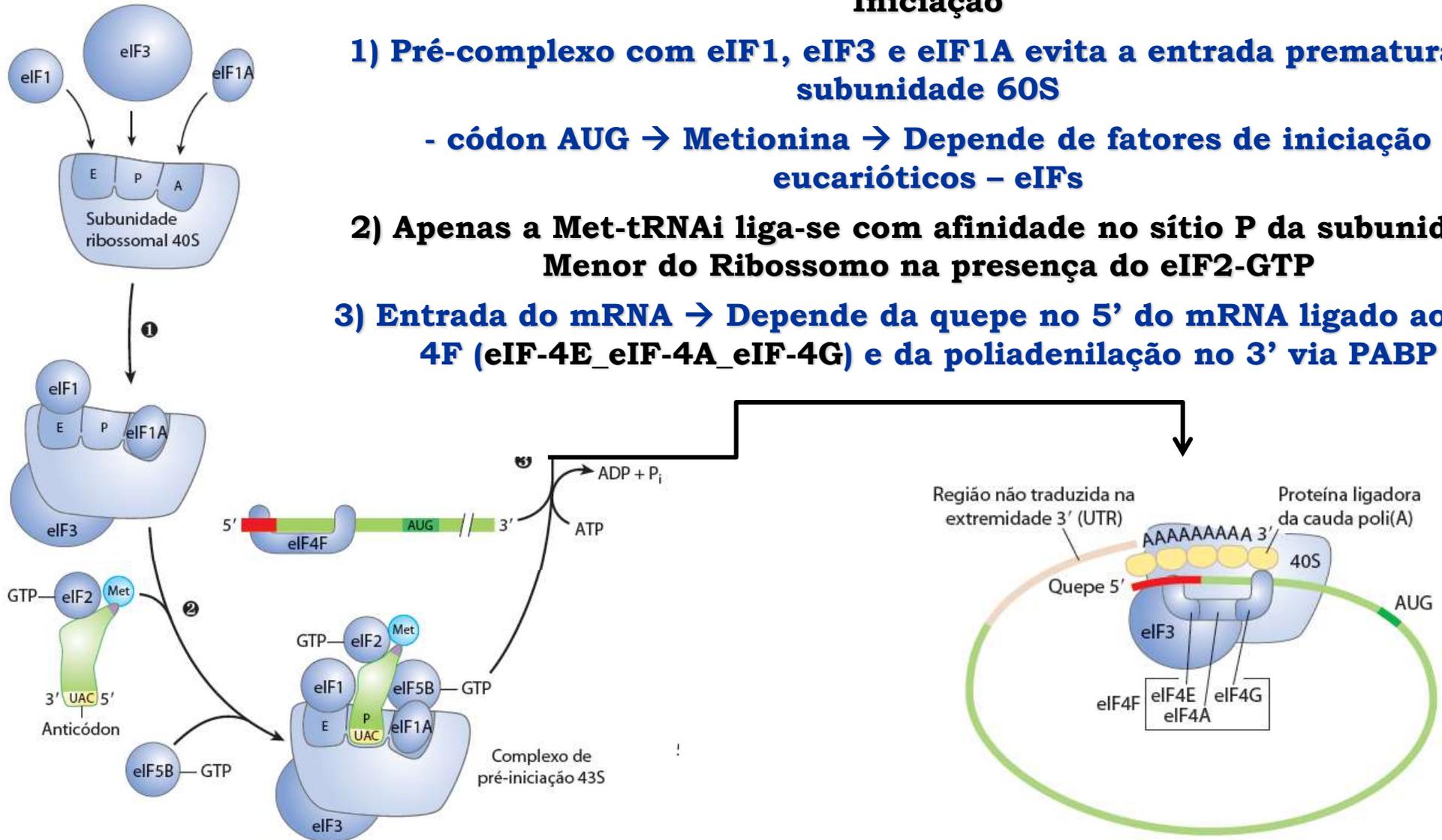
### Iniciação

1) Pré-complexo com eIF1, eIF3 e eIF1A evita a entrada prematura da subunidade 60S

- códon AUG → Metionina → Depende de fatores de iniciação eucarióticos – eIFs

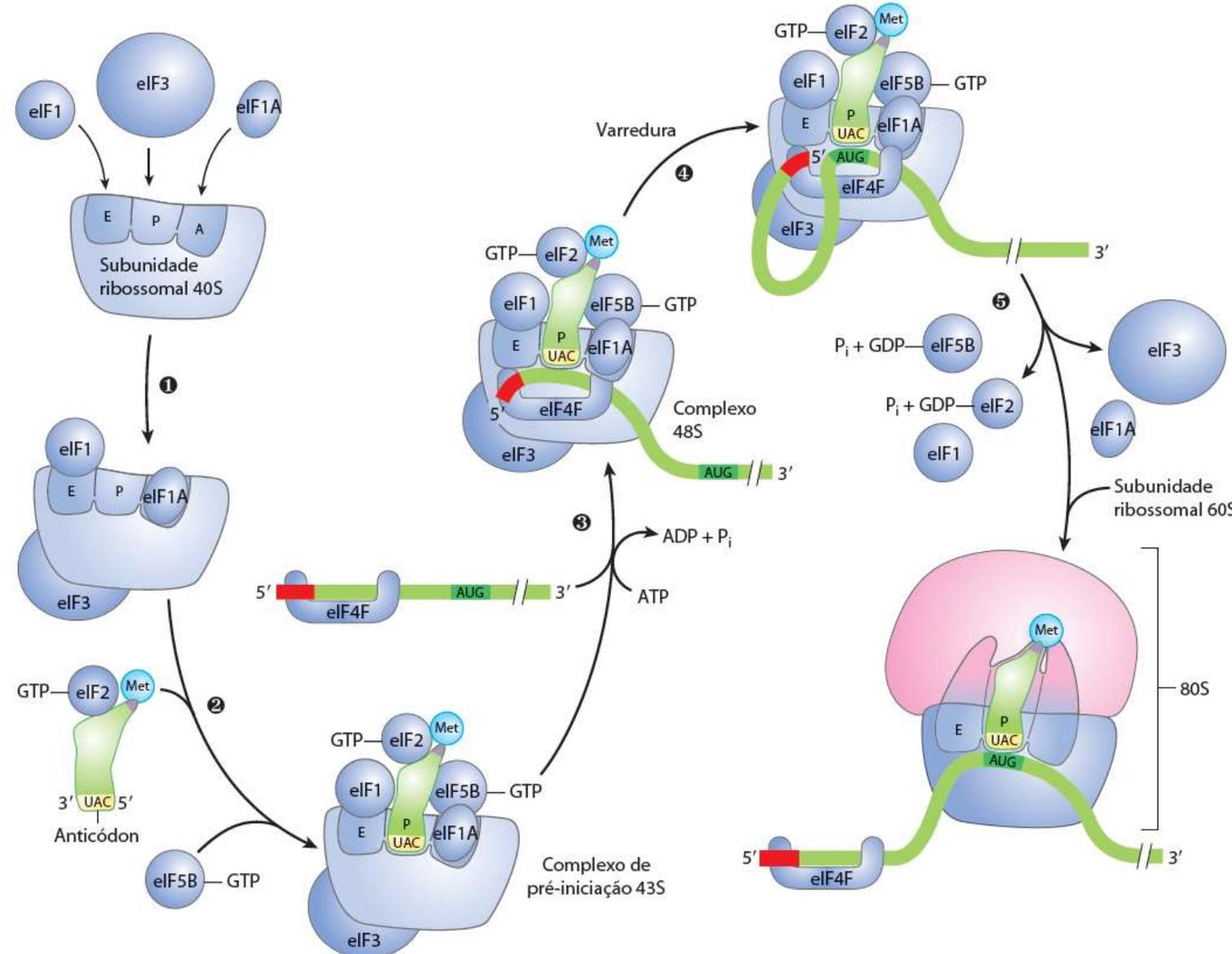
2) Apenas a Met-tRNA<sub>i</sub> liga-se com afinidade no sítio P da subunidade Menor do Ribossomo na presença do eIF2-GTP

3) Entrada do mRNA → Depende da quepe no 5' do mRNA ligado ao eIF-4F (eIF-4E\_eIF-4A\_eIF-4G) e da poliadenilação no 3' via PABP



# Iniciação da Síntese Protéica

→ Para eucariotos



→ A subunidade Menor varre o mRNA para localizar o códon AUG  
→ sentido 5' → 3' do mRNA

→ Formação do par códon-anticódon com o Met-tRNA<sub>i</sub> → no sítio P da subunidade Menor

→ Auxiliado por outros fatores de iniciação e por uma RNA-helicase (eIF4A)

→ Hidrólise de GTP pela eIF2 → dissociação de vários eIFs do complexo → a entrada da subunidade maior

## Iniciação da Síntese Protéica

→ *Para eucariotos*

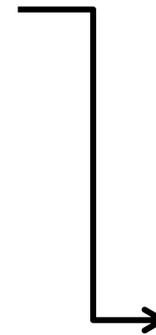
→ **Principal etapa diferencial para procariotos**

- **Não depende da Sequência consenso em torno do 1° AUG**
- **Conta com um número maior de eIFs e o mRNA é processado no núcleo**
- **Mecanismo de produção de diferentes proteínas a partir de um mesmo Gene**
- **Sequência sinal para importação de proteínas em organelas**

Fatores proteicos necessários para a iniciação da tradução em células bacterianas e eucarióticas

| Fator            | Função  |
|------------------|---|
| <b>Bactérias</b> |   |
| IF-1             | Impede a ligação prematura do tRNA no sítio A   |
| IF-2             | Facilita a ligação do fMet-tRNA <sup>fMet</sup> à subunidade 30S do ribossomo   |
| IF-3             | Liga-se à subunidade 30S; impede a associação prematura da subunidade 50S; aumenta a especificidade do sítio P pelo fMet-tRNA <sup>fMet</sup> |

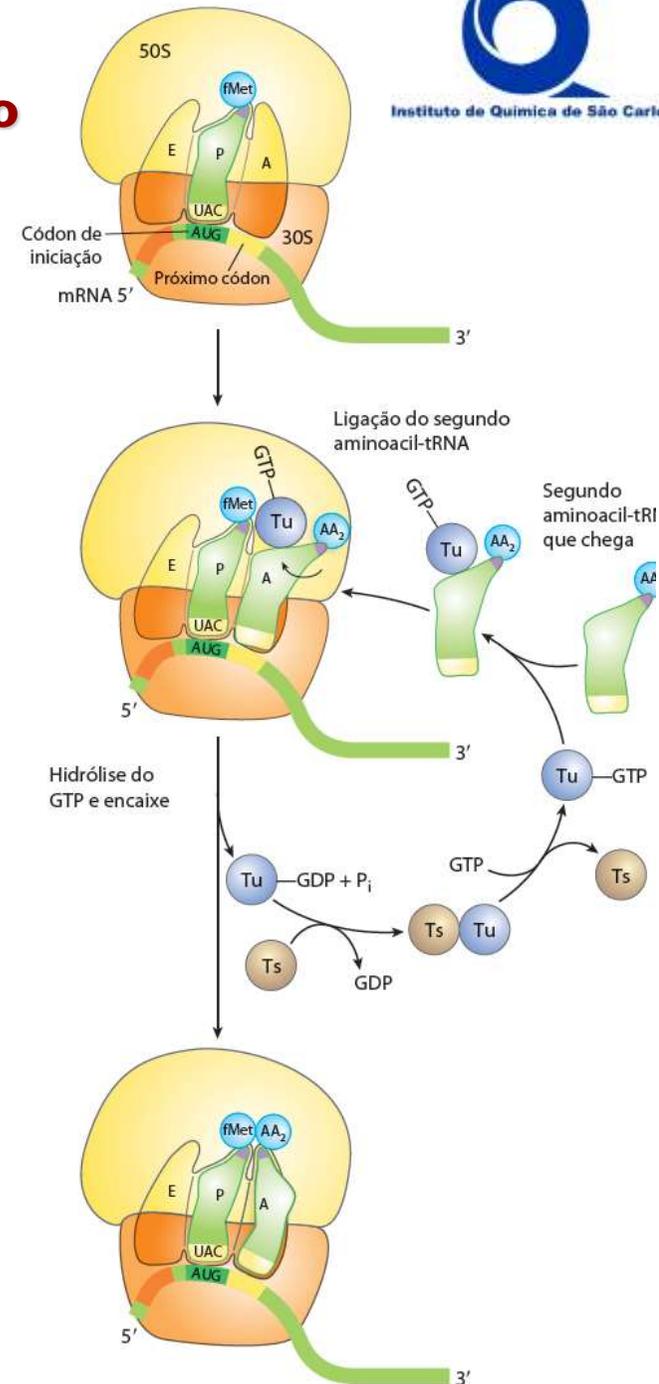
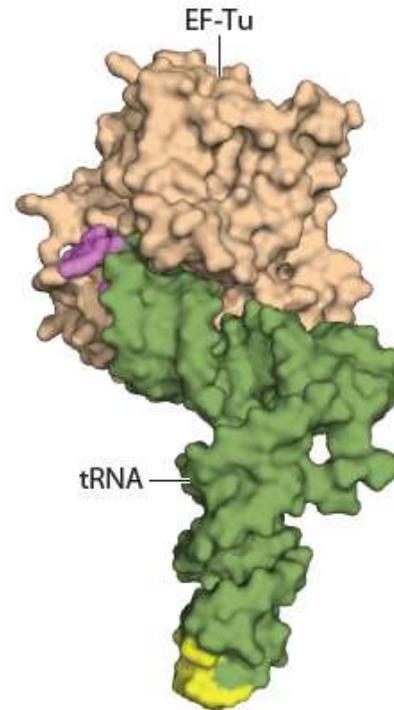
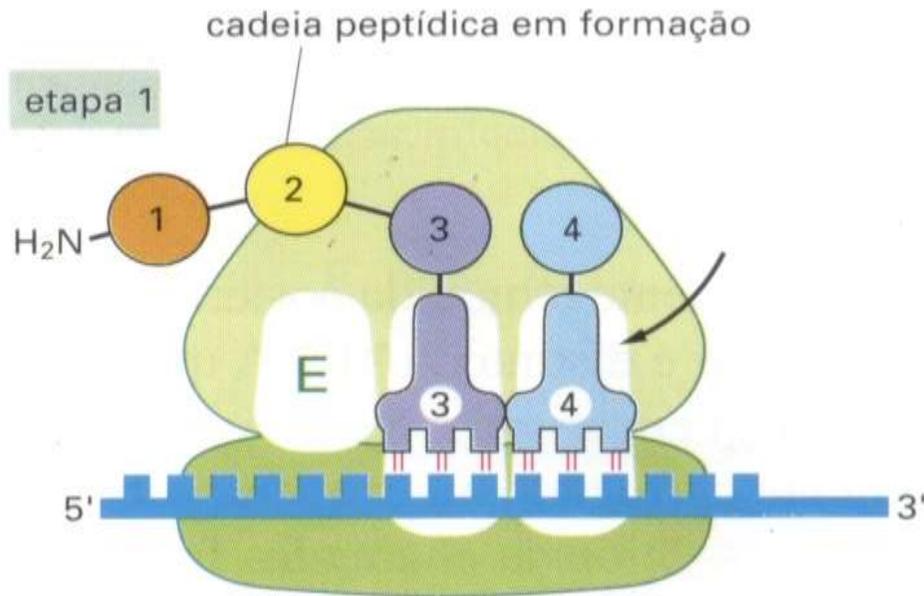
|              |  |
|--------------|--|
| eIF1         | Liga-se ao sítio E da subunidade 40S; facilita a interação entre o complexo ternário eIF2-tRNA-GTP e a subunidade 40S  |
| eIF1A        | Homólogo ao IF-1 de bactérias; impede a ligação prematura do tRNA no sítio A   |
| eIF2         | GTPase; facilita a ligação do Met-tRNA <sup>Met</sup> iniciador à subunidade ribossomal 40S  |
| eIF2B*, eIF3 | Primeiros fatores a se ligarem na subunidade 40S; facilitam as etapas subsequentes   |
| eIF4F        | Complexo que consiste em eIF4E, eIF4A e eIF4G  |
| eIF4A        | Atividade de RNA-helicase; remove estruturas secundárias do mRNA para permitir a ligação à subunidade 40S; faz parte do complexo eIF4F   |
| eIF4B        | Liga-se ao mRNA; facilita a varredura do mRNA para localizar o primeiro AUG  |
| eIF4E        | Liga-se ao quepe 5' do mRNA; faz parte do complexo eIF4F   |
| eIF4G        | Liga-se ao eIF4E e à proteína ligante de poli(A) (PABP); faz parte do complexo eIF4F   |
| eIF5*        | Promove a dissociação de vários outros fatores de iniciação da subunidade 40S antes que ocorra a associação dessa com a subunidade 60S para formar o complexo de iniciação 80S |
| eIF5b        | GTPase homóloga ao IF-2 de bactérias; promove a dissociação dos fatores de iniciação antes da montagem final do ribossomo  |



# Ciclo reacional = Elongação

→ Envolve 3 etapas principais no modo extensão da cadeia polipeptídica

1º Etapa → Ligação do AA-tRNA-EFTu-GTP ao sítio A  
→ ligação do tRNA carregando o AA n + 1  
- sítios A e P contém tRNAs adjacentes ligados



# Ciclo reacional = Elongação

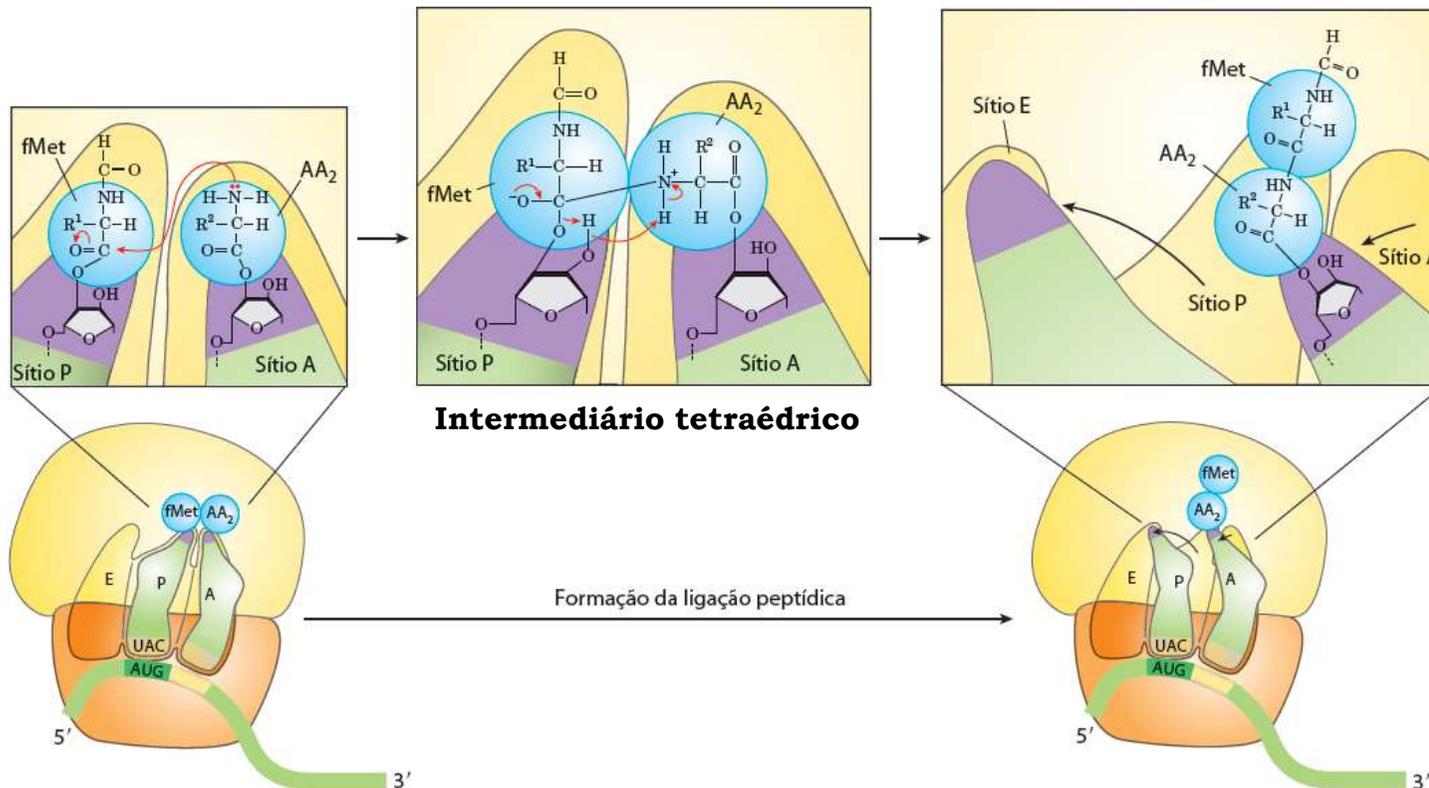
## 2º Etapa → Formação da ligação Peptídica

→ o AA-tRNA no sítio P sofre o ataque nucleofílico do NH<sub>2</sub> do AA-tRNA no sítio A

- rompimento da ligação éster do AA-tRNA no sítio P fornece a energia para a formação da ligação peptídica

- Catálise por orientação e proximidade do AA-tRNA no sítio P e o AA-tRNA no sítio A

→ Uma série de modificações conformacionais no complexo desloca a subunidade maior em relação à menor formando um estado híbrido



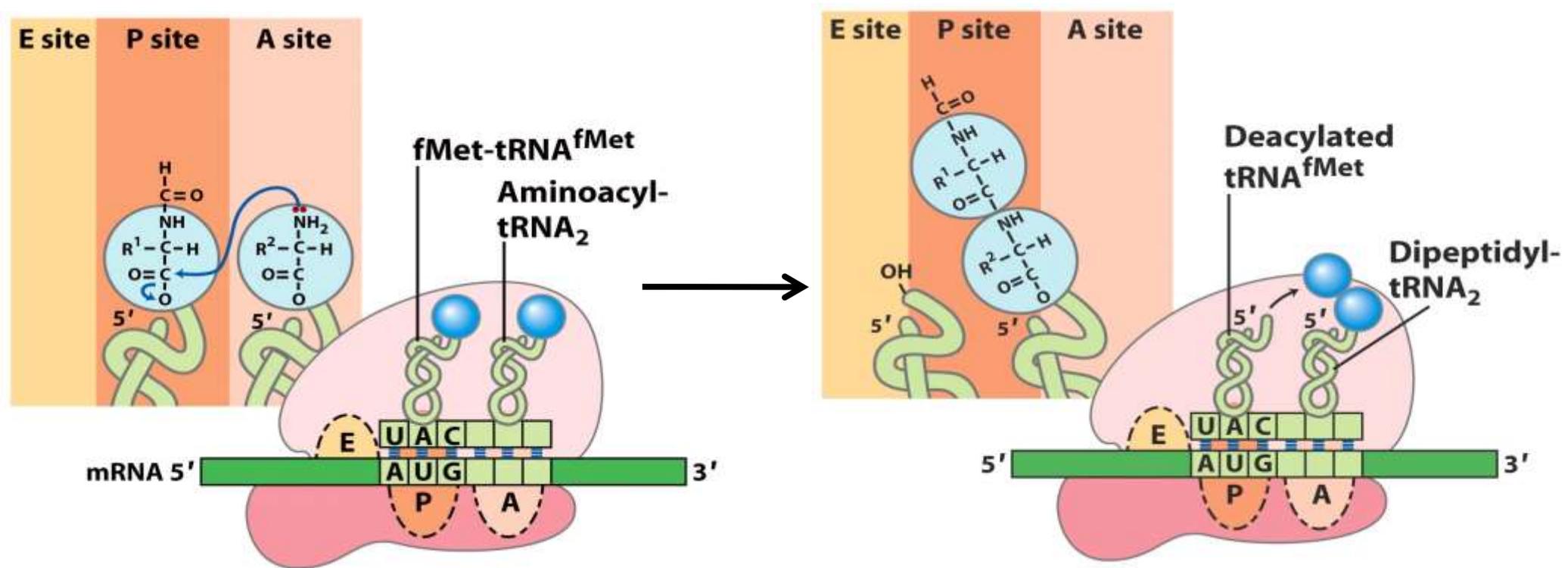
→ Movimento dos tRNAs adjacentes dos sítios P/A para os sítios E/P

- Etapa auxiliada pelo EF-G → dependente de hidrólise de GTP

# Ciclo reacional = Elongação

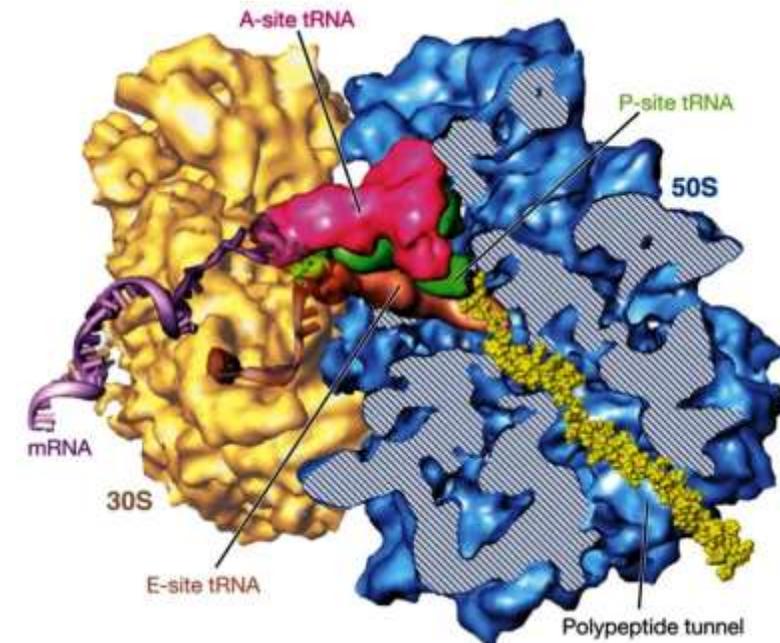
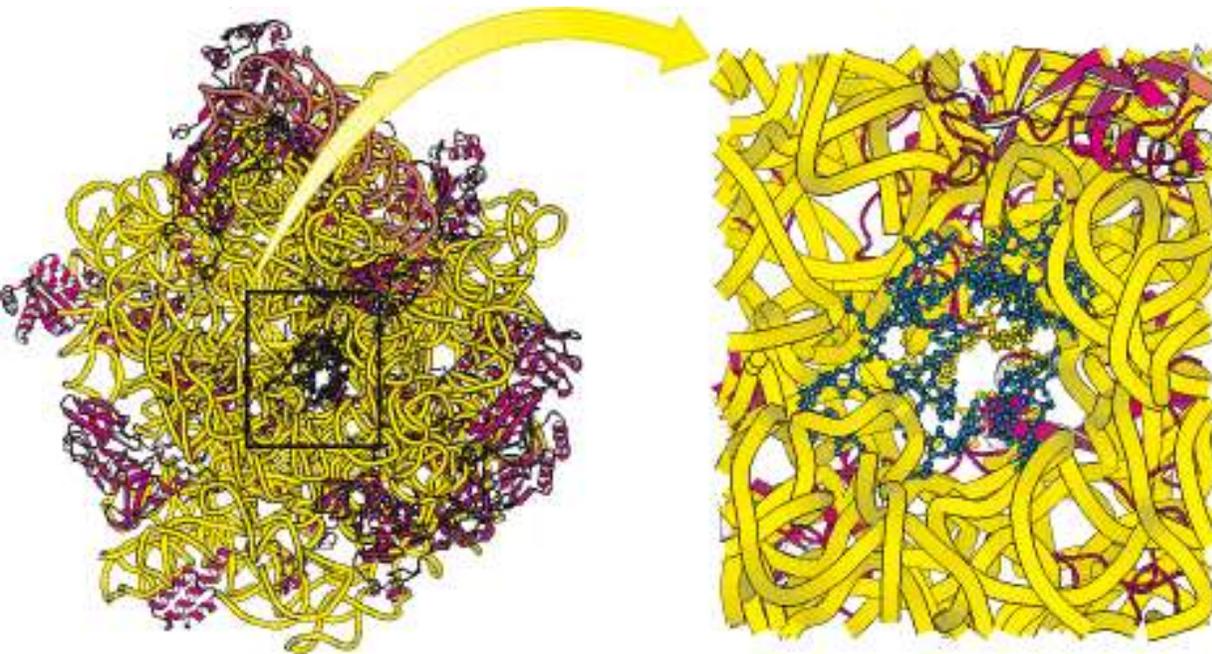
2º Etapa → Formação da ligação Peptídica

A cadeia crescente está em um túnel que “prende” este peptídeo  
Formação dos estados ‘híbridos’



## Ciclo reacional = Elongação

- túnel forma um mosaico hidrofóbico e hidrofílico → camada em “teflon”
  - Evita contatos com a proteína crescente
- enovelamento concomitante ao crescimento da cadeia

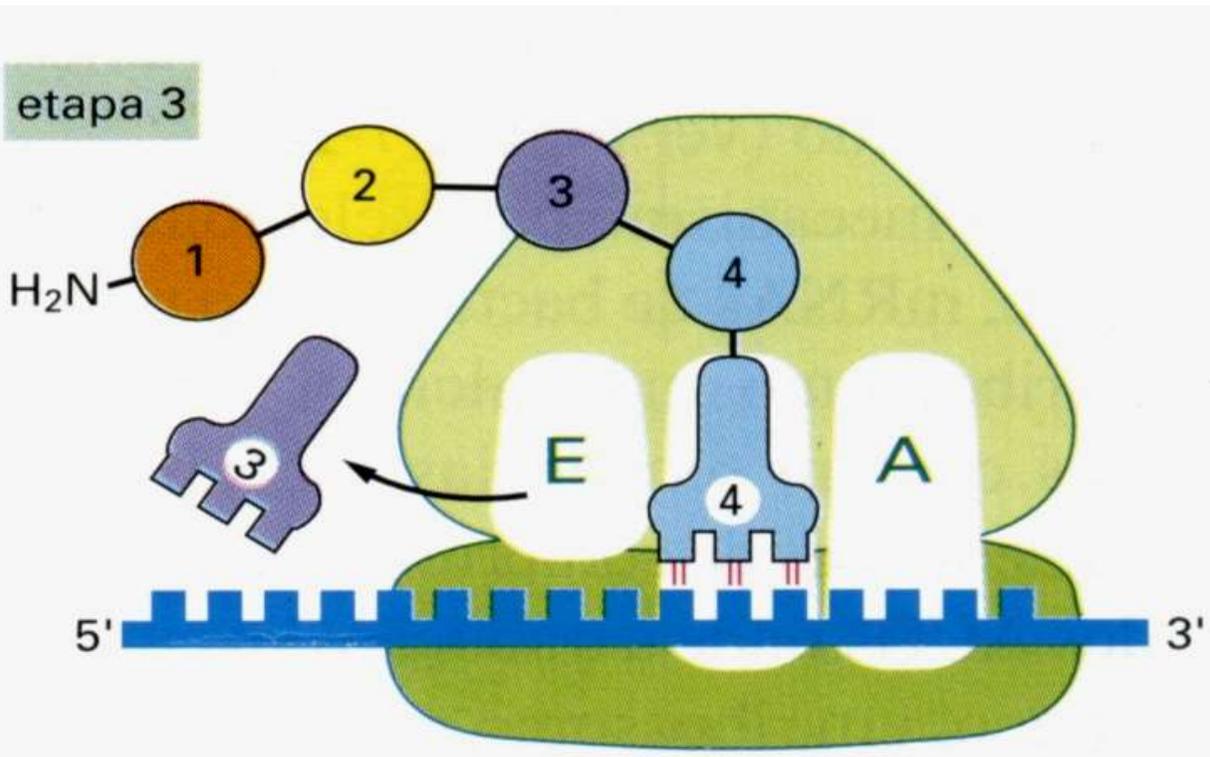


## Ciclo reacional = Elongação

### 3º Etapa → Translocação do Ribossomo

- **Modificações conformacionais adicionais deslocam o mRNA em 3 nucleotídeos no sentido do sítio P**

→ Avanço dos tRNAs adjacentes no estado híbrido P/A para P e do E/P para E  
 - reposicionamento do mRNA para novo contato códon-anticódon no sítio A



→ repetição da 1º etapa →  
 fechou o ciclo

- O ciclo de extensão envolve o contato de dois tRNAs com 3 sítios de ligação cada

→ 6 sítios de ligação para tRNAs

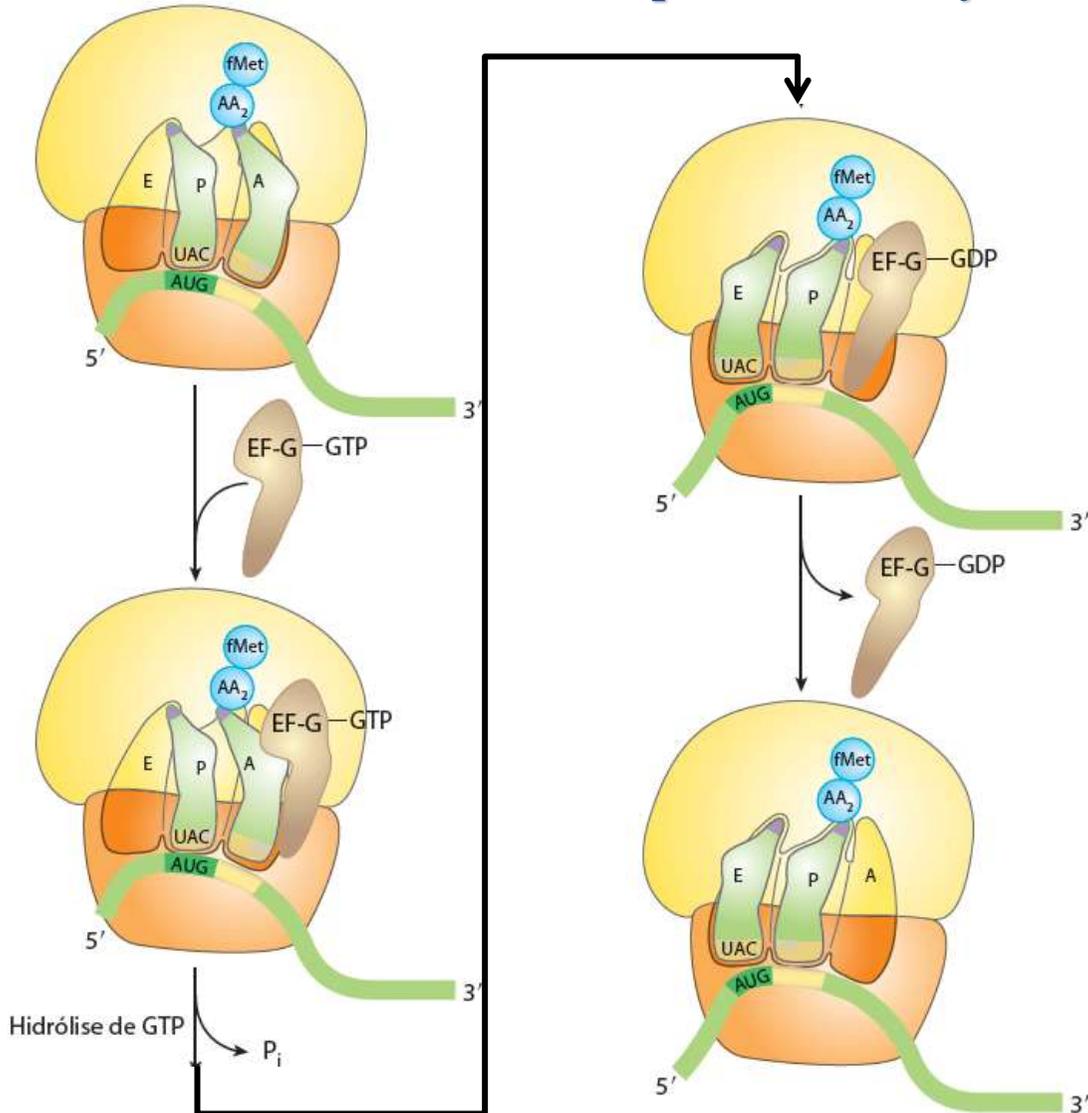
→ 3 sítios de ligação híbridos

- inicial A/T → AA → A/P → PP →  
 P/E → saída EE

# Ciclo reacional = Elongação

3º Etapa → Translocação do Ribossomo

Necessária para a mudança dos códons de leitura

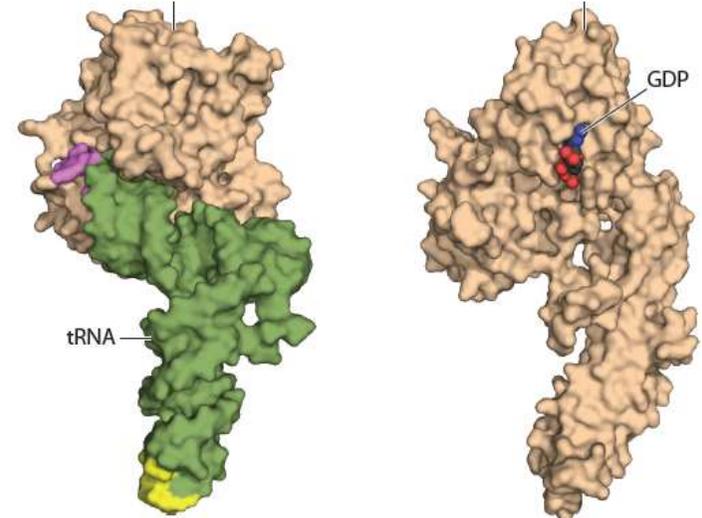


→ A translocação é induzida pela hidrólise de GTP → EF-G

→ Direciona o ciclo!!!

→ A cadeia polipeptídica cresce por um túnel de água no Ribossomo → paredes de rRNA 23 S

Mimetismo molecular  
tRNA-TFu      EF-G

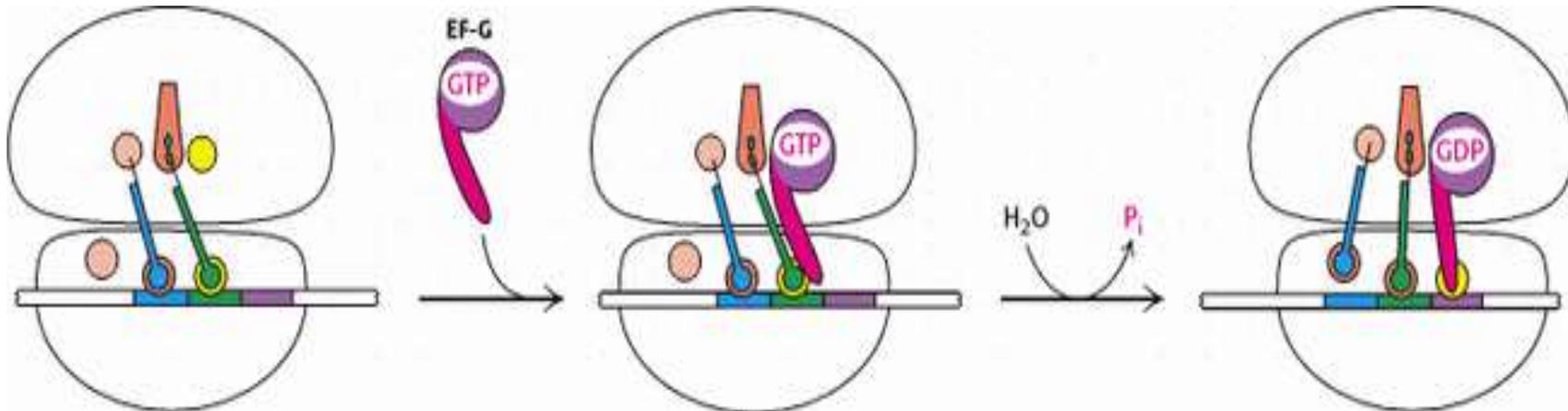


## Fatores de extensão

### 3º Etapa → Translocação do Ribossomo

O EF-G atua na transição dos tRNAs adjacentes dos sítios híbridos A/P para P/E  
→ etapa 2 do ciclo ribossomal

A Ligação do EF-G no Ribossomo estimula a atividade GTPase do EF-G  
→ O EF-G sofre mudanças conformacionais que desloca o peptidil-tRNA



→ Investimento de Energia para direcionar o ciclo e assegurar exatidão

- A cada ciclo de extensão entram 1 EF-Tu-GTP e 1 EF-G-GTP  
e saem 1 EF-Tu-GDP e 1 EF-G-GDP

- este ciclo mínimo envolve grandes variações conformacionais nestes fatores  
- necessitam de fatores de troca de nucleotídeos

## **Fatores de extensão**

→ **2 fatores de extensão auxiliam o ciclo funcional dos Ribossomos**

- **aumentam a velocidade e fidelidade da reação**

- **EF-Tu e EF-G → atuam através da hidrólise de GTP**

→ **Ciclos de Associação, hidrólise de GTP e dissociação de GDP destes fatores**

- **Ativam as mudanças conformacionais necessárias para o ciclo funcional**

→ **Edição no ciclo ribossomal**

→ **O ribossomo não averigua a identidade do aminoácido ligado ao tRNA**

- **O EF-Tu carrega o AA-tRNA para o Ribossomo e participa da etapa de reconhecimento inicial do códon**

- **Ocorre a formação de um híbrido com a participação do EF-Tu no encaixe inicial do AA-tRNA no sítio A**

→ **O ribossomo averigua se o pareamento códon-anticódon possui geometria correta no sulco menor**

→ **Reconhecimento positivo → hidrólise de GTP → liberação do EF-Tu**

- **continuidade da síntese**

→ **EF-G → Direcionam a reação no sentido único**

## Fatores de extensão

→ O EF-Tu introduz duas paradas para o reconhecimento adequado do códon-anticódon

1) Taxa de hidrólise de GTP é maior para uma interação correta

2) Se ocorrer o pareamento incorreto com hidrólise de GTP

- 2º parada envolve o tempo para a dissociação do EF-Tu-GDP

- Interações incorretas aumenta o tempo para o AA-tRNA errado dissociar-se

→ O EF-Tu permite monitorar a correspondência correta entre o AA-tRNA  $\leftrightarrow$  complexo  
envolve questões de afinidade maior para os pares corretos

O Ribossomo realiza ligações de H com o par códon-anticódon através do sulco menor  
do par correto

- As interações corretas aumentam o tempo de vida do complexo

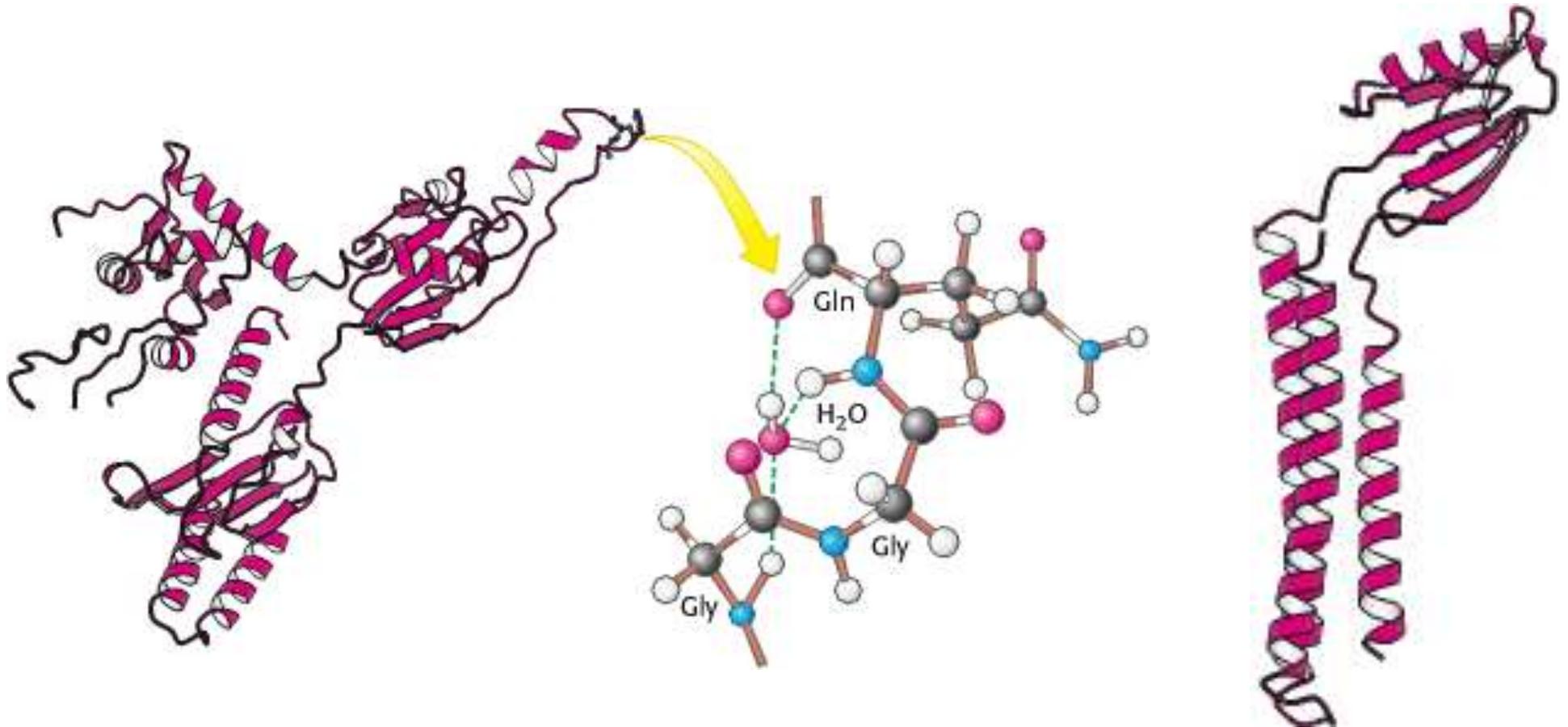
→ facilita a hidrólise de GTP

## Terminação da Polimerização

- depende dos códons de terminação (UAA, UAG e UGA) na fase de leitura adequada no mRNA

- Envolvem as proteínas Fatores de liberação

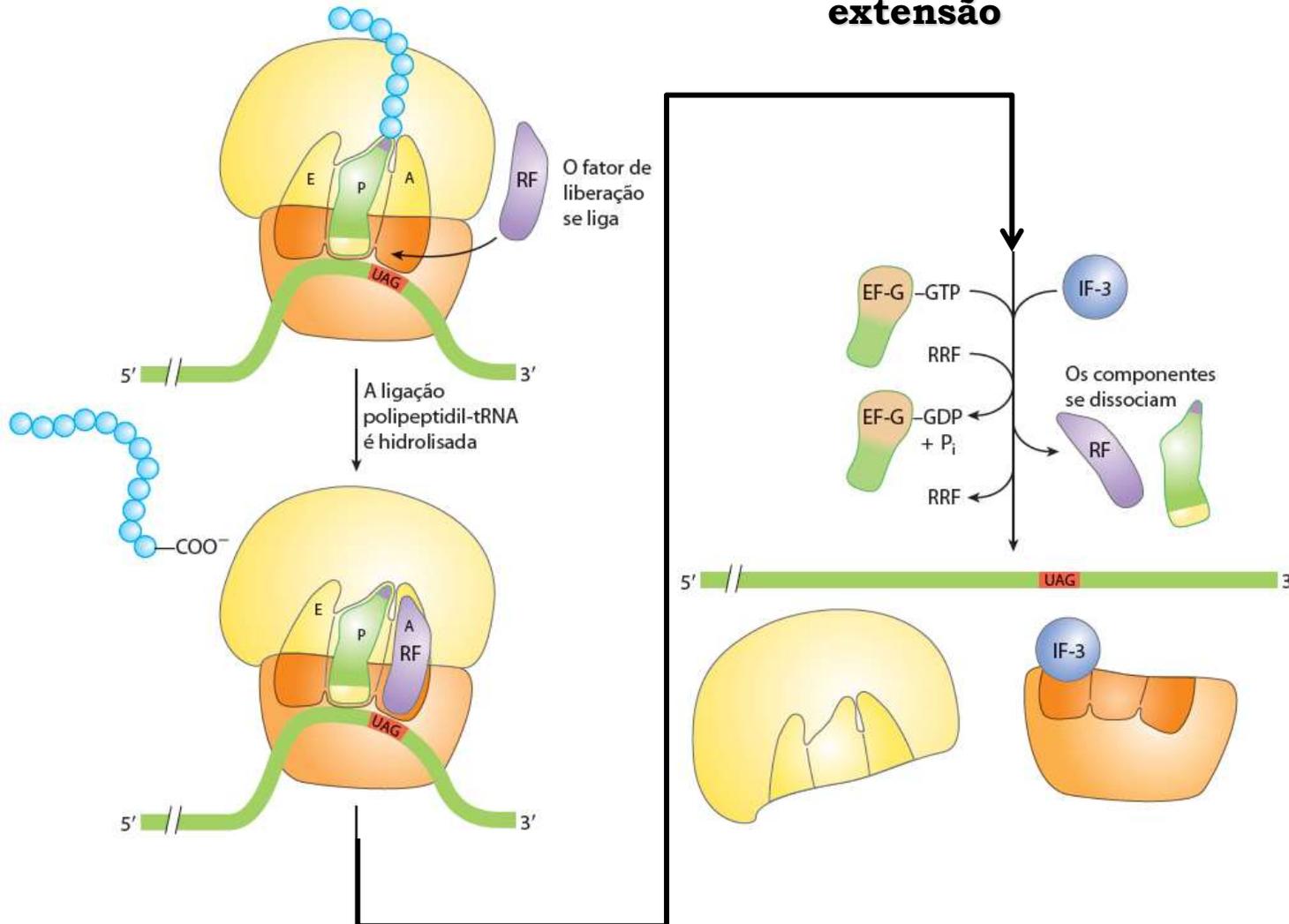
→ proteínas que possuem formato e carga similares aos tRNA → mimetismo molecular



# Terminação da Polimerização

## Fatores de Terminação

- interage com Ribossomo expondo os códon de terminação no sítio A na etapa 1 da extensão



→ Tal ligação induz a peptidil transferase usar água na reação

→ liberação da cadeia polipeptídica do tRNA no sítio P → finaliza a extensão da cadeia

→ desmonte do complexo Ribossomo-tRNA-mRNA em suas subunidades

## → Controle de qualidade da tradução

→ Exatidão da tradução envolve checagem do pareamento códon-anticódon - fator de extensão EF-Tu

- Processo muito dispendioso energeticamente

- 4 ligações Pi por ligação peptídica

→ Vários mecanismos de verificação na Ativação dos AA-adenilados e na extensão da cadeia

- Investimento de energia extra no controle de qualidade para assegurar exatidão

→ Hidrólise de ligações incorretas é preferível ocorrer na AA-tRNA sintase

→ hidrólise de GTP por associação códon-anticódon incorreto no híbrido A/T

→ Eliminação de mRNA quebrados

- evitam formação de proteínas truncadas e aberrantes

- Eucariotos editam o mRNA no núcleo e o transporta para o citoplasma protegido

- para a tradução ocorrer → integridade do Quepe 5' e poliadenilação 3'

- interação adequada com o aparato de iniciação → eIF-4F

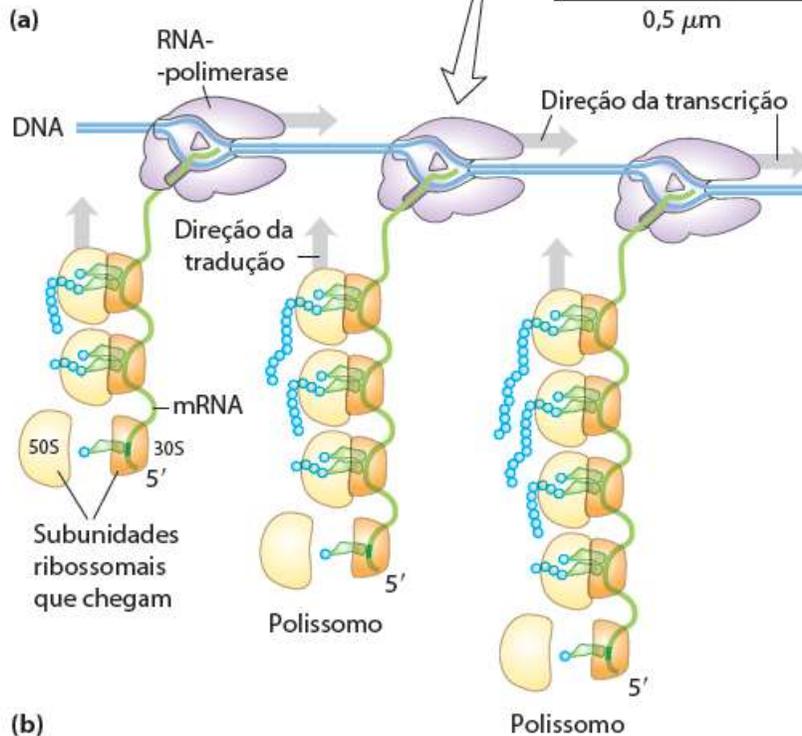
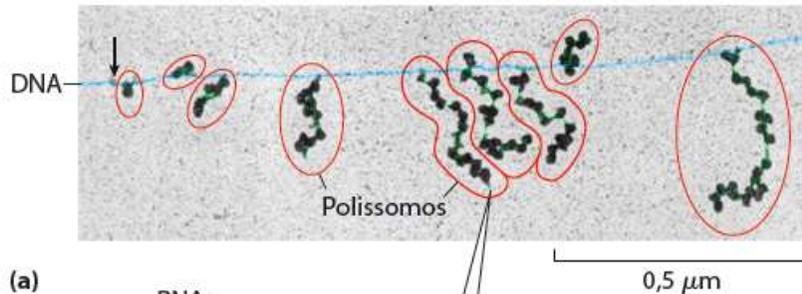
- procariotos utilizam um mRNA especial que codifica um peptídeo de 11 AA

- sinalização para degradação da proteína truncada

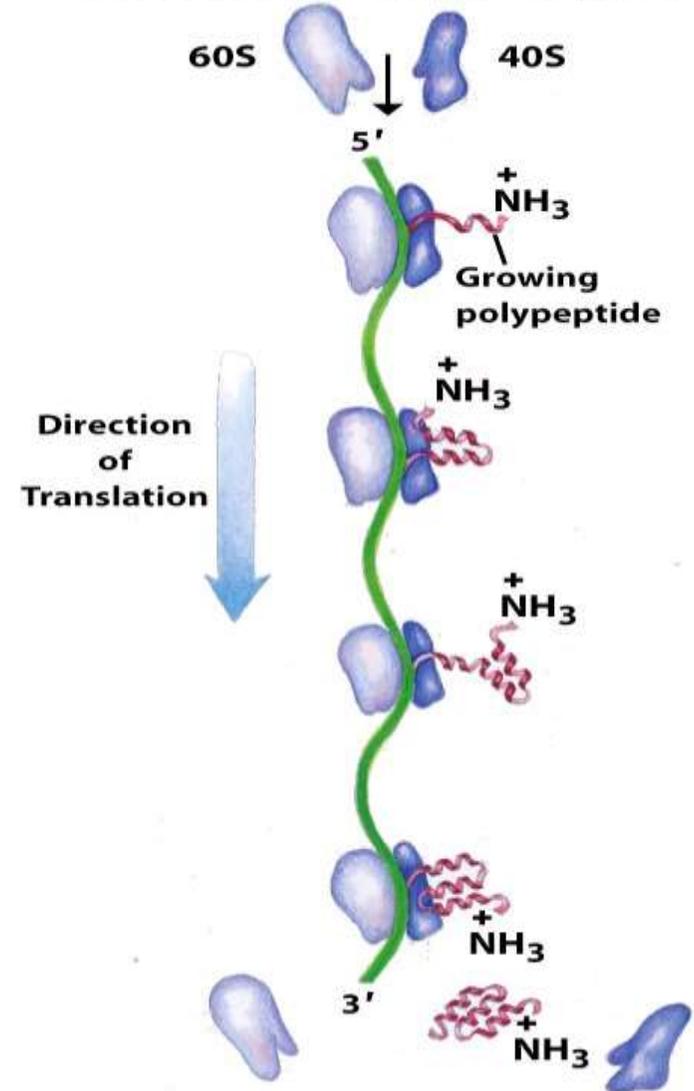
# Tradução

Vários Ribossomos podem atuar sobre o mesmo mRNA → Polissomos

Em bactérias → Transcrição e Tradução são processos acoplados



Incoming ribosomal subunits



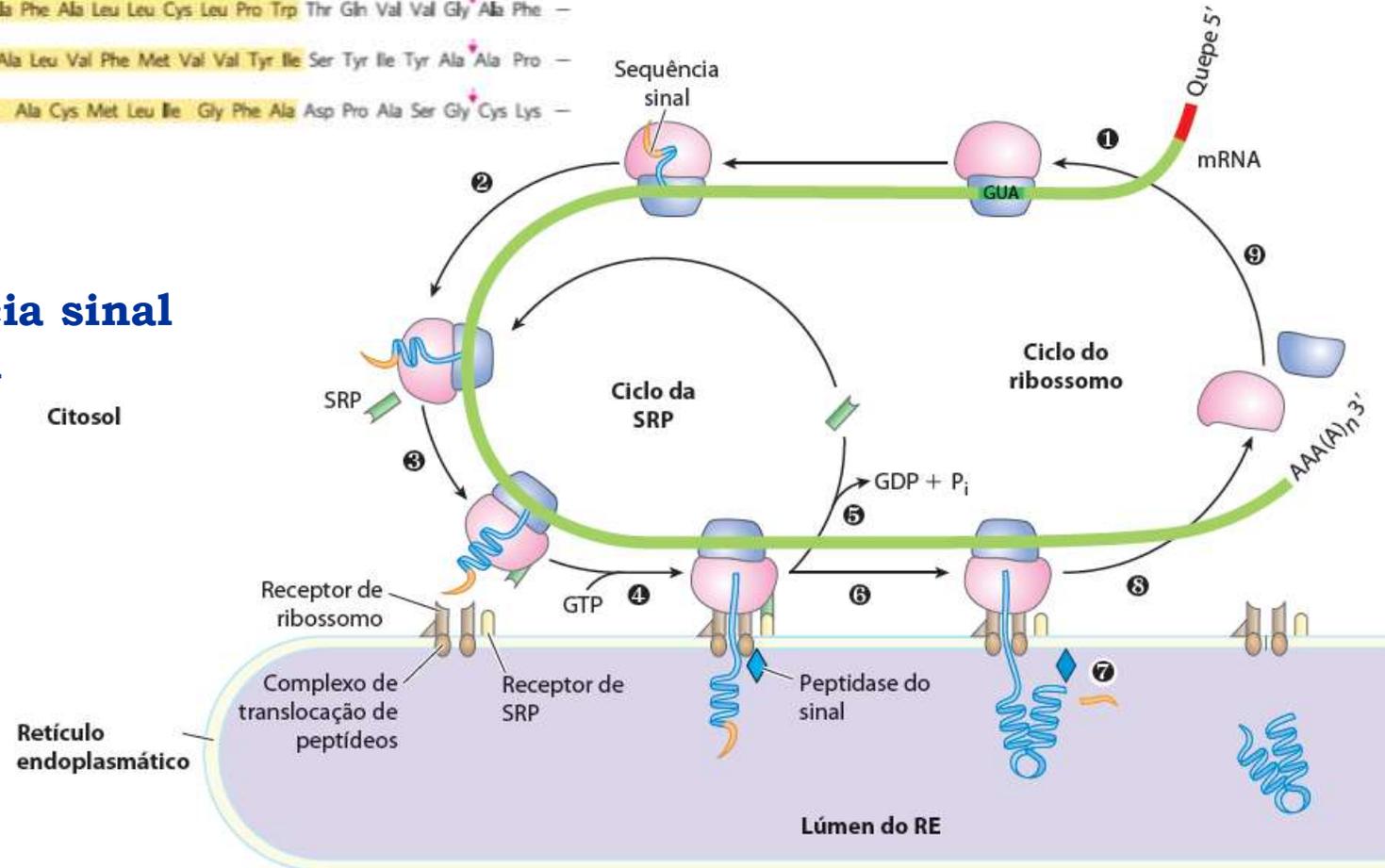
# Tradução

## Reticulo endoplasmático rugoso

### Síntese da proteína com concomitante transporte para o retículo endoplasmático

| Proteína                       | Sequência de Aminoácidos  | Sítio de clivagem |
|--------------------------------|---|-------------------|
| Virus A da influenza humana    | Met <b>Lys</b> Ala <b>Lys</b> Leu Leu Val Leu Leu Tyr Ala Phe Val Ala Gly Asp Gln   | Entre Gly e Asp   |
| Pré-pró-insulina humana        | Met Ala Leu Trp Met <b>Arg</b> Leu Leu Pro <b>Leu</b> Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Phe Val             | Entre Arg e Leu   |
| Hormônio de crescimento bovino | Met Met Ala Ala Gly Pro <b>Arg</b> Thr Ser <b>Leu</b> Leu Leu Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu Pro Trp Thr Gln Val Val Gly Ala Phe | Entre Arg e Thr   |
| Promelitina da abelha          | Met <b>Lys</b> Phe Leu Val <b>Asn</b> Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile Ser Tyr Ile Tyr Ala Ala Pro                     | Entre Asn e Val   |
| Proteína da cola de Drosophila | Met <b>Lys</b> Leu Leu Val Val Ala Val Ile Ala Cys Met Leu Ile Gly Phe Ala Asp Pro Ala Ser Gly Cys Lys                        | Entre Ile e Gly   |

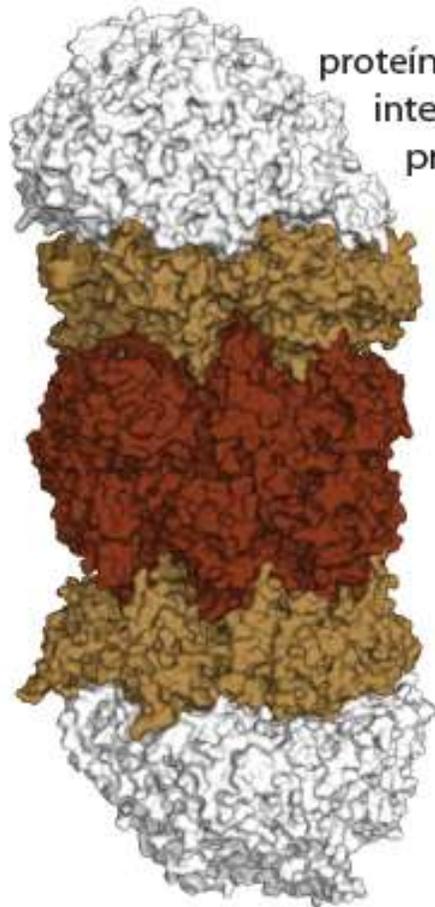
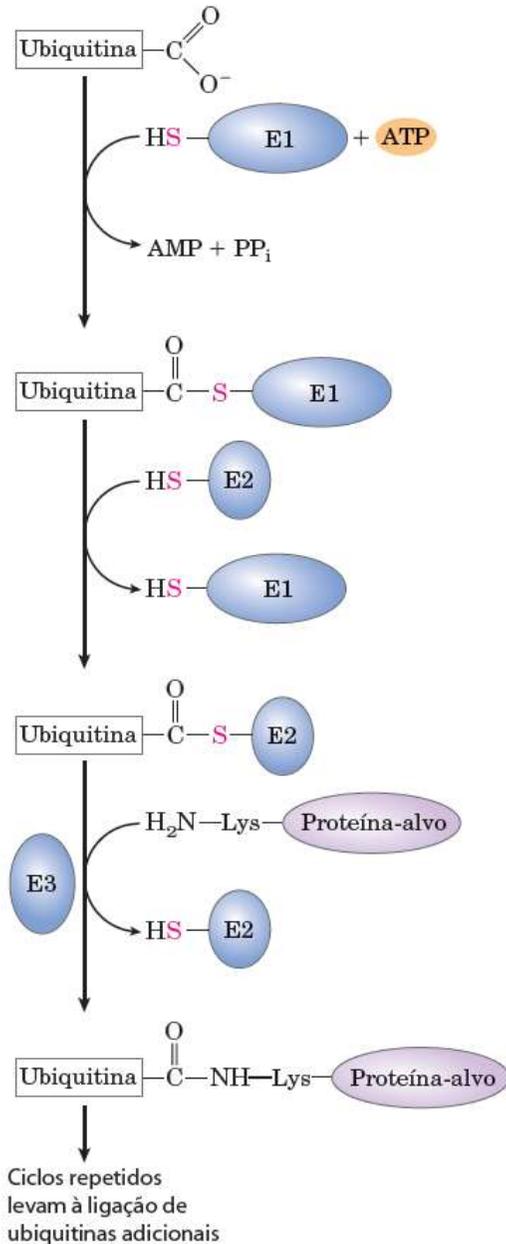
Depende da sequência sinal  
→ N-terminal





# Degradação de proteínas

## Sistema ubiquitina-proteassoma



Poliubiquitina ligada à proteína substrato interage com o proteassomo

